

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

**Granulozytäre Myeloide Suppressorzellen bei
Neugeborenen**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades**

der Medizin

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

vorgelegt von

Scheckenbach, Vera Clarissa Maximiliane

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Ch. Gille

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Henes

Tag der Disputation 4.10.2017

*Meinen lieben Eltern
und Großeltern*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Frühgeburtlichkeit	1
1.2	Neonatale Sepsis	2
1.3	Das fetale und neonatale Immunsystem	2
1.4	Myeloide Suppressorzellen	3
1.5	Ziel der Arbeit	6
2	Material	7
2.1	Verbrauchsmaterialien	7
2.2	Geräte	7
2.3	Software	8
2.4	Antikörper für Durchflusszytometrie	8
3	Patienten	9
4	Methoden	10
4.1	Blutentnahmen	10
4.2	Aufreinigung von mononukleären Zellen	10
4.3	Färbung mit spezifischen Oberflächenmarkern	11
4.4	Charakterisierung von Myeloiden Suppressorzellen (MDSC)	11
4.5	Statistische Methodik	13
4.5.1	Analyse des postnatalen Verlaufs der GR-MDSC	13
4.5.2	Analyse der GR-MDSC bei AIS	13
4.5.3	Analyse der GR-MDSC bei schwerer postnataler Infektion	14
4.5.4	Analyse der GR-MDSC bei erkrankten, nicht intensivpflichtigen Reifgeborenen	15
5	Ergebnisse	17
5.1	Das Gestationsalter hat keinen Einfluss auf den Anteil GR-MDSC im Nabelschnurblut	17
5.2	Der Anteil an GR-MDSC im Nabelschnurblut ist bei Spontangeburt im Vergleich zur primären Sectio erhöht	18

5.3	Der Anteil GR-MDSC fällt postnatal erst verzögert ab	19
5.4	Im Rahmen von Infekten kommt es zu einer Akkumulation von GR-MDSC	21
5.4.1	Bei Kindern mit Amnioninfektionssyndrom ist der Anteil an GR-MDSC im Nabelschnurblut erhöht	21
5.4.2	Bei Frühgeborenen mit schweren postnatalen Infektionen ist der Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut erhöht.	24
5.4.3	GR-MDSC bei erkrankten nicht intensivpflichtigen Reifgeborenen	26
6	Diskussion	28
6.1	GR-MDSC im Nabelschnurblut	28
6.2	GR-MDSC-Zahlen und Geburtsmodus	29
6.3	GR-MDSC im postnatalen Verlauf bei gesunden Frühgeborenen	30
6.4	MDSC bei neonatalen Infektionen	31
6.5	Diskussion der Methode	32
6.6	Ausblick	34
6.7	Schlussfolgerungen	37
7	Zusammenfassung	38
8	Literaturverzeichnis	40
9	Erklärung zum Eigenanteil	49
10	Danksagungen	50
11	Lebenslauf	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: die verschiedenen Wege der T-Zellsuppression durch MDSC	5
Abbildung 2: Definition der GR-MDSC	12
Abbildung 3: Der Anteil GR-MDSC im Nabelschnurblut ist vom Gestationsalter unabhängig	17
Abbildung 4: Der Anteil GR-MDSC im Nabelschnurblut ist bei Spontangeburt gegenüber primären Sectiones erhöht	18
Abbildung 5: Der Anteil GR-MDSC ist während der Neonatalzeit erhöht und fällt nach dem 28. Lebenstag ab	20
Abbildung 6: Longitudinaler Verlauf der GR-MDSC-Zahlen im peripheren Blut	21
Abbildung 7: Charakterisierung von GR-MDSC im Nabelschnurblut von Kindern mit und ohne AIS	22
Abbildung 8: Der Anteil an GR-MDSC im NSB ist bei Kindern mit Amnioninfektionssyndrom erhöht	23
Abbildung 9: Der Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut ist bei schweren postnatalen Infektionen erhöht	24
Abbildung 10: Die zum Zeitpunkt der Erkrankung erhöhten GR-MDSC fallen danach signifikant ab	25
Abbildung 11: Es bestand kein Unterschied zwischen den GR-MDSC gesunder reifgeborener Kinder und kranker reifgeborener Kinder	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	7
Tabelle 2: Geräte	7
Tabelle 3: Software	8
Tabelle 4: Kinder mit AIS und gematchte Kontrollgruppe	14
Tabelle 5: Kinder mit sekundärer Infektion und Kontrollgruppe	15
Tabelle 6: nicht intensivpflichtige Kinder mit Infektion und Kontrollgruppe	16

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
ANS	Atemnotsyndrom
Arg 1	Arginase 1
APC	Allophycocyanin
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence-activated cell sorter)
FFTS	Fetofetales Transfusionssyndrom
FIP	fokale intestinale Perforation
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
EOS	early onset Sepsis
GR-MDSC	Granulozytäre MDSC
HLA-G	humanes Leukozytenantigen G
HLA-DR	antigen-D-assoziiertes Leukozytenantigen
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
ICP	Infantile Zerebralparese
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IQR	Interquartilsabstand
LOS	Late Onset Sepsis
LT	Lebenstag
MCF	mean channel fluorescence
MDSC	Myeloide Supressorzellen
MNC	mononukleäre Zellen
MO-MDSC	Monozytäre MDSC
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NO	Stickstoffmonoxid

NSB	Nabelschnurblut
ONOO ⁻	Peroxinitrit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP Cy 5.5	Peridinin-chlorophyll proteins Cy 5.5
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
SSW	Schwangerschaftswoche
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th2-Zellen	T-Helferzellen vom Typ 2
T ^{-Reg}	regulatorische T-Zellen

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Frühgeburtlichkeit ist definiert als die Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW). Über 10% aller Kinder weltweit kommen als Frühgeborene zur Welt (Blencowe et al. 2012).

In Europa ist Frühgeburtlichkeit die führende Ursache für Todesfälle bei Neugeborenen (Black et al. 2010). Über 1 Million Todesfälle weltweit jährlich sind auf die Frühgeburtlichkeit und ihre Folgen zurückzuführen (Blencowe et al. 2012).

Neben der erhöhten Mortalität frühgeborener Kinder weisen diese auch eine deutlich erhöhte Morbidität auf. Ehemalige Frühgeborene haben ein erhöhtes Risiko im späteren Leben kardiovaskuläre Probleme, metabolische Erkrankungen, Asthma und andere Atemwegserkrankungen zu entwickeln (Ali and Greenough 2012, Landry et al. 2011, Saigal and Doyle 2008). Daneben besteht ein erhöhtes Risiko für neurologischer Erkrankungen (Platt 2014, Saigal and Doyle 2008). Generell gilt dabei: Je kleiner das Gestationsalter desto höher die Morbidität und Mortalität (Platt 2014).

Die mit 20% - 40% am zweithäufigsten zugrunde liegende Ursache von Frühgeburtlichkeit sind mütterliche Infektionen (Goldenberg et al. 2008, Andrews et al. 2000, Muglia and Katz 2010). Neben ihrer Rolle als Auslöser von Frühgeburtlichkeit tragen mütterliche Infektionen wesentlich zur postnatalen Sterblichkeit der Kinder bei (Pugni et al. 2015, Rocha et al. 2006, Lau et al. 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Amnioninfektionssyndrom (AIS) als häufiges Beispiel einer infektiologischen Erkrankung mit der Periventrikulären Leukomalazie (PVL), der Intraventrikulären Hämorrhagie (IVH), der Infantilen Zerebralparese (ICP) und der neonatalen Sepsis assoziiert ist (Rocha et al. 2006, Thomas and Speer 2011).

1.2 Neonatale Sepsis

Postnatale Infektionen im Sinne einer Early Onset Sepsis (EOS, Beginn innerhalb der ersten 72 Lebensstunden) oder einer Late Onset Sepsis (LOS, Beginn nach dem 3. Lebenstag) zählen zu den schwerwiegendsten Komplikationen in der Betreuung Frühgeborener (Weston et al. 2011). Der Häufigkeitsgipfel liegt dabei vor dem Erreichen der dritten Lebenswoche (Boghossian et al. 2013, Faust et al. 2012). Untersuchungen aus den USA zufolge liegt die Häufigkeit einer kulturgesicherten EOS bei Kindern unter 1500g Geburtsgewicht bei ca. 2%, während ca. 25% aller dieser Kinder mindestens eine LOS entwickeln (Stoll et al. 2002, Stoll et al. 2005). Für Deutschland liegen diese Zahlen mit 0,6% für die EOS und 9,6% für die LOS niedriger (Hartel et al. 2012).

Die Mortalitätsrate der neonatalen Sepsis ist mit 35% für die EOS bzw. 18% für die LOS sehr hoch (Stoll et al. 2002, Stoll et al. 2005). Neuere Studien über die Los bestätigen Mortalitätsraten von 15% (Hartel et al. 2012). Darüber hinaus erhöht die Neugeborenen-sepsis das Risiko an inflammatorischen neonatalen Folgeerkrankungen wie der PVL und der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) zu erkranken (Bracci and Buonocore 2003, Rocha et al. 2006, Holcroft et al. 2003).

1.3 Das fetale und neonatale Immunsystem

Die Anforderungen an das fetale und neonatale Immunsystem sind unterschiedlich. Intrauterin müssen vor allem Abstoßungsreaktionen gegenüber dem mütterlichen Organismus unterdrückt werden und Toleranz induziert werden (Kostlin et al. 2014, Rieber et al. 2013). Verschiedene Mechanismen sind dazu bekannt, wie der T-Helfer-2-Zell-Polarisierung (Th2-Zellen), der Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 10 (IL-10) und tolerogener Moleküle wie dem humanen Leukozytenantigen G (HLA-G). Kürzlich wurde außerdem das vermehrte Auftreten von immunsuppressiv wirkenden myeloiden Zellen, (myeloid derived suppressor cells, MDSC) im Nabelschurblut und Schwangerenblut (siehe unten) beschrieben (Wegmann et al. 1993, McCracken et al. 2003, Kostlin et al. 2014, Rieber et al. 2013). Postnatal muss sich das

Immunsystem innerhalb kurzer Zeit von einer keimarmen Umgebung innerhalb der Fruchthöhle, auf eine Umgebung voller potentiell pathogener Erreger außerhalb umstellen und dazu von Toleranz-Induktion zu einem funktionierenden Abwehrsystem ausreifen. Während dieser Adaptationsphase des Immunsystems besteht daher eine relative Immun-Unreife. Bisher wird angenommen, dass Neugeborene und insbesondere Frühgeborene dadurch deutlich infektanfälliger sind als ältere Kinder und Erwachsene (Schultz et al. 2004). Da insbesondere das spezifische Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist (Splawski et al. 1991), kommt der angeborenen Immunabwehr hier eine große Bedeutung zu (Pereira et al. 2013). Wie genau der Wechsel des Immunsystems vom fetalen zum postnatalen Zustand erfolgt und welche Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist bisher nur sehr unvollständig untersucht.

1.4 Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind unreife Vorläuferzellen von Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten, deren charakteristische Eigenschaft eine immunsuppressive Wirkung auf andere Immunzellen ist (Young et al. 1987, Gabrilovich and Nagaraj 2009). Erstmals beschrieben wurden sie bei krebserkrankten Mäusen und später bei Krebspatienten, bei denen sie in deutlich höherer Zahl vorkommen als bei gesunden Individuen (Buessow et al. 1984, Jessup et al. 1985, Kusmartsev and Gabrilovich 2002, Young et al. 1987). Darüber hinaus verändern MDSC bei verschiedenen anderen Erkrankungen, wie z.B. Autoimmunerkrankungen, bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen, Trauma und Sepsis ihre Anzahl und Aktivität. (Gabrilovich and Nagaraj 2009, Fortin et al. 2012, Zhu et al. 2007, Arocena et al. 2014, Delano et al. 2007, Cuenca et al. 2011, Obregon-Henao et al. 2013).

Phänotypisch sind MDSC eine sehr heterogene Population unreifer Zellen. Beim Menschen existieren keine spezifischen Oberflächenmarker um diese Zellpopulation zu charakterisieren. Sie unterscheiden sich von reifen Granulozyten durch ihre geringere Dichte und ihre Sedimentation mit mononukleären Zellen (Brandau et al. 2011, Kostlin et al. 2014, Rieber et al.

2013).

MDSC können phänotypisch in zwei Subgruppen unterteilt werden, Granulozytäre MDSC (GR-MDSC) und monozytäre MDSC (MO-MDSC) (Youn et al. 2008, Greten et al. 2011). GR-MDSC tragen Oberflächenmarker granulozytärer Zellen wie CD66b und CD11b (Rieber et al. 2013, Rodriguez et al. 2009, Brandau et al. 2011, Kostlin et al. 2014) während MO-MDSC den Monozytenmarker CD14 exprimieren (Duffy et al. 2013). Beide Subpopulationen sind negativ für das MHC II Molekül HLA-DR (Brandau et al. 2011, Duffy et al. 2013).

Wesentliche Mechanismen zur Vermittlung ihrer immunsuppressiven Wirkung sind die Depletion der essentiellen Aminosäure L-Arginin durch Expression der Enzyme Arginase1 (Arg 1) und induzierbare Stickstoffmonoxidoxidase (iNOS) sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Gabilovich and Nagaraj 2009). Ihre Aktivität entfalten MDSC in der Milz und an Ort und Stelle der Infektion bzw. der Erkrankung, da ihre Effektormechanismen auf direkten Kontakt mit den zu supprimierenden T-Zellen angewiesen sind (Buessow et al. 1984). Grundsätzlich sind beide Subpopulationen der MDSC in der Lage all diese Wirkmechanismen zu nutzen. Bisherige Forschungsergebnisse widersprechen sich in Bezug auf die Stärke der Immunsuppression und die hauptsächlich angewandten Mechanismen der einzelnen Untergruppen (Duffy et al. 2013, Gabilovich and Nagaraj 2009, Youn et al. 2008). Die Signalwege, die die Hemmung von T-Zellen durch MDSC vermitteln, sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

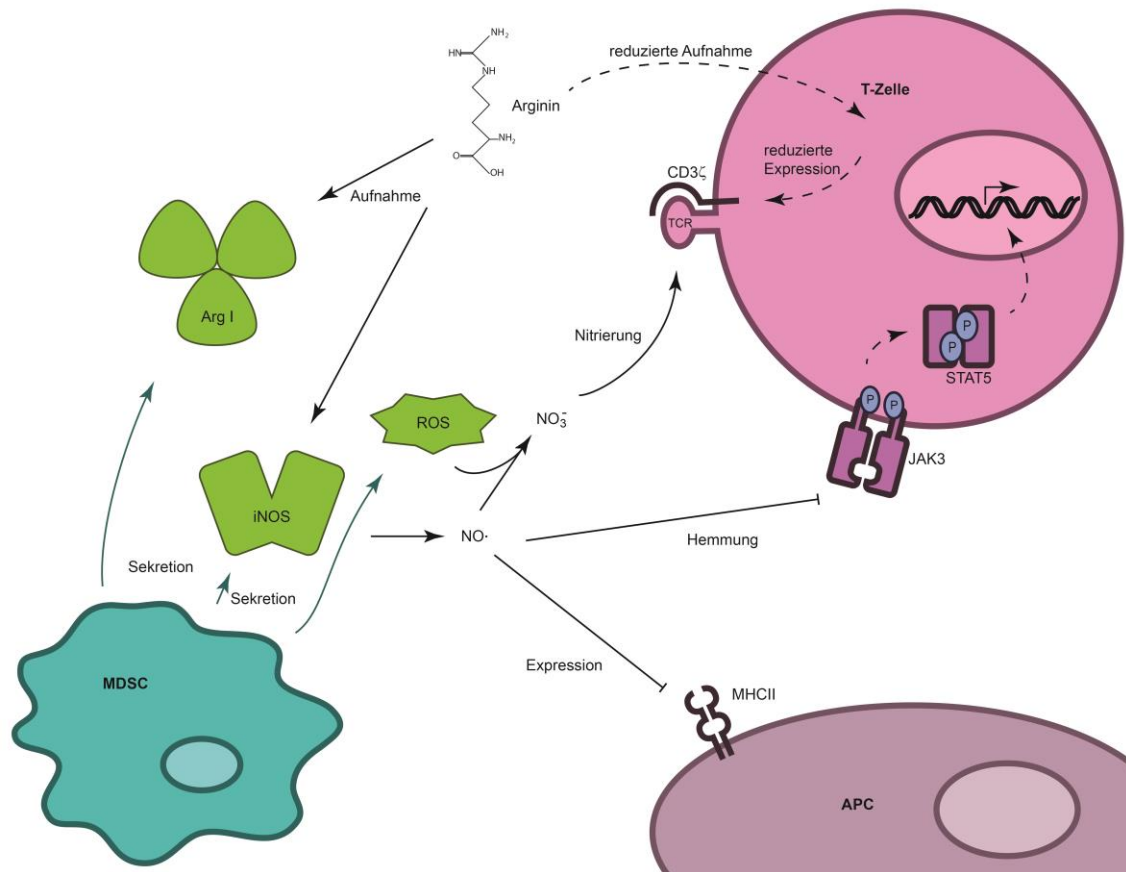


Abbildung 1: die verschiedenen Wege der T-Zellsuppression durch MDSC

Arg1 und iNOS verstoffwechseln L-Arginin, dadurch verringert sich die Expression der CD3 ζ -Kette des T-Zellrezeptors, was wiederum die T-Zellproliferation hemmt (Rodriguez et al. 2002). Gleichzeitig wird über die iNOS Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, wodurch der Jak3/STAT5-Signalweg und damit die T-Zell-Aktivierung gehemmt wird (Bingisser et al. 1998). Darüber hinaus fördert NO die T-Zellapoptose (Rivoltini et al. 2002) und reguliert die Expression von MHC-II herunter (Harari and Liao 2004). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die mit NO zu Peroxynitrit (ONOO⁻) reagieren, führen zur Nitration des T-Zell-Rezeptors (TCR) und des CD8 Rezeptors und unterdrücken dadurch die Antigenerkennung durch T-Zellen (Nagaraj et al. 2007).

Während das vermehrte Vorkommen von MDSC bisher vor allem im Rahmen pathologischer Zustände beschrieben wurde, konnten vorangegangene Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass GR-MDSC im Laufe einer normalen Schwangerschaft im mütterlichen Blut sowie im Nabelschnurblut (NSB) reifer Neugeborener akkumulieren, wesentliche Effektormechanismen exprimieren und *in vitro* T-Zellantworten hemmen können (Kostlin et al. 2014, Rieber et al. 2013). Dies legt die Vermutung nahe, dass MDSC eine Bedeutung für die Immuntoleranz zwischen Mutter und Fetus während der Schwangerschaft und für die relative Immun-Unreife während der postnatalen Immunadaptation haben könnten. Wie sich Zahlen und Funktionen von MDSC im Nabelschnurblut über die Gestation hinweg und postnatal im Blut von Neu- und Frühgeborenen verhalten und ob diese Zellen möglicherweise zur vermehrten Infektanfälligkeit Frühgeborener beitragen, ist bisher nicht untersucht.

1.5 Ziel der Arbeit

Aus diesem Vorwissen heraus definiert sich das Ziel dieser Dissertation, die zu einem besseren Verständnis des neonatalen Immunsystems beitragen soll, um somit auf lange Frist die Therapie von neonatalen Erkrankungen zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einer Pilot-Studie die folgenden Hypothesen überprüft:

- (1) Der Anteil an GR-MDSC im NSB hängt vom Gestationsalter ab und reduziert sich nahe dem Geburtstermin.
- (2) Der Anteil an GR-MDSC im NSB ist vom Geburtsmodus unabhängig.
- (3) Der Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut nimmt bei gesunden Frühgeborenen im Laufe der Neonatal- und frühen Säuglingszeit ab.
- (4) Neonatale Infektionen führen zu einem erneuten Anstieg des GR-MDSC-Anteils.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Biocoll Separation Solution (Dichte 1,077)	Fa. Biochrom, Berlin
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Fa. Corning Incorporated, New York USA
Eppendorfgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Fa. Eppendorf, Hamburg
FACS Flow	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
PBS-Dulbecco (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Fa. Biochrom, Berlin
Polystyrol-Rörchen	Fa. Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Fa. Biochrom, Berlin
Natriumazid	Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen
EDTA-Rührchen 1,5 ml	Fa. Sarstedt, Mümbrecht

2.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Fluorescence-activated cell sorter (FACS)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe	Fa. Brand, Wertheim
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Sysmex Typ KX 21N und XP300	Fa. Sysmex GmbH, Norderstedt
Vortex	Fa. Bender & Hobheim AG, USA
Zentrifuge Rotana 46 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

2.3 Software

Tabelle 3: Software

Cell Quest-Software	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
<i>R Core Team (2013)</i>	Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software, Inc USA
Adobe Illustrator	Adobe Systems, Inc USA

2.4 Antikörper für Durchflusszytometrie

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Antikörper von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen.

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert:

CD66b (Klon: G10F5; Isotyp: Ms IgM, κ)

Phycoerythrin (PE) markiert:

CD33 (Kon P67.6; Isotyp: Ms IgG₁, κ)

CD33 (Klon: WM53; Isotyp: Ms IgG₁, κ) Fa: Becton Dickinson / Pharmingen

CD14 (Klon M5E2; Isotyp: Ms IgG_{2a}, κ) Fa: Becton Dickinson / Pharmingen

Allophycocyanin (APC) markiert:

CD14 M ϕ P9; Isotyp Ms IgG_{2b}, κ)

Peridinin-chlorophyll proteins Cy 5.5 (PerCP Cy 5.5) markiert:

HLA-DR (Klon: G46-6; Ms IgG_{2a}, κ)

3 Patienten

Diese Pilotstudie wurde durch das Ethik-Komitee der medizinischen Fakultät Tübingen begutachtet und bewilligt (Ethik-Votum Nr. 178/2011BO1). Von den Eltern aller Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme eingeholt. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte in den Jahren 2012 und 2013. In die Studie eingeschlossen wurden neu- bzw. frühgeborene Kinder, welche mit einem Gestationsalter zwischen 23+5 SSW und 42+0 SSW geboren worden waren und sich in stationärer Behandlung der Abteilung für Neonatologie der Universitätskinderklinik Tübingen befanden. Bei der Auswahl der Studienteilnehmer wurden nur Kinder eingeschlossen, die während der Schwangerschaft keinen offensichtlichen und bisher bekannten, möglicherweise auf das Immunsystem wirkenden Einflüssen ausgesetzt waren. So wurden Kinder, deren Mütter unter transplantationsbedingter Immunsuppression standen, ausgeschlossen, genauso wie Zwillinge mit fetofetalem Transfusionssyndrom. Außerdem wurden Kinder mit Alloimmunthrombopenie und antikörpergetriggelter Hämolyse, sowie Kinder mit genetischen Erkrankungen ausgeschlossen

.

4 Methoden

4.1 Blutentnahmen

Das Nabelschnurblut (NSB) wurde durch sterile Punktion der Nabelschnur direkt nach Abnabelung gewonnen und in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen getropft. Das periphere Blut der Neu- und Frühgeborenen stammte aus Resten von klinisch indizierten, routinemäßig durchgeführten Blutabnahmen, welche aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen bezogen wurden. Es wurde nur Blut verwendet, das weniger als 24 Stunden alt war. Wenn nicht anders angegeben, wurden nur Werte in die Analysen eingeschlossen, bei denen sich kein Hinweis auf eine Pathologie, insbesondere eine Infektion zeigten.

4.2 Aufreinigung von mononukleären Zellen

Die Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) erfolgte nach der Methode von Böyum (Boyum 1968, 1977) mittels Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut und Nabelschnurblut.

Zur Isolierung der MNC wurden die Blutproben mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf 600 µl verdünnt und dann in Eppendorfgefäßen unter Vermeidung einer Durchmischung auf 250 µl Trennlösung geschichtet. Anschließend erfolgte der erste Zentrifugationsschritt für 35 Minuten bei 400 g und 20°C. Aufgrund ihrer geringeren Dichte sammeln sich bei diesem Verfahren MNC in einem dünnen Ring oberhalb des Biocoll und lassen sich somit von den dichteren Granulozyten und Erythrozyten trennen.

Der bei der Zentrifugation entstandene Zellring von MNC wurde vorsichtig abpipettiert und in ein Polystyrol-Röhrchen überführt.

Dort wurden die MNC mit ca. 3 ml PBS gewaschen und dann nach Zellzählung im automatischen Hämozytometer (Sysmex Typ KX 21N und XP 300) auf eine Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen / ml eingestellt. In Proben mit einem Volumen

von < 200µl wurde auf eine Zellzahlbestimmung verzichtet, um den Zellverlust der ohnehin schon sehr kleinen Proben möglichst gering zu halten.

4.3 Färbung mit spezifischen Oberflächenmarkern

Die aufgereinigten und gewaschenen MNC wurden nun mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Oberflächenmarkern gefärbt, um den Anteil an MDSC in den Proben zu bestimmen. Zur Fluoreszenzfärbung wurden je Probe ca. 2×10^5 Zellen verwendet.

Anschließend wurden je 1 µl Anti-CD66b-FITC-, AntiCD33-PE- und AntiCD14-APC- sowie 0,5 µl Anti-HLA-DR-Per-CP-Antikörper hinzugegeben. Nun wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension mit 2 Hüben FACS-Flow mit 0,1% Natriumazid gewaschen und bei 330g 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe durchflusszytometrisch analysiert.

4.4 Charakterisierung von Myeloiden Suppressorzellen (MDSC)

MDSC können anhand von Oberflächenmarkern in granulozytäre (GR-MDSC) und monozytäre MDSC (MO-MDSC) unterteilt werden (Greten et al. 2011, Youn et al. 2008). Beide Subpopulationen finden sich in der Zellfraktion der myeloiden Zellen und exprimieren den Myelozytenmarker CD33 (Brandau et al. 2011). MO-MDSC exprimieren dazuhin den Monozyten-Marker CD14, während GR-MDSC positiv für CD66b sind. Beiden fehlt das Klasse-II-MHC-Molekül HLA-DR (Rieber et al. 2013, Rodriguez et al. 2009, Brandau et al. 2011, Duffy et al. 2013). Die Gatingstrategien für GR-MDSC sind in Abbildung 2 dargestellt.

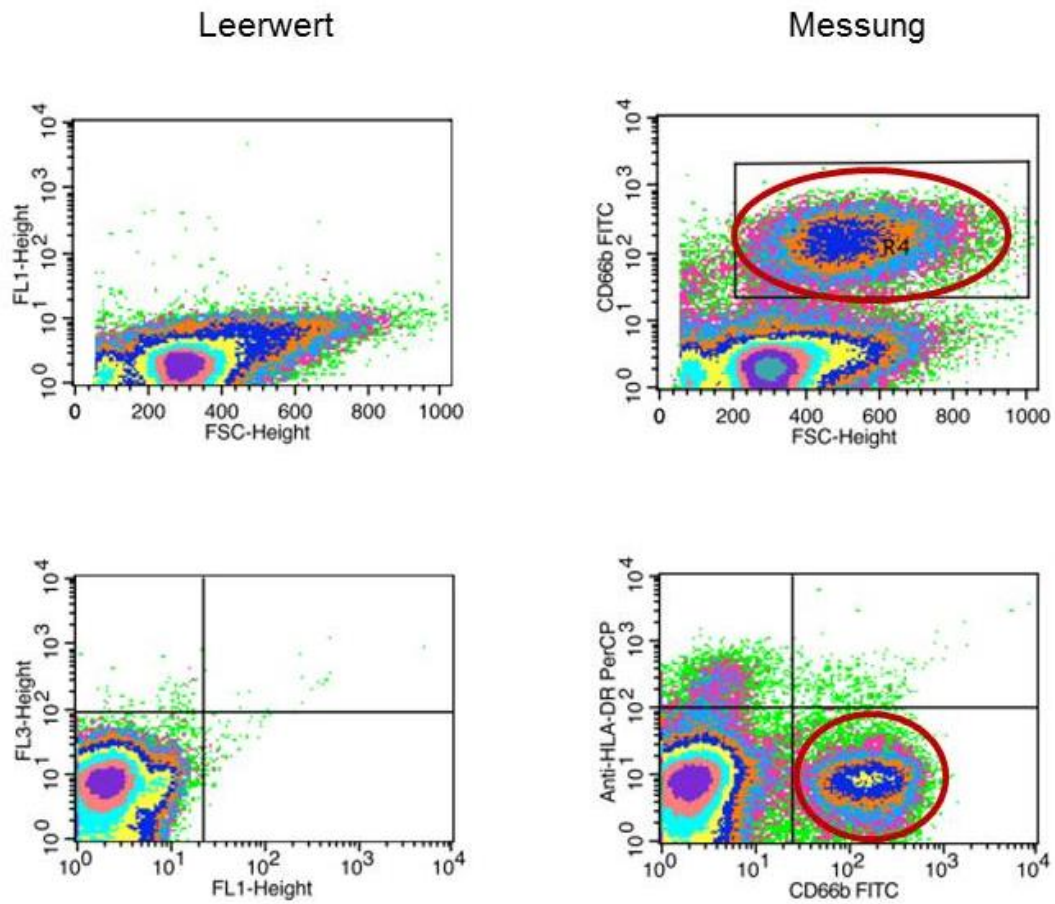


Abbildung 2: Definition der GR-MDSC

Die granulozytären MDSC wurden als CD66b⁺HLA-DR⁻ definiert (Rieber et al. 2013, Rodriguez et al. 2009, Brandau et al. 2011).

4.5 Statistische Methodik

Zur statistischen Analyse wurden die Daten mit Hilfe des D'Agostino and Pearson Omnibus Normality Tests auf Gauss'sche Normalverteilung geprüft. Alle gemessenen Größen waren nicht normalverteilt. Unterschiede in den Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests bei nicht verbundenen Stichproben und mit Hilfe des Wilcoxon-matched-pairs Signed Rank Tests bei verbundenen Stichproben ermittelt. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte zunächst eine Varianzanalyse (One-Way-ANOVA). Die statistische Analyse wurde mit R (Version 3.0.1), mit den Paketen nlme (Version 3.1-111), multcomp (Version 1.3-0) und GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Das festgelegte Signifikanzniveau lag bei $p > 0,05$.

Im Folgenden werden alle statistischen Daten mit Median und in Klammern Interquartilsabstand und Anzahl der Messgrößen angegeben.

4.5.1 Analyse des postnatalen Verlaufs der GR-MDSC

Der postnatale Zeitraum wurde in drei Gruppen (Perinatalperiode 0-8 Tage, Postnatalperiode 8-28 Tage und Säuglingsperiode >28 Tage) eingeteilt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Post-Hoc-Tests nach Tukey wobei die Daten logarithmustransformiert wurden. Waren von einem Kind in einem Zeitraum mehrere Proben vorhanden, so wurden alle Werte mit in die Auswertung einbezogen.

4.5.2 Analyse der GR-MDSC bei AIS

Für die Diagnosestellung eines AIS wurden die klassischen klinischen Parameter mütterliches Fieber, Leukozytose, schmerzhafter Uterus und fötode riechendes Fruchtwasser herangezogen (Buhimschi et al. 2013).

Die Kinder, die diesen Kriterien entsprachen, wurden mit einer Kontrollgruppe aus Kindern ohne AIS, die in Gestationsalter und Geburtsmodus den Kindern mit AIS entsprachen, verglichen. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Wilcoxon matched-pairs Signed Rank Tests.

Tabelle 4: Kinder mit AIS und gematchte Kontrollgruppe

<u>AIS</u>	<u>Kein AIS</u>
13,15 %	0,75 %
7,21 %	2,01 %
12,85 %	1,76 %
7,28 %	0,95 %
4,37 %	1,85 %
8,26 %	1,23 %
1,28 %	6,23 %
19,12 %	2,83 %
0,53 %	0,45 %

4.5.3 Analyse der GR-MDSC bei schwerer postnataler Infektion

Es wurden Proben von Kindern, die im Laufe ihres stationären Aufenthalts eine nosokomiale Sepsis entwickelten, mit Proben gesunder, alters- und Geburtsmodus-gematchter Kinder verglichen. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Wilcoxon matched-pairs Signed Rank Tests.

Tabelle 5: Kinder mit sekundärer Infektion und Kontrollgruppe

<u>Infektion</u>	<u>Keine Infektion</u>
33,41 %	2,2 %
2,31 %	1,19 %
8,05 %	4,9 %
8,58 %	3,7 %
11,53 %	1,12 %
6,29 %	2,93 %

4.5.4 Analyse der GR-MDSC bei erkrankten, nicht intensivpflichtigen Reifgeborenen

Es wurden Proben von reifgeborenen Kindern, die im Laufe ihres stationären Aufenthalts eine Infektion entwickelten, aber zu keinem Zeitpunkt intensivmedizinischer Betreuung bedurften, mit Proben gesunder reifgeborener Kinder verglichen. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Mann-Whitney-Tests. Bei der gesunden Vergleichsgruppe bestand initial der Verdacht auf eine behandlungsbedürftige Erkrankung, der dann aber durch die anschließend in dieser Studie verwendeten Blutproben ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 6: nicht intensivpflichtige Kinder mit Infektion und Kontrollgruppe

<u>Infektion</u>	<u>Keine Infektion</u>
15,23 %	0,46 %
0,96 %	0,80 %
2,66 %	4,95 %
10,28 %	5,04 %
17,84 %	18,56 %
3,44 %	2,20 %
1,28 %	1,84 %
2,94 %	
3,60 %	
19,12 %	
14,25 %	

5 Ergebnisse

5.1 Das Gestationsalter hat keinen Einfluss auf den Anteil GR-MDSC im Nabelschnurblut

Im NSB extrem frühgeborener Kinder mit einem Gestationsalter von 24+0 SSW bis 29+6 SSW betrug der Anteil an GR-MDSC im Median 1,81% (3,1; n=9) bei Frühgeborenen aus 30+0 bis 36+6 SSW 0,95% (1,14; n=13) und bei Reifgeborenen 1,55% (1,11; n=13, Abbildung 3). Zwischen den Gruppen bestanden keine Unterschiede im Anteil der GR-MDSC an der Fraktion der monozytären Zellen ($p > 0,05$, One-Way ANOVA).

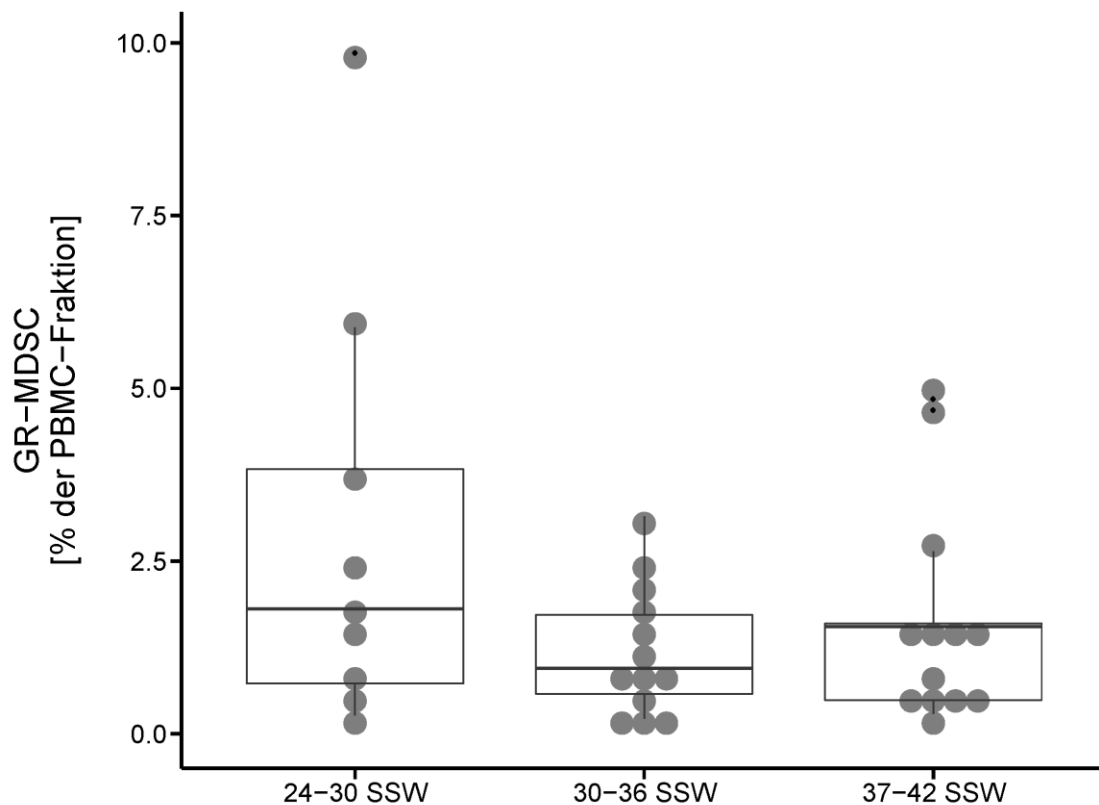


Abbildung 3: Der Anteil GR-MDSC im Nabelschnurblut ist vom Gestationsalter unabhängig

Mononukleäre Zellen wurden aus Nabelschnurblut aufgereinigt und der Anteil an CD66b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{low}-GR-MDSC durchflusszytometrisch ermittelt. Das Punktdiagramm stellt Median und Interquartilsabstand dar (n = 9-13, p>0,05, One-Way-ANOVA).

5.2 Der Anteil an GR-MDSC im Nabelschnurblut ist bei Spontangeburt im Vergleich zur primären Sectio erhöht

Im Nabelschnurblut von Kindern nach primärer Sectio lag der Anteil GR-MDSC im Median bei 1,32% (2,08; n = 35). Im Nabelschnurblut spontan geborener Kinder war dieser mit 2,13% (3,37; n = 22; Abbildung 4) fast doppelt so hoch (p <0,05; Mann-Whitney Test).

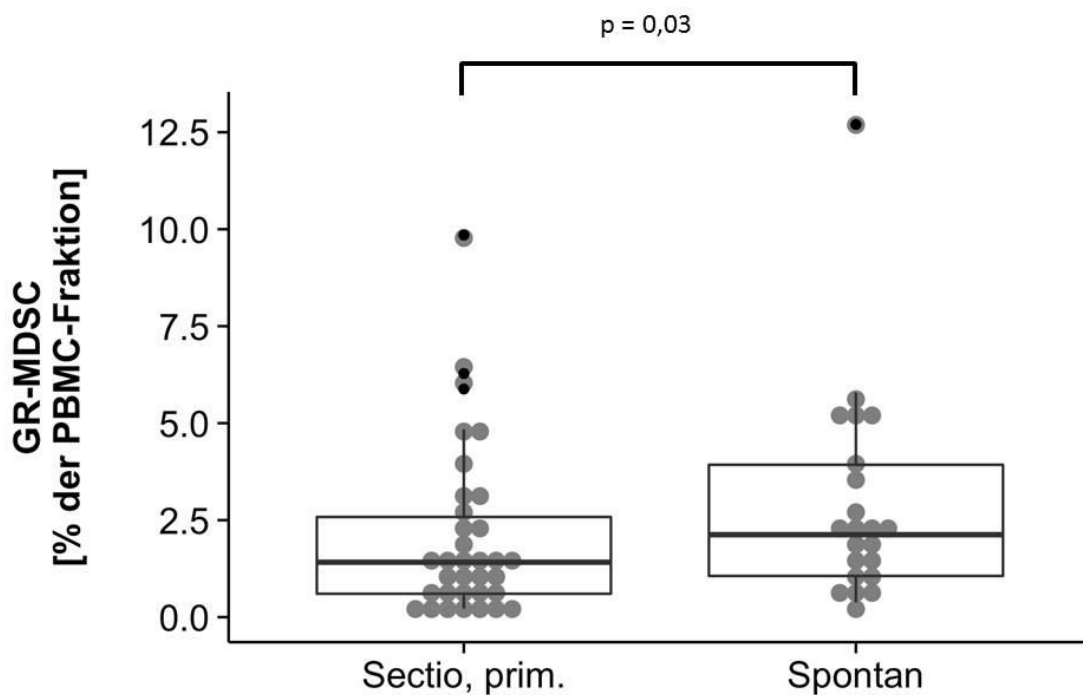


Abbildung 4: Der Anteil GR-MDSC im Nabelschnurblut ist bei Spontangeburt gegenüber primären Sectiones erhöht

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Frühgeborener isoliert und der

Anteil CD66b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{low}/GR-MDSC durchflusszytometrisch ermittelt. Das Punktdiagramm stellt Median und Interquartilsabstand dar (n=22-35, p >0,05, Mann-Whitney-Test).

5.3 Der Anteil GR-MDSC fällt postnatal erst verzögert ab

MNC von frühgeborenen Kindern mit postnatal komplikationslosem Verlauf wurden aus Routineblutabnahmen und indizierten Blutabnahmen ohne pathologischem Ergebnis aufgereinigt und der Anteil der GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 5). Der Anteil von GR-MDSC im peripheren Blut von Kindern zwischen dem 0. – 7. Lebenstag (LT) betrug im Median 1,32% (1,61; n = 42), und zwischen dem 8. – 28. LT (Neonatalzeit) 2,2% (1,85; n = 15). Nach dem 28. Lebenstag fiel der GR-MDSC-Anteil auf 0,52% (0,58; n = 15) ab (p<0,05 vs. Perinatal- und Neonatalzeit, One-Way-ANOVA und Post-Hoc-Test nach Tukey). Die grauen Linien zeigen verbundene Proben vom gleichen Individuum an.

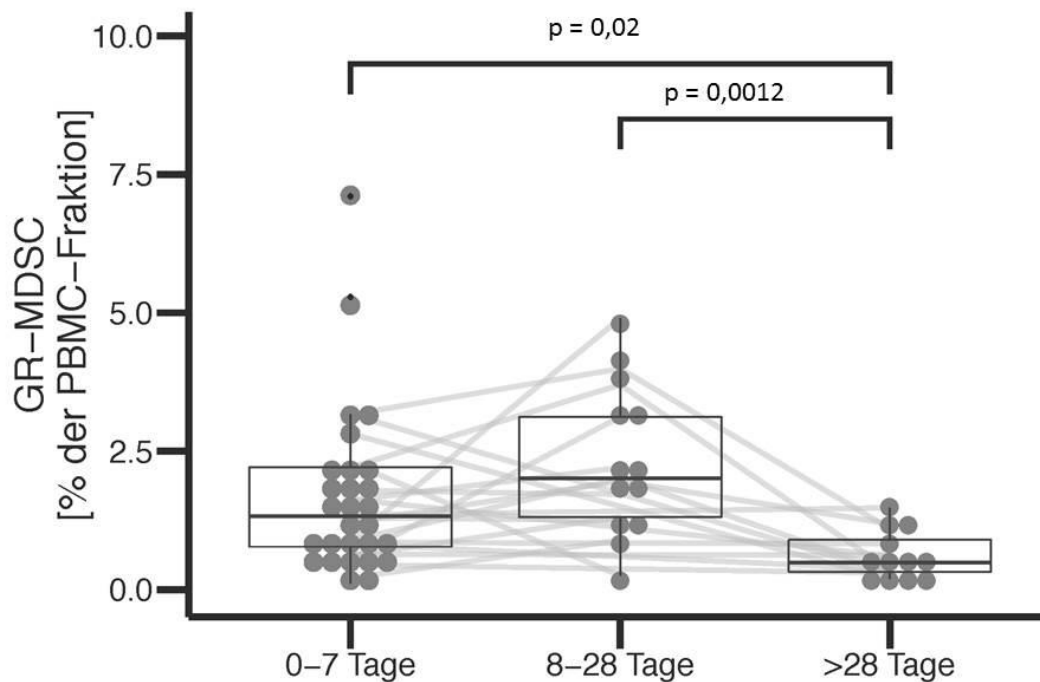


Abbildung 5: Der Anteil GR-MDSC ist während der Neonatalzeit erhöht und fällt nach dem 28. Lebenstag ab

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Frühgeborener isoliert und der Anteil $CD66b^+/CD33^+/HLA-DR^{low/-}$ GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Das Punktdiagramm stellt Median und Interquartilsabstand dar. Die grauen Linien zeigen verbundene Proben an (n=15-42, One-Way-ANOVA nach Tukey).

Um eine Abhängigkeit der postnatalen GR-MDSC-Zahlen vom Gestationsalter zu untersuchen, wurden die Werte in zwei Strata aufgeteilt. Abbildung 6 stellt die GR-MDSC-Zahlen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei Kindern <30 SSW, Kindern zwischen 30 und 37 SSW und beide Gruppen zusammen dar.

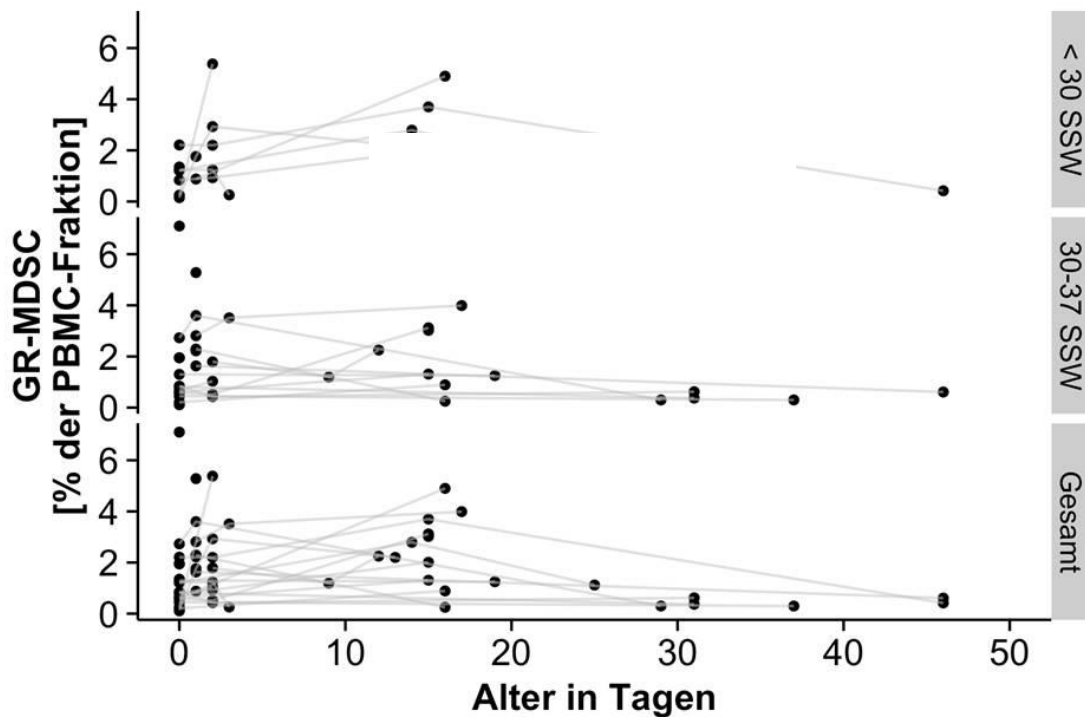


Abbildung 6: Longitudinaler Verlauf der GR-MDSC-Zahlen im peripheren Blut

Verlaufsdigramm zur Darstellung des Anteils von GR-MDSC an den MNC bei Frühgeborenen <30 SSW (oben), 30-37 SSW (Mitte) und allen Frühgeborenen (unten) in Abhängigkeit vom Lebensalter bei Blutentnahme. Die grauen Linien zeigen verbundene Proben an.

5.4 Im Rahmen von Infekten kommt es zu einer Akkumulation von GR-MDSC

5.4.1 Bei Kindern mit Amnioninfektionssyndrom ist der Anteil an GR-MDSC im Nabelschnurblut erhöht

Vergleichende Untersuchungen aus dem Nabelschnurblut von Kindern mit AIS und gesunden Neugeborenen zeigten deutliche Unterschiede in der GR-MDSC-Zahl. Repräsentative Histogramme zur Quantifizierung und phänotypischen Charakterisierung der GR-MDSC sind in Abbildung 7 dargestellt.

Als Kontrollgruppe dienten Kinder ohne AIS, die in Gestationsalter und Geburtsmodus den Kindern mit AIS entsprachen.

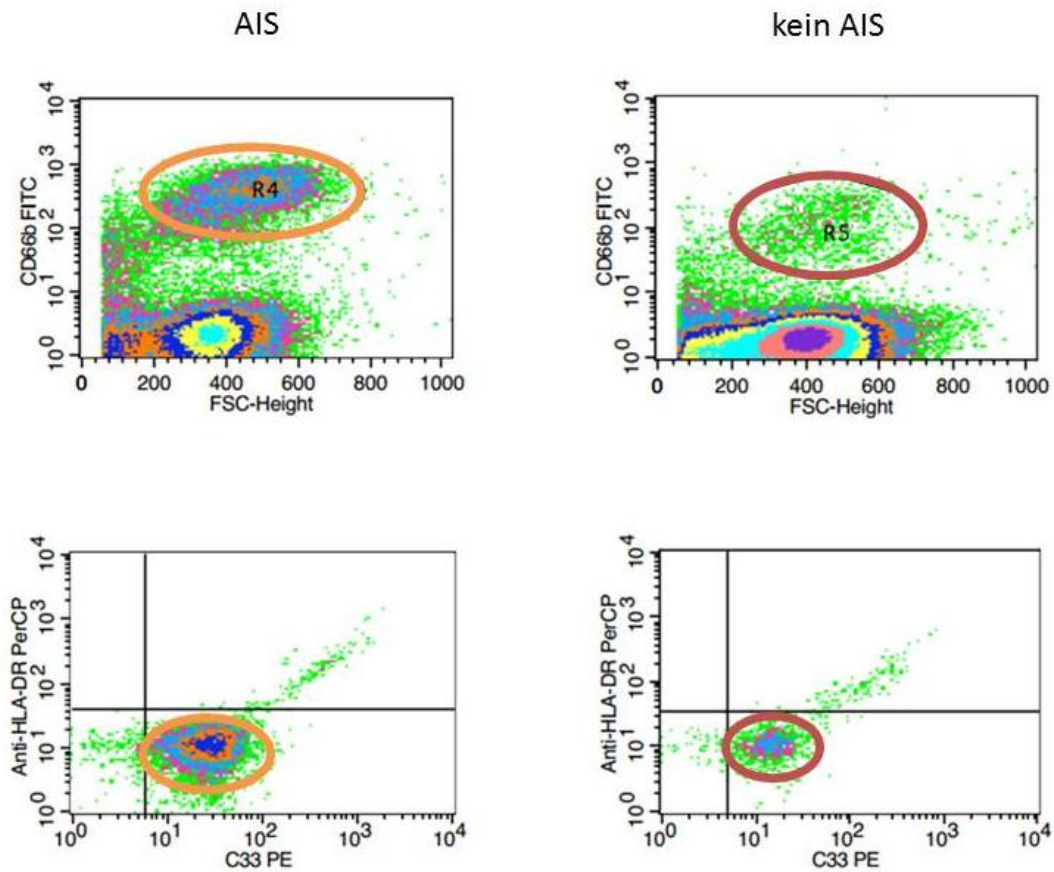


Abbildung 7: Charakterisierung von GR-MDSC im Nabelschnurblut von Kindern mit und ohne AIS

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Frühgeborener mit (links) und ohne AIS (rechts) isoliert und der Anteil GR-MDSC als CD66b⁺ gegatet (oben). Die weitere Charakterisierung erfolgte über die Oberflächenmarker CD33 und HLA-DR (unten).

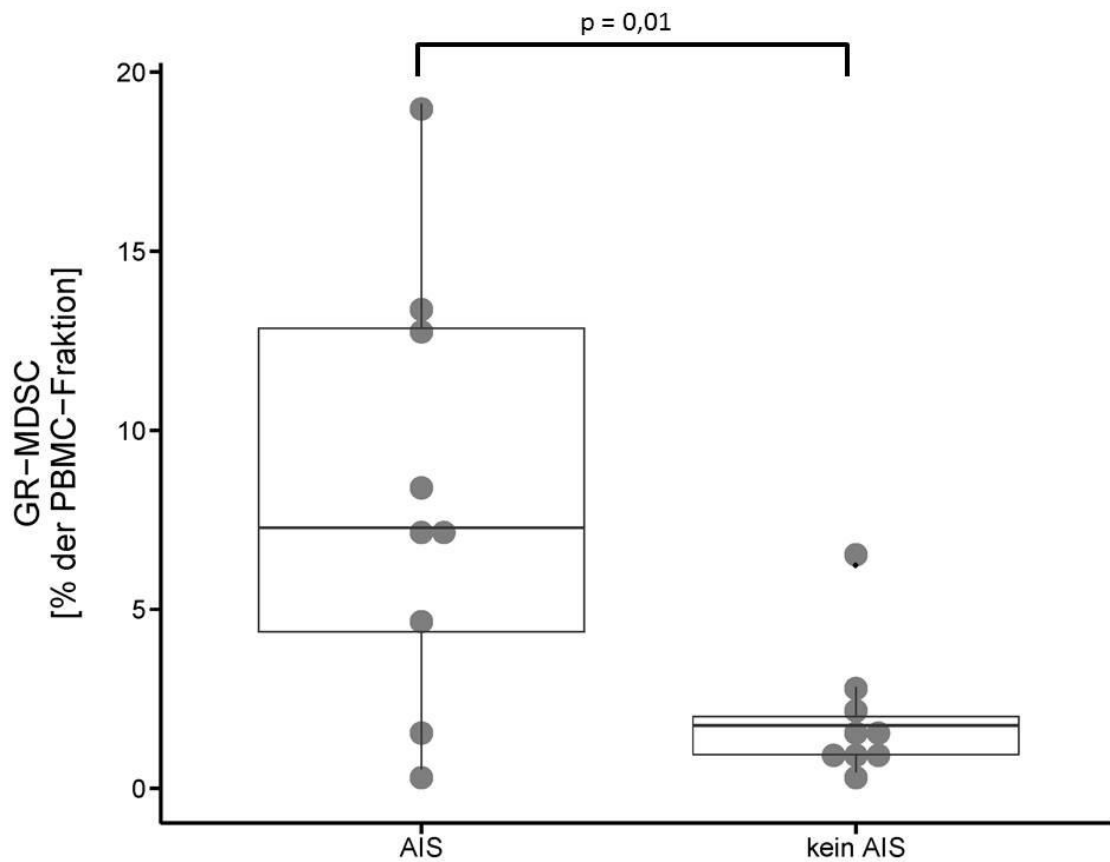


Abbildung 8: Der Anteil an GR-MDSC im NSB ist bei Kindern mit Amnioninfektionssyndrom erhöht

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Frühgeborener mit und ohne Amnioninfektionssyndrom (AIS) isoliert und der Anteil CD66b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{low}-GR-MDSC durchflusszytomertisch bestimmt (n = 9, Wilcoxon matched-pairs Signed Rank Test).

5.4.2 Bei Frühgeborenen mit schweren postnatalen Infektionen ist der Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut erhöht.

Zur Untersuchung des Einflusses postnataler Infektionen auf die Zahl an GR-MDSC im peripheren Blut wurden Blutproben von Frühgeborenen, welche während des stationären Aufenthalts eine sekundäre Infektion (nosokomiale Sepsis) entwickelten, mit Proben gesunder, alters- und Geburtsmodus-gematchter Kinder verglichen. Der Anteil GR-MDSC im peripheren Blut bei Kindern mit Infektion war mit 8,32% (11,74; n = 6) höher als bei Kindern ohne Infektion (2,57%; 2,83; n = 6; Abbildung 9).

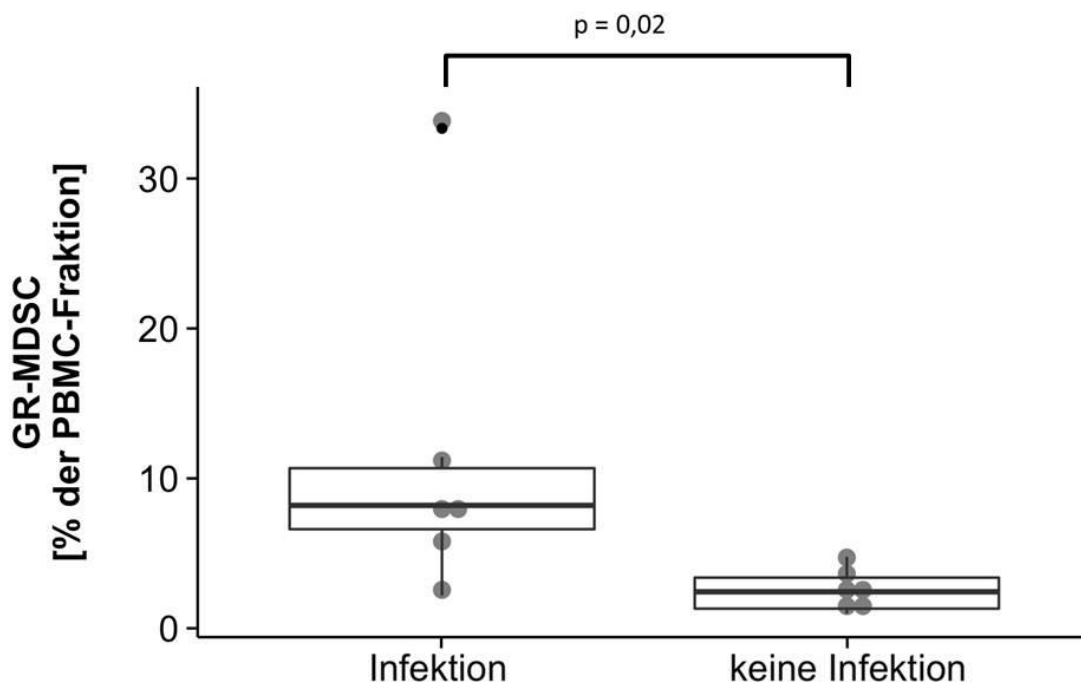


Abbildung 9: Der Anteil an GR-MDSC im peripheren Blut ist bei schweren postnatalen Infektionen erhöht

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Frühgeborener mit und ohne schwerer nosokomialer Infektion isoliert und der Anteil CD66b⁺/CD33⁺/HLA-

DR^{low/-} GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Das Punktdiagramm stellt Median und Interquartilsabstand dar (n = 6, Wilcoxon matched-pairs Signed Rank Test).

Außerdem wurde untersucht, ob die erhöhten GR-MDSC-Zahlen nach Ausheilen der Erkrankung wieder abfielen. Dazu wurde der Anteil GR-MDSC im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Erkrankung mit dem GR-MDSC-Anteil zum Zeitpunkt der Entlassung des Kindes verglichen, sofern keine intensivmedizinische Nachbetreuung der Kinder, wie z.B. Heimbeatmung oder stationäre Wiederaufnahme, notwendig war.

Es zeigte sich, dass der Anteil an GR-MDSC zum Zeitpunkt der Erkrankung (8,87%; 6,76; n = 6) höher war als zum Zeitpunkt der Entlassung (0,44%; 0,67; n = 6; Abbildung 10).

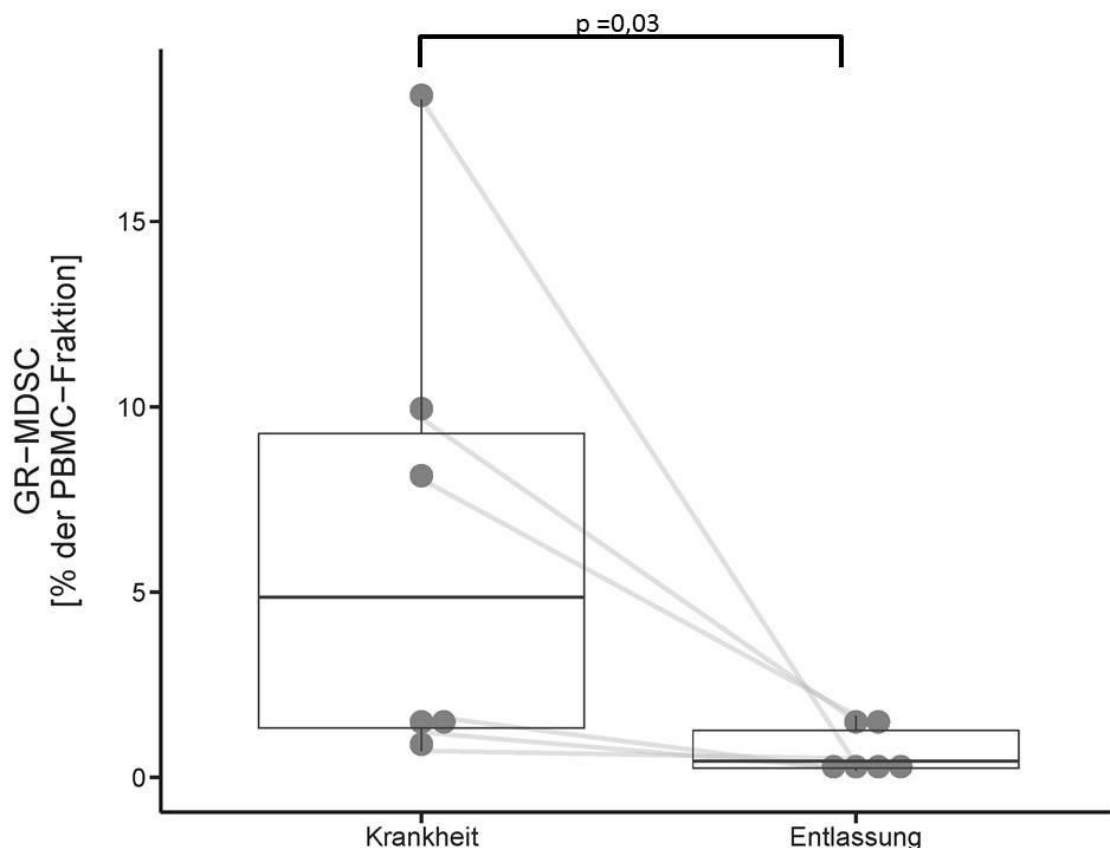


Abbildung 10: Die zum Zeitpunkt der Erkrankung erhöhten GR-MDSC fallen danach signifikant ab

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Frühgeborener mit schwerer nosokomialer Infektion während und nach der Erkrankung isoliert und der Anteil CD66b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{low}- GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Das Punktdiagramm stellt Median und Interquartilsabstand dar (n = 6, p <0,05; Wilcoxon matched-pairs Signed Rank Test).

5.4.3 GR-MDSC bei erkrankten nicht intensivpflichtigen Reifgeborenen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Erkrankungen einen Einfluss auf den Verlauf der GR-MDSC bei schwer kranken Frühgeborenen hatten, sollte nun auch geklärt werden, ob ein ähnlicher Verlauf bei reif geborenen nicht intensivpflichtigen Kindern beobachtet werden kann. Dazu wurden nicht intensivpflichtige Kinder mit Infektion und ohne Infektion mit einander verglichen. (Abbildung 11: GR-MDSC: erkrankte Reifgeborene 3.6%; 12,57; n = 11 vs. gesunde Reifgeborene 2.2%; 4,24; n = 7; p > 0,05).

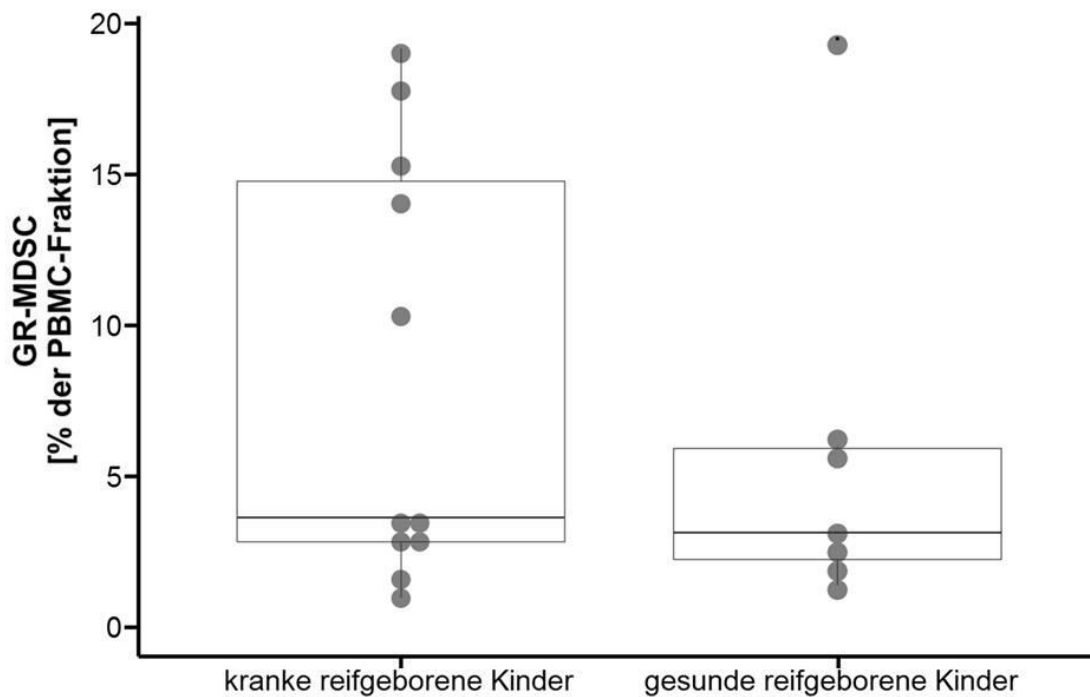


Abbildung 11: Es bestand kein Unterschied zwischen den GR-MDSC gesunder reifgeborener Kinder und kranker reifgeborener Kinder

Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut Neugeborener mit Infektion und Neugeborener ohne Infektion isoliert und der Anteil CD66b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{low}- GR-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Das Punktdiagramm stellt Median und Interquartilsabstand dar. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests. (GR-MDSC: erkrankte Reifgeborene 3.6%; 12,57; n = 11 vs. gesunde Reifgeborene 2.2%; 4,24; n = 7; p > 0,05)

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit durchgeführten Pilot-Studie konnte gezeigt werden, dass (1) der GR-MDSC-Anteil im NSB unabhängig vom Gestationsalter erhöht war, dass (2) nach Spontangeburt höhere GR-MDSC-Zahlen im NSB zu finden waren als nach Sectio, dass (3) der GR-MDSC-Anteil im peripheren Blut bei gesunden Frühgeborenen über die ersten Lebenswochen erhöht blieb und erst nach dem 21. Lebenstag abfiel und, dass (4) neonatale Infektionen zu einer Akkumulation von GR-MDSC führten. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

6.1 GR-MDSC im Nabelschnurblut

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits darlegen, dass GR-MDSC im NSB Termingeborener in deutlich höherer Zahl vorkommen als im peripheren Blut älterer Kinder und die Funktion von T- und NK-Zellen effektiv unterdrücken können (Rieber et al. 2013). Diese Ergebnisse wurden erst kürzlich von Gervassi et al. bestätigt (Gervassi et al. 2014). Hier konnte nun gezeigt werden, dass GR-MDSC auch im NSB Frühgeborener in erhöhter Zahl vorkommen und deren Zahl unabhängig vom Gestationsalter ist (siehe Abbildung 3). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GR-MDSC eine Bedeutung für die fetale Immunregulation während der gesamten Schwangerschaft haben könnten und sie möglicherweise dazu beitragen, den Fetus vor einer Abstoßungsreaktion durch den mütterlichen Organismus zu schützen. Die unverändert hohen Zahlen von GR-MDSC im NSB über die Gestation hinweg stehen im Einklang mit Daten aus dem peripheren Blut Schwangerer, die unsere Arbeitsgruppe bereits publizierte (Kostlin et al. 2014). Auch im Schwangerenblut kommen GR-MDSC über die gesamte Gestation hinweg in erhöhter Zahl vor und können T-Zell-Funktionen effektiv hemmen (Kostlin et al. 2014). Damit liegt die Vermutung nahe, dass GR-MDSC sowohl auf mütterlicher als auch auf kindlicher Seite zur Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz beitragen.

6.2 GR-MDSC-Zahlen und Geburtsmodus

Entgegen der aufgestellten Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass die GR-MDSC-Zahl im NSB nach Spontangeburt im Vergleich zur Geburt nach Sectio erhöht war (siehe Abbildung 4). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die GR-MDSC-Zahl im NSB über einen – im Vergleich zur Regulation über die gesamte Gestation hinweg – relativ kurzen Zeitraum hinweg reguliert werden kann und der Geburtsvorgang entsprechende Signale vermittelt.

Bereits vor über 10 Jahren wurde der Geburtsvorgang als entzündlicher Prozess beschrieben (Osman et al. 2003). So konnte das Vorhandensein von Wehentätigkeit mit erhöhter Leukozytenzahl im Uterusgewebe, also auf mütterlicher Seite, in Verbindung gebracht werden (Osman et al. 2003, Norman et al. 2007). Für verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche MDSC induzieren können, wurde ein erhöhtes Vorkommen im Nabelschnurblut beschrieben (Bharathi et al. 2014, Gedikbasi et al. 2014, Bunt et al. 2007). Im Hinblick auf die natürliche Geburt sind besonders die Interleukine IL-1 β und IL-6 von Bedeutung, die unter Wehen sowohl im mütterlichen Gewebe als auch im Chorion, also auf kindlicher Seite und im NSB signifikant erhöht sind (Osman et al. 2006, Osman et al. 2003, Gedikbasi et al. 2014). IL-1 β erhöht während der Geburt den Calciumeinstrom in das Myometrium und fördert über Prostaglandin F2 α die Uteruskontraktion. Auf diese Weise trägt es aktiv zur natürlichen Entbindung bei (Rauk and Chiao 2000). Es ist wahrscheinlich, dass der peripartale MDSC-Anstieg und die Weheninduktion über Vermittlung durch IL-1beta direkt mit einander gekoppelt sind. IL-1beta wird unter anderem von T-Gedächtniszellen gebildet, die sich bei Wehentätigkeit im Choriodezidualraum ansammeln (Gomez-Lopez et al. 2013, Gomez-Lopez and Laresgoiti-Servitje 2012). Möglicherweise dienen MDSC in diesem Prozess als anti-inflammatorische Regulatoren.

6.3 GR-MDSC im postnatalen Verlauf bei gesunden Frühgeborenen

Im Hinblick auf den unmittelbar postnatalen Verlauf konnten wir im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass der Anteil GR-MDSC im peripheren Blut gesunder Frühgeborener während der ersten drei Lebenswochen erhöht bleibt und erst nach dem 20. Lebenstag abnimmt (siehe Abbildung 5). Damit werden Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe ergänzt, die einen Rückgang der mittleren MDSC-Zahlen im Blut von Säuglingen im ersten Lebensjahr von erhöhten Werten im NSB auf das Niveau im peripheren Blut Erwachsener demonstrierten (Rieber et al. 2013). Die in der aktuellen Arbeit vorgelegten Daten zeigen eindrucksvoll, dass die Adaptation der im NSB erhöhten MDSC-Zahlen sehr rasch nach der Geburt erfolgt. Gervassi et al. zeigten ebenfalls für gesunde Kinder im Alter von 6 Wochen deutlich geringere GR-MDSC-Zahlen als im NSB gesunder Reifgeborener (Gervassi et al. 2014).

Die quantitative Adaptation von vermehrt vorkommenden immunsuppressiv wirkenden Immuneffektorzellen im NSB an das adulte Niveau wurde bereits für einen weiteren Zelltyp beschrieben. Elahi et al. identifizierten kürzlich suppressiv wirkende CD71⁺ erythroide Zellen im menschlichen NSB und bei neugeborenen Mäusen. Es erwies sich, dass sie die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine hemmen. Im Mausmodell führte dies auf der einen Seite zur Anfälligkeit gegenüber perinatalen Pathogenen wie *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* (Elahi et al. 2013). Andererseits scheinen die CD71⁺-Zellen aber auch entscheidend für den Schutz des Neugeborenen vor überschießenden Immunreaktionen während des postnatalen Auf- und Umbaus des physiologischen Darm-Mikrobioms zu sein (Elahi et al. 2013, Elahi 2014). Möglicherweise haben immunsuppressiv wirkende GR-MDSC also nicht nur eine Funktion beim feto-maternalen Toleranzerhalt sondern postnatal weiter immunregulative Funktion.

In der vorliegenden Studie wurden postnatale Blutproben nur von Frühgeborenen, nicht aber von reifgeborenen Kindern untersucht. Weitere Untersuchungen müssen nun klären, ob Unterschiede bestehen in der Dauer bis zur Abnahme der MDSC-Zahlen und in der GR-MDSC-Funktion bei Früh- und

Reifgeborenen.

6.4 MDSC bei neonatalen Infektionen

Um Hinweise über die Rolle von GR-MDSC bei neonatalen Infektionen zu erhalten, wurde NSB von Neugeborenen mit AIS und peripheres Blut von Frühgeborenen mit neonateler Sepsis untersucht. Dabei ergab sich, dass der Anteil von GR-MDSC sowohl bei Kindern mit AIS als auch bei intensivpflichtigen Kindern mit neonateler Sepsis im Vergleich zu gesunden Kindern erhöht war (siehe Abbildung 8, Abbildung 9 und Abbildung 10). Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen überein, die sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen darstellen konnten, dass MDSC im Rahmen einer Sepsis in erhöhter Zahl vorkommen (Darcy et al. 2014, Janols et al. 2014, Delano et al. 2007, Brudecki et al. 2012).

Während sich die Akkumulation von MDSC bei proliferativen Erkrankungen eher negativ auf den Krankheitsverlauf auszuwirken scheint (Kusmartsev et al. 2004, Ortiz et al. 2014), können MDSC im Rahmen von Infektionsgeschehen einen protektiven Effekt auf den Verlauf haben (Fortin et al. 2012, Arocena et al. 2014, Cuenca et al. 2011). So zeigte sich zum Beispiel, dass septische Mäuse nach Depletion von MDSC deutlich schlechter überlebten (Cuenca et al. 2011, Arocena et al. 2014). Im Rahmen einer Sepsis kommt es aufgrund des gesteigerten Bedarfs an Immunzellen zu einer sogenannten Notfallgranulopoese (Cuenca et al. 2011). Dabei werden Zytokine ausgeschüttet, welche die Ausreifung von MDSC zu reifen myeloiden Zellen hemmen (Ostrand-Rosenberg and Sinha 2009, Sander et al. 2010) und damit eine Akkumulation von MDSC bewirken können. Interessanterweise konnten Brudecki et al. zeigen, dass sich das biologische Verhalten von MDSC im Verlauf einer Sepsis verändert: Während MDSC zu Beginn einer Sepsis ein proinflammatorisches Zytokin-Milieu induzieren, wirken sich MDSC im späteren Verlauf der Sepsis eher antiinflammatorisch auf das Geschehen aus (Brudecki et al. 2012). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Phänotyp von MDSC und deren Aktivität stark von den Umgebungsbedingungen, unter denen sie akkumulieren, abhängt.

Das AIS bzw. die neonatale Sepsis stellt in dieser Hinsicht einen ganz besonderen immunologischen Zustand dar. Das Neu- bzw. Frühgeborene kommt aus einem Milieu, in dem die Hauptanforderung an das Immunsystem die Toleranzinduktion und der Schutz vor einer Abstoßung durch den mütterlichen Organismus ist. Im Rahmen von peri- bzw. postnatalen Infektionen muss dieses Immunsystem dann trotzdem in der Lage sein, proinflammatorische Antworten zu generieren, um die Erreger adäquat abzuwehren. Unsere Arbeiten legten dar, dass, trotz der bereits vorbestehenden erhöhten Anzahl von GR-MDSC im NSB bzw. im peripheren Blut von Frühgeborenen, es im Rahmen von Infektionen zu einer weiteren Expansion dieser Zellpopulation kommt. Noch ist jedoch nicht untersucht, wie diese Zellen sich dabei funktionell verhalten.

Bei nicht intensivpflichtigen Neugeborenen mit Infektion ließ sich die oben dargelegte Korrelation zwischen erhöhtem GR-MDSC-Anteil und Vorliegen einer Infektion nicht bestätigen (siehe Abbildung 11). Möglicherweise ist dies auf die möglichst früh zu beginnende, effektive Sepsistherapie (Du Pont-Thibodeau et al. 2014) und den initial vergleichsweise guten klinischen Zustand der Kinder zurückzuführen. Eine generalisierte Inflammationsreaktion und damit eine GR-MDSC-Vermehrung könnten dadurch verhindert worden sein. Im Moment liegen allerdings keine Daten vor die diese These näher beleuchten.

6.5 Diskussion der Methode

Eine Schwierigkeit bei der Interpretation der Ergebnisse zu den GR-MDSC-Zahlen im NSB ist, dass im Unterschied zu den termingeborenen Kindern bei allen Frühgeborenen irgendeine Art von mütterlicher oder kindlicher Pathologie vorlag, welche die Frühgeburtlichkeit bedingte. Aufgrund des gezeigten Einflusses des Geburtsmodus wurde für die übrigen Analysen nur NSB von Kindern verwendet, welche per primärer Sectio und ohne dem Einfluss eines AIS entbunden wurden. Inwieweit jedoch andere Ursachen der Frühgeburtlichkeit, wie beispielsweise eine intrauterine Wachstumsretardierung oder Präeklampsie den Anteil von GR-MDSC im NSB beeinflussen bleibt unklar. Des Weiteren sind in der hier untersuchten Stichprobe von Frühgeborenen und Neugeborenen die

extrem Frühgeborenen gegenüber den moderat Frühgeborenen unterrepräsentiert. Dies erklärt sich einerseits durch die allgemein geringere Inzidenz solch geringer Gestationsalter (Blencowe et al. 2012) andererseits durch die wesentlich restriktivere Indikationsstellung zur Entbindung dieser Kinder und des damit häufiger bereits eingesetzten spontanen Geburtsbeginns.

Für die Gruppe der gesunden Frühgeborenen wurden Proben von Kindern ohne schwerere neonatologische Komplikationen wie Atemnotsyndrom (ANS), schwere Apnoen, BPD, IVH, PVL, Nekrotisierende Enterokolitis (NEC), fokale intestinale Perforation (FIP), Sepsis, schwere behandlungspflichtige Kreislaufinsuffizienz oder medikamentöse Therapie eines persistierenden Ductus arteriosus zum Zeitpunkt der Blutentnahme verwendet. Ein späteres Auftreten von Komplikationen wurde jedoch nicht berücksichtigt. Für die Betrachtung der Frühgeborenen mit schwerer Infektion wurde zur Beurteilung des Verlaufs der GR-MDSC-Zahlen der Zeitpunkt der Entlassung als Zeitpunkt voller Gesundheit angenommen, sofern keine Notwendigkeit für Heimbeatmung oder andere invasive Maßnahmen bestand. Eine Kontrolle des Weiteren klinischen Verlaufes erfolgte jedoch nicht. Des Weiteren standen einige der Kinder der Gruppe „Frühgeborene mit schwerer postnataler Infektion“ unter der medikamentösen Behandlung mit Antibiotika und z.T. auch mit anderen Medikamenten, wie z.B. kreislaufunterstützende Therapie. Einige dieser Kinder waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme maschinell beatmet. Ein Einfluss dieser Parameter auf die GR-MDSC-Zahlen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Für die Diagnosestellung eines AIS wurden die klassischen klinischen Parameter mütterliches Fieber, Tachykardie, Leukozytose, schmerzhafter Uterus und fötide riechendes Fruchtwasser herangezogen (Buhimschi et al. 2013). Eine histologische Diagnosesicherung erfolgte nicht. Zu beachten ist, dass diese Kriterien nicht spezifisch für ein AIS sind und auch von anderen Erkrankungen wie z.B. Pyelonephriten oder Appendizitiden ausgelöst werden können (Buhimschi et al. 2013). In diesem Sinne ist von einer heterogenen Gruppe auszugehen.

Dies gilt ebenfalls für die Untersuchungen an reifgeborenen Kindern mit Infektion. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass Teile der erkrankten reifgeborenen

Kinder dieser Studie eine Antibiotikatherapie erhielten, um die möglicherweise schweren Komplikationen einer zu spät behandelten Sepsis zu verhindern (Du Pont-Thibodeau et al. 2014, Bracci and Buonocore 2003), obwohl lediglich ein schwacher Verdacht auf eine infektiologische Erkrankung hindeutete.

Es wurden ausschließlich Blutproben verwendet, die bis maximal 24 Stunden vor Analyse abgenommen wurden. Unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass sich in dieser Zeitspanne der Anteil CD66b positiver Zellen an der PBMC-Fraktion nicht signifikant verändert. Die Blutproben für die vorliegende Studie stammten ausnahmslos aus Routineblutabnahmen und klinisch indizierten Blutabnahmen. Daraus ergab sich das Problem der sehr geringen Probengröße von meist unter 200 µl. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Probenmenge keinen Einfluss auf den prozentualen GR-MDSC-Anteil an der PBMC-Fraktion hat. Aufgrund der sehr geringen Probenmenge konnte nicht ausreichend Material gewonnen werden, um funktionelle Analysen durchzuführen. Daher beschränken sich alle in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse auf quantitative Aussagen.

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es beim Menschen keine einheitliche Charakterisierung von MDSC. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Charakterisierung von GR-MDSC über die Oberflächenmarker CD66b, CD33, HLA-DR und CD14 ist eine in der Literatur häufig verwendete Methode (Brandau et al. 2011, Rodriguez et al. 2009, Rieber et al. 2013, Kostlin et al. 2014). Aufgrund der geringen Probenmenge musste auf die Analyse anderer MDSC-assoziiertes Oberflächenmarker wie CD15 (Mandrizzato et al. 2009), CD11b (Rodriguez et al. 2009), CD16 (Brandau et al. 2011), CXCR4 (Obermajer et al. 2011) oder IL4Ralpha (Mandrizzato et al. 2009) verzichtet werden.

6.6 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse können als Ausgangspunkt für weitere Fragestellungen dienen. Die Gestationsalter-unabhängige Akkumulation von GR-MDSC im Nabelschnurblut und der charakteristische Abfall der GR-MDSC-Zahlen über die Neonatalzeit hinweg stellen die Frage nach den

Regulationsmechanismen der MDSC.

Mehrere Ansatzpunkte sind in dieser Hinsicht interessant. Dabei kommen zum einen Umgebungsfaktoren in Betracht, sowie die Interaktion mit anderen Immuneffektorzellen.

In Utero befindet sich der kindliche Organismus im Vergleich zum adulten Organismus in einem Zustand des niedrigen Sauerstoffpartialdrucks (Webster and Abela 2007, Brouillette and Waxman 1997), der postnatal rasch ansteigt. In Mausmodellen zur Untersuchung von MDSC bei Tumorerkrankungen konnte gezeigt werden, dass Hypoxie – vermittelt über HIF1alpha – zu einer Aktivierung von MDSC beiträgt (Corzo et al. 2010, Noman et al. 2014). Ob der Sauerstoffpartialdruck eine regulative Rolle für die MDSC-Zahl und Funktion spielt, sollte weiter untersucht werden.

Auch die Wechselwirkung mit erythroiden Zellen könnte für die MDSC-Akkumulation und -Funktion eine Rolle spielen. Erythroide Zellen werden wie MDSC unter anderem von TGFbeta induziert (Yang et al. 2008, Seledtsov et al. 1998) und produzieren eine Vielzahl verschiedene Zytokine und Interleukine unter anderem IL-1beta und IL-6 (Sennikov et al. 2004). Eventuell sind CD71⁺ Zellen auf diese Weise direkt an der MDSC-Akkumulation beteiligt und können synergistisch wirken.

In Bezug auf die Wirkung von MDSC wäre es außerdem von Interesse, ob MDSC an der Aufrechterhaltung des neonatalen Funktionszustandes des Immunsystems beteiligt sind. Die neonatale Immunantwort ist im Vergleich zu Erwachsenen unter anderem durch eine Polarisierung der T-Zell-Antwort in Richtung Th2/Th17 und eine Prädominanz antiinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet (Cuenca et al. 2011). Zu den von Th2-Zellen produzierten Zytokinen zählen unter anderem IL-10 (Ng et al. 2013) und IL-13 (Terabe et al. 2004). Für diese Zytokine konnte gezeigt werden, dass sie die Expansion und Aktivierung von MDSC induzieren können (Huang et al. 2006, Terabe et al. 2003, Gabilovich and Nagaraj 2009, Cuenca et al. 2011). Umgekehrt scheinen MDSC die Expansion von Th2-Zellen zu fördern (Sinha et al. 2007, Delano et al. 2007).

Ob der postnatal erhöhte Anteil von GR-MDSC im peripheren Blut die Polarisierung des neonatalen Immunsystems in Richtung Th2 und damit die erhöhte Anfälligkeit des Neonaten insbesondere für intrazelluläre Erreger mit bedingt, sollte weiter untersucht werden (Geyer et al. 2014).

Im Hinblick auf die immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung von MDSC wäre es außerdem interessant zu ermitteln, ob und wie die Anzahl und Funktion von MDSC mit dem Auftreten von Inflammationserkrankungen des Frühgeborenen, wie der BPD und PVL variieren.

6.7 Schlussfolgerungen

Die hier vorgestellten Daten zeigen einen charakteristischen Verlauf der Anzahl von GR-MDSC im NSB und peripheren Blut von Frühgeborenen während der Neonatalzeit. Einflussgrößen sind der Geburtsmodus und das Auftreten von Infektionen. Damit konnten Parallelen zu anderen immunsuppressiv wirkenden Immuneffektorzellen im NSB aufgedeckt werden, die weiter untersucht werden sollten. Die hier vorgestellten Daten sind ein weitere Hinweis darauf, dass MDSC für die feto-maternale Toleranz wichtig sein könnten und zeigen erstmals, dass auch postnatal eine Rolle für die Immunregulation angenommen werden kann.

.

7 Zusammenfassung

Granulozytäre myeloide Suppressorzellen (GR-MDSC) bei Früh- und Neugeborenen stellen einen bisher wenig verstandenen immunologischen Regulationsmechanismus dar. Ziel dieser Arbeit war es, Aufschluss über das Verhalten der GR-MDSC im Nabelschnurblut, postnatal und bei infektiologischen Erkrankungen zu erhalten. Um diese Fragestellungen zu klären, wurden nach schriftlichem Einverständnis der Eltern aus Resten indizierter Blutabnahmen myeloide Zellen aufgereinigt. Mittels Färbung durch fluoreszierende oberflächenspezifische Antikörper und Messung durch Fluorescence-activated cell sorting (FACS-Zellsortierung) wurde dann der prozentuale Anteil der GR-MDSC an den myeloiden Zellen bestimmt.

Die Vermutung, dass GR-MDSC bei der Geburt erhöht sind und dann abfallen, konnte bestätigt werden. Außerdem zeigte sich, dass GR-MDSC im NSB zwar vom Geburtsmodus, nicht jedoch vom Gestationsalter abhängen, und bei der natürlichen Geburt höher lagen als bei primären Sectiones. Im postnatalen Verlauf waren die GR-MDSC im peripheren Blut nach der Geburt bis zum 20. Lebensjahr signifikant erhöht gegenüber den Werten nach dem 20. Lebensjahr. Beispielhaft für viele infektiologische Erkrankungen wurden das AIS und die sekundäre Infektion als häufig vorkommende Komplikationen ausgewählt und weiter untersucht. Lag ein AIS vor, so hatten die betroffenen Kinder signifikant mehr GR-MDSC im NSB als die gesunde Kontrollgruppe. Schwerkranke Frühgeborene, mit zum Zeitpunkt der Erkrankung erhöhten GR-MDSC, hatten nach ihrer Genesung Werte, die denen ihrer gesunden Altersgenossen entsprachen.

Pränatal schienen die GR-MDSC erst durch den Geburtsverlauf getriggert zu werden, eventuell durch den entzündlichen Charakter des Geburtsverlaufs selbst oder andere mit ihm in Zusammenhang stehende Regulationsmechanismen. Der postnatale Verlauf lässt sich als Adaptation des zuerst noch unreifen neugeborenen Immunsystems an die neue Umgebung interpretieren. Die im Rahmen von Infektionen gesehenen Veränderungen bestätigen Ergebnisse

vorangegangener Studien bei anderen infektiologischen Erkrankungen, die einen starken Anstieg im Rahmen entzündlicher Prozesse feststellten.

Die gewonnenen Ergebnisse tragen zum Verständnis der Besonderheiten des fetalen und neonatalen Immunsystems bei. Insbesondere sollte diese Arbeit zum besseren Verständnis von Veränderungen im Rahmen von Infektionen (Amnioninfektionssyndrom, Early Onset Sepsis, Late Onset Sepsis) beitragen, die wichtige Risikofaktoren für die Periventrikuläre Leukomalazie (PVL), die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) und die Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) sind. Eine spezielle Untersuchung der GR-MDSC bei der PVL, der BPD und der NEC erfolgte jedoch nicht und stellt insofern einen möglichen Anknüpfungspunkt für weitere Forschungsarbeit dar.

8 Literaturverzeichnis

- Ali, K., and A. Greenough. 2012. "Long-term respiratory outcome of babies born prematurely." *Thorax* 69 (2):115-20. doi: 10.1177/1753465812436803.
- Andrews, W. W., J. C. Hauth, and R. L. Goldenberg. 2000. "Infection and preterm birth." *Am J Perinatol* 17 (7):357-65. doi: 10.1055/s-2000-13448.
- Arocena, A. R., L. I. Onofrio, A. V. Pellegrini, A. E. Carrera Silva, A. Paroli, R. C. Cano, M. P. Aoki, and S. Gea. 2014. "Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection." *Eur J Immunol* 44 (1):184-94. doi: 10.1002/eji.201343606.
- Bharathi, B., B. V. Bhat, V. S. Negi, and B. Adhisivam. 2014. "Inflammatory Mediators as Predictors of Outcome in Perinatal Asphyxia." *Indian J Pediatr*. doi: 10.1007/s12098-014-1575-4.
- Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway." *J Immunol* 160 (12):5729-34.
- Black, R. E., S. Cousens, H. L. Johnson, J. E. Lawn, I. Rudan, D. G. Bassani, P. Jha, H. Campbell, C. F. Walker, R. Cibulskis, T. Eisele, L. Liu, and C. Mathers. 2010. "Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis." *Lancet* 375 (9730):1969-87. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60549-1.
- Blencowe, H., S. Cousens, M. Z. Oestergaard, D. Chou, A. B. Moller, R. Narwal, A. Adler, C. Vera Garcia, S. Rohde, L. Say, and J. E. Lawn. 2012. "National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications." *Lancet* 379 (9832):2162-72. doi: 10.1016/s0140-6736(12)60820-4.
- Boghossian, N. S., G. P. Page, E. F. Bell, B. J. Stoll, J. C. Murray, C. M. Cotten, S. Shankaran, M. C. Walsh, A. R. Lupton, N. S. Newman, E. C. Hale, S. A. McDonald, A. Das, and R. D. Higgins. 2013. "Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births." *J Pediatr* 162 (6):1120-4, 1124.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.11.089.
- Boyum, A. 1968. "Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97:7.
- Boyum, A. 1977. "Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review." *Lymphology* 10 (2):71-6.

- Bracci, R., and G. Buonocore. 2003. "Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity." *Biol Neonate* 83 (2):85-96. doi: 67956.
- Brandau, S., S. Trellakis, K. Bruderek, D. Schmaltz, G. Steller, M. Elian, H. Suttman, M. Schenck, J. Welling, P. Zabel, and S. Lang. 2011. "Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties." *J Leukoc Biol* 89 (2):311-7. doi: 10.1189/jlb.0310162.
- Brouillette, R. T., and D. H. Waxman. 1997. "Evaluation of the newborn's blood gas status. National Academy of Clinical Biochemistry." *Clin Chem* 43 (1):215-21.
- Brudecki, L., D. A. Ferguson, C. E. McCall, and M. El Gazzar. 2012. "Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response." *Infect Immun* 80 (6):2026-34. doi: 10.1128/iai.00239-12.
- Buessow, S. C., R. D. Paul, and D. M. Lopez. 1984. "Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice." *J Natl Cancer Inst* 73 (1):249-55.
- Buhimschi, I. A., U. A. Nayeri, C. A. Laky, S. A. Razeq, A. T. Dulay, and C. S. Buhimschi. 2013. "Advances in medical diagnosis of intra-amniotic infection." *Expert Opin Med Diagn* 7 (1):5-16. doi: 10.1517/17530059.2012.709232.
- Bunt, S. K., L. Yang, P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* 67 (20):10019-26. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-2354.
- Corzo, C. A., T. Condamine, L. Lu, M. J. Cotter, J. I. Youn, P. Cheng, H. I. Cho, E. Celis, D. G. Quiceno, T. Padhya, T. V. McCaffrey, J. C. McCaffrey, and D. I. Gabrilovich. 2010. "HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment." *J Exp Med* 207 (11):2439-53. doi: 10.1084/jem.20100587.
- Cuenca, A. G., M. J. Delano, K. M. Kelly-Scumpia, C. Moreno, P. O. Scumpia, D. M. Laface, P. G. Heyworth, P. A. Efron, and L. L. Moldawer. 2011. "A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma." *Mol Med* 17 (3-4):281-92. doi: 10.2119/molmed.2010.00178.
- Darcy, C. J., G. Minigo, K. A. Piera, J. S. Davis, Y. R. McNeil, Y. Chen, A. D. Volkheimer, J. B. Weinberg, N. M. Anstey, and T. Woodberry. 2014. "Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients." *Crit Care* 18

(4):R163. doi: 10.1186/cc14003.

Delano, M. J., P. O. Scumpia, J. S. Weinstein, D. Coco, S. Nagaraj, K. M. Kelly-Scumpia, K. A. O'Malley, J. L. Wynn, S. Antonenko, S. Z. Al-Quran, R. Swan, C. S. Chung, M. A. Atkinson, R. Ramphal, D. I. Gabrilovich, W. H. Reeves, A. Ayala, J. Phillips, D. Laface, P. G. Heyworth, M. Clare-Salzler, and L. L. Moldawer. 2007. "MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis." *J Exp Med* 204 (6):1463-74. doi: 10.1084/jem.20062602.

Du Pont-Thibodeau, G., J. S. Joyal, and J. Lacroix. 2014. "Management of neonatal sepsis in term newborns." *F1000Prime Rep* 6:67. doi: 10.12703/p6-67.

Duffy, A., F. Zhao, L. Haile, J. Gamrekashvili, S. Fioravanti, C. Ma, T. Kapanadze, K. Compton, W. D. Figg, and T. F. Greten. 2013. "Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies." *Cancer Immunol Immunother* 62 (2):299-307. doi: 10.1007/s00262-012-1332-3.

Elahi, S. 2014. "New insight into an old concept: role of immature erythroid cells in immune pathogenesis of neonatal infection." *Front Immunol* 5:376. doi: 10.3389/fimmu.2014.00376.

Elahi, S., J. M. Ertelt, J. M. Kinder, T. T. Jiang, X. Zhang, L. Xin, V. Chaturvedi, B. S. Strong, J. E. Qualls, K. A. Steinbrecher, T. A. Kalfa, A. F. Shaaban, and S. S. Way. 2013. "Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection." *Nature* 504 (7478):158-62. doi: 10.1038/nature12675.

Faust, K., M. Demmert, M. Bendiks, W. Gopel, E. Herting, and C. Hartel. 2012. "Intrapartum colonization with *Streptococcus pneumoniae*, early-onset sepsis and deficient specific neonatal immune responses." *Arch Gynecol Obstet* 285 (3):599-604. doi: 10.1007/s00404-011-2020-9.

Fortin, C., X. Huang, and Y. Yang. 2012. "NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells." *J Immunol* 189 (4):1843-9. doi: 10.4049/jimmunol.1200584.

Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." *Nat Rev Immunol* 9 (3):162-74. doi: 10.1038/nri2506.

Gedikbasi, A., X. f Lu O. Saliho, A. Cankaya, V. Arica, C. Akkus, X. f Lu S. Hatipo, and L. Yasar. 2014. "The evaluation of cord blood interleukin-1beta levels in normal and caesarean deliveries." *Hum Exp Toxicol*. doi:

10.1177/0960327113499049.

- Gervassi, A., N. Lejarcegui, S. Dross, A. Jacobson, G. Itaya, E. Kidzeru, S. Gantt, H. Jaspan, and H. Horton. 2014. "Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses." *PLoS One* 9 (9):e107816. doi: 10.1371/journal.pone.0107816.
- Geyer, M. B., K. Radhakrishnan, C. Van de Ven, M. S. Suri, J. Ayello, and M. S. Cairo. 2014. "Enhanced survival during experimental *Listeria monocytogenes* sepsis in neonatal mice prophylactically treated with Th1 and macrophage immunoregulatory cytokines and mediators." *Pediatr Infect Dis J* 33 (12):e330-7. doi: 10.1097/inf.0000000000000442.
- Goldenberg, R. L., J. F. Culhane, J. D. Iams, and R. Romero. 2008. "Epidemiology and causes of preterm birth." *Lancet* 371 (9606):75-84. doi: 10.1016/s0140-6736(08)60074-4.
- Gomez-Lopez, N., and E. Laresgoiti-Servitje. 2012. "T regulatory cells: regulating both term and preterm labor?" *Immunol Cell Biol* 90 (10):919-20. doi: 10.1038/icb.2012.48.
- Gomez-Lopez, N., R. Vega-Sanchez, M. Castillo-Castrejon, R. Romero, K. Cubeiro-Arreola, and F. Vadillo-Ortega. 2013. "Evidence for a role for the adaptive immune response in human term parturition." *Am J Reprod Immunol* 69 (3):212-30. doi: 10.1111/aji.12074.
- Greten, T. F., M. P. Manns, and F. Korangy. 2011. "Myeloid derived suppressor cells in human diseases." *Int Immunopharmacol* 11 (7):802-7. doi: 10.1016/j.intimp.2011.01.003.
- Harari, O., and J. K. Liao. 2004. "Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants." *Curr Pharm Des* 10 (8):893-8.
- Hartel, C., K. Faust, S. Avenarius, B. Bohnhorst, M. Emeis, C. Gebauer, P. Groneck, F. Heitmann, T. Hoehn, M. Hubert, A. Kribs, H. Kuster, R. Laux, M. Mogel, D. Muller, D. Olbertz, C. Roll, J. Siegel, A. Stein, M. Vochem, U. Weller, A. von der Wense, C. Wieg, J. Wintgens, C. Hemmelmann, A. Simon, E. Herting, and W. Gopel. 2012. "Epidemic microclusters of blood-culture proven sepsis in very-low-birth weight infants: experience of the German Neonatal Network." *PLoS One* 7 (6):e38304. doi: 10.1371/journal.pone.0038304.
- Holcroft, C. J., K. J. Blakemore, M. Allen, and E. M. Graham. 2003. "Association of prematurity and neonatal infection with neurologic morbidity in very low birth weight infants." *Obstet Gynecol* 101 (6):1249-53.
- Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino, and S. H. Chen. 2006. "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells

mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* 66 (2):1123-31. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-1299.

Janols, H., C. Bergenfelz, R. Allaoui, A. M. Larsson, L. Ryden, S. Bjornsson, S. Janciauskiene, M. Wullt, A. Bredberg, and K. Leandersson. 2014. "A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases." *J Leukoc Biol*. doi: 10.1189/jlb.5HI0214-074R.

Jessup, J. M., S. J. Le Grue, B. D. Kahan, and N. R. Pellis. 1985. "Induction of suppressor cells by a tumor-derived suppressor factor." *Cell Immunol* 93 (1):9-25.

Kostlin, N., H. Kugel, B. Spring, A. Leiber, A. Marme, M. Henes, N. Rieber, D. Hartl, C. F. Poets, and C. Gille. 2014. "Granulocytic myeloid-derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T- cell responses." *Eur J Immunol*. doi: 10.1002/eji.201344200.

Kusmartsev, S., and D. I. Gabrilovich. 2002. "Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression." *Cancer Immunol Immunother* 51 (6):293-8. doi: 10.1007/s00262-002-0280-8.

Kusmartsev, S., Y. Nefedova, D. Yoder, and D. I. Gabrilovich. 2004. "Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species." *J Immunol* 172 (2):989-99.

Landry, J. S., T. Chan, L. Lands, and D. Menzies. 2011. "Long-term impact of bronchopulmonary dysplasia on pulmonary function." *Can Respir J* 18 (5):265-70.

Lau, J., F. Magee, Z. Qiu, J. Hoube, P. Von Dadelszen, and S. K. Lee. 2005. "Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only." *Am J Obstet Gynecol* 193 (3 Pt 1):708-13. doi: 10.1016/j.ajog.2005.01.017.

Mandruzzato, S., S. Solito, E. Falisi, S. Francescato, V. Chiarion-Sileni, S. Mocellin, A. Zanon, C. R. Rossi, D. Nitti, V. Bronte, and P. Zanovello. 2009. "IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients." *J Immunol* 182 (10):6562-8. doi: 10.4049/jimmunol.0803831.

McCracken, S. A., C. L. Drury, H. S. Lee, and J. M. Morris. 2003. "Pregnancy is associated with suppression of the nuclear factor kappaB/IkappaB activation pathway in peripheral blood mononuclear cells." *J Reprod Immunol* 58 (1):27-47.

- Muglia, L. J., and M. Katz. 2010. "The enigma of spontaneous preterm birth." *N Engl J Med* 362 (6):529-35. doi: 10.1056/NEJMra0904308.
- Nagaraj, S., K. Gupta, V. Pisarev, L. Kinarsky, S. Sherman, L. Kang, D. L. Herber, J. Schneck, and D. I. Gabrilovich. 2007. "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." *Nat Med* 13 (7):828-35. doi: 10.1038/nm1609.
- Ng, T. H., G. J. Britton, E. V. Hill, J. Verhagen, B. R. Burton, and D. C. Wraith. 2013. "Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10." *Front Immunol* 4:129. doi: 10.3389/fimmu.2013.00129.
- Noman, M. Z., G. Desantis, B. Janji, M. Hasmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte, and S. Chouaib. 2014. "PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation." *J Exp Med* 211 (5):781-90. doi: 10.1084/jem.20131916.
- Norman, J. E., S. Bollapragada, M. Yuan, and S. M. Nelson. 2007. "Inflammatory pathways in the mechanism of parturition." *BMC Pregnancy Childbirth* 7 Suppl 1:S7. doi: 10.1186/1471-2393-7-s1-s7.
- Obermajer, N., R. Muthuswamy, K. Odunsi, R. P. Edwards, and P. Kalinski. 2011. "PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment." *Cancer Res* 71 (24):7463-70. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-2449.
- Obregon-Henao, A., M. Henao-Tamayo, I. M. Orme, and D. J. Ordway. 2013. "Gr1(int)CD11b+ myeloid-derived suppressor cells in Mycobacterium tuberculosis infection." *PLoS One* 8 (11):e80669. doi: 10.1371/journal.pone.0080669.
- Ortiz, M. L., L. Lu, I. Ramachandran, and D. I. Gabrilovich. 2014. "Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer." *Cancer Immunol Res* 2 (1):50-8. doi: 10.1158/2326-6066.cir-13-0129.
- Osman, I., A. Young, F. Jordan, I. A. Greer, and J. E. Norman. 2006. "Leukocyte density and proinflammatory mediator expression in regional human fetal membranes and decidua before and during labor at term." *J Soc Gynecol Investig* 13 (2):97-103. doi: 10.1016/j.jsjg.2005.12.002.
- Osman, I., A. Young, M. A. Ledingham, A. J. Thomson, F. Jordan, I. A. Greer, and J. E. Norman. 2003. "Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term." *Mol Hum Reprod* 9 (1):41-5.
- Ostrand-Rosenberg, S., and P. Sinha. 2009. "Myeloid-derived suppressor cells:

- linking inflammation and cancer." *J Immunol* 182 (8):4499-506. doi: 10.4049/jimmunol.0802740.
- Pereira, N. Z., E. C. Cardoso, L. M. Oliveira, J. F. de Lima, A. C. Branco, R. M. Ruocco, M. Zugaib, J. B. de Oliveira Filho, A. J. Duarte, and M. N. Sato. 2013. "Upregulation of innate antiviral restricting factor expression in the cord blood and decidual tissue of HIV-infected mothers." *PLoS One* 8 (12):e84917. doi: 10.1371/journal.pone.0084917.
- Platt, M. J. 2014. "Outcomes in preterm infants." *Public Health* 128 (5):399-403. doi: 10.1016/j.puhe.2014.03.010.
- Pugni, L., C. Pietrasanta, B. Acaia, D. Merlo, A. Ronchi, M. W. Ossola, S. Bosari, and F. Mosca. 2015. "Chorioamnionitis and neonatal outcome in preterm infants: a clinical overview." *J Matern Fetal Neonatal Med*:1-5. doi: 10.3109/14767058.2015.1053862.
- Rauk, P. N., and J. P. Chiao. 2000. "Interleukin-1 stimulates human uterine prostaglandin production through induction of cyclooxygenase-2 expression." *Am J Reprod Immunol* 43 (3):152-9.
- Rieber, N., C. Gille, N. Kostlin, I. Schafer, B. Spring, M. Ost, H. Spieles, H. A. Kugel, M. Pfeiffer, V. Heininger, M. Alkhaled, A. Hector, L. Mays, M. Kormann, S. Zundel, J. Fuchs, R. Handgretinger, C. F. Poets, and D. Hartl. 2013. "Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses." *Clin Exp Immunol*. doi: 10.1111/cei.12143.
- Rivoltini, L., M. Carrabba, V. Huber, C. Castelli, L. Novellino, P. Dalerba, R. Mortarini, G. Arancia, A. Anichini, S. Fais, and G. Parmiani. 2002. "Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction." *Immunol Rev* 188:97-113.
- Rocha, G., E. Proenca, C. Quintas, T. Rodrigues, and H. Guimaraes. 2006. "[Chorioamnionitis and neonatal morbidity]." *Acta Med Port* 19 (3):207-12.
- Rodriguez, P. C., M. S. Ernstoff, C. Hernandez, M. Atkins, J. Zabaleta, R. Sierra, and A. C. Ochoa. 2009. "Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes." *Cancer Res* 69 (4):1553-60. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-1921.
- Rodriguez, P. C., A. H. Zea, K. S. Culotta, J. Zabaleta, J. B. Ochoa, and A. C. Ochoa. 2002. "Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine." *J Biol Chem* 277 (24):21123-9. doi: 10.1074/jbc.M110675200.
- Saigal, S., and L. W. Doyle. 2008. "An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood." *Lancet* 371 (9608):261-9. doi:

10.1016/s0140-6736(08)60136-1.

Sander, L. E., S. D. Sackett, U. Dierssen, N. Beraza, R. P. Linke, M. Muller, J. M. Blander, F. Tacke, and C. Trautwein. 2010. "Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function." *J Exp Med* 207 (7):1453-64. doi: 10.1084/jem.20091474.

Schultz, C., P. Temming, P. Bucsky, W. Gopel, T. Strunk, and C. Hartel. 2004. "Immature anti-inflammatory response in neonates." *Clin Exp Immunol* 135 (1):130-6.

Seledtsov, V. I., G. V. Seledtsova, D. M. Samarin, V. Y. Taraban, S. V. Sennikov, and V. A. Kozlov. 1998. "Characterization of erythroid cell-derived natural suppressor activity." *Immunobiology* 198 (4):361-74. doi: 10.1016/s0171-2985(98)80045-4.

Sennikov, S. V., T. V. Injelevskaya, S. V. Krysov, A. N. Silkov, I. B. Kovinev, N. J. Dyachkova, A. N. Zenkov, M. I. Loseva, and V. A. Kozlov. 2004. "Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen+ and glycoporphin A+ cells from human bone marrow." *BMC Cell Biol* 5 (1):39. doi: 10.1186/1471-2121-5-39.

Sinha, P., V. K. Clements, S. K. Bunt, S. M. Albelda, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response." *J Immunol* 179 (2):977-83.

Splawski, J. B., D. F. Jelinek, and P. E. Lipsky. 1991. "Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes." *J Clin Invest* 87 (2):545-53. doi: 10.1172/jci115029.

Stoll, B. J., N. Hansen, A. A. Fanaroff, L. L. Wright, W. A. Carlo, R. A. Ehrenkranz, J. A. Lemons, E. F. Donovan, A. R. Stark, J. E. Tyson, W. Oh, C. R. Bauer, S. B. Korones, S. Shankaran, A. R. Laptook, D. K. Stevenson, L. A. Papile, and W. K. Poole. 2002. "Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network." *Pediatrics* 110 (2 Pt 1):285-91.

Stoll, B. J., N. I. Hansen, R. D. Higgins, A. A. Fanaroff, S. Duara, R. Goldberg, A. Laptook, M. Walsh, W. Oh, and E. Hale. 2005. "Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003." *Pediatr Infect Dis J* 24 (7):635-9.

Terabe, M., S. Matsui, J. M. Park, M. Mamura, N. Noben-Trauth, D. D. Donaldson, W. Chen, S. M. Wahl, S. Ledbetter, B. Pratt, J. J. Letterio, W.

- E. Paul, and J. A. Berzofsky. 2003. "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." *J Exp Med* 198 (11):1741-52. doi: 10.1084/jem.20022227.
- Terabe, M., J. M. Park, and J. A. Berzofsky. 2004. "Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth." *Cancer Immunol Immunother* 53 (2):79-85. doi: 10.1007/s00262-003-0445-0.
- Thomas, W., and C. P. Speer. 2011. "Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome?" *Neonatology* 99 (3):177-87. doi: 10.1159/000320170.
- Webster, W. S., and D. Abela. 2007. "The effect of hypoxia in development." *Birth Defects Res C Embryo Today* 81 (3):215-28. doi: 10.1002/bdrc.20102.
- Wegmann, T. G., H. Lin, L. Guilbert, and T. R. Mosmann. 1993. "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?" *Immunol Today* 14 (7):353-6. doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-d.
- Weston, E. J., T. Pondo, M. M. Lewis, P. Martell-Cleary, C. Morin, B. Jewell, P. Daily, M. Apostol, S. Petit, M. Farley, R. Lynfield, A. Reingold, N. I. Hansen, B. J. Stoll, A. L. Shane, E. Zell, and S. J. Schrag. 2011. "The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005-2008." *Pediatr Infect Dis J* 30 (11):937-41. doi: 10.1097/INF.0b013e318223bad2.
- Yang, L., J. Huang, X. Ren, A. E. Gorska, A. Chytil, M. Aakre, D. P. Carbone, L. M. Matrisian, A. Richmond, P. C. Lin, and H. L. Moses. 2008. "Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis." *Cancer Cell* 13 (1):23-35. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.004.
- Youn, J. I., S. Nagaraj, M. Collazo, and D. I. Gabrilovich. 2008. "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* 181 (8):5791-802.
- Young, M. R., M. Newby, and H. T. Wepsic. 1987. "Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors." *Cancer Res* 47 (1):100-5.
- Zhu, B., Y. Bando, S. Xiao, K. Yang, A. C. Anderson, V. K. Kuchroo, and S. J. Khoury. 2007. "CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 179 (8):5228-37.
-

9 Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Christian Gille Frau, Dr. Natascha Köstlin, und Frau Dr. Bärbel Spring.

Die Methode der MDSC-Aufreinigung wurde von Frau Dr. Hellen Kugel, Frau Dr. Natascha Köstlin und Frau Dr. Bärbel Spring im Labor eingeführt und von der Verfasserin für die speziellen Gegebenheiten dieser Studie modifiziert.

Das Untersuchungsmaterial wurde von Mitarbeitern des Zentrallabors zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Dr. Natascha Köstlin, Frau Dr. Bärbel Spring und Frau Dr. Hellen Kugel von der Verfasserin eigenständig durchgeführt.

Die Zuordnung der Probanden anhand des Verlaufes ihres Klinikaufenthalts in Vergleichsgruppen erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Natascha Köstlin.

Die Statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe und Beratung durch den Statistiker Herr Dr. Simon Müller und Herrn PD Dr. Christian Gille.

Abbildung 1 entstand mit technischer Hilfe von Frau Sandra Schneller. Alle weiteren Abbildungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Müller erstellt.

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

Tübingen, den 16.9.2016

10 Danksagungen

Viele Menschen haben an meiner Arbeit Anteil genommen und mich moralisch und organisatorisch unterstützt. Ihnen allen gebührt mein herzlicher Dank!

An erster Stelle danke ich Herrn PD Dr. Christian Gille für das Überlassen dieses hochinteressanten und spannenden Themas und für die Annahme als Doktorandin. Seine exzellente Betreuung, seine Ideen und sein Engagement haben mir das Anfertigen dieser Arbeit erst ermöglicht. Auch Herrn Prof. Dr. Christian F. Poets danke ich für die aufmerksame Verfolgung der Arbeit und die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung. Meine ganze Dankbarkeit gilt auch Frau Dr. Natascha. Köstlin, deren Hilfsbereitschaft mich stets begleitet hat und ohne die diese Arbeit nie zu Stande gekommen wäre. Besonders danken möchte ich allen Mitarbeitern des neonatologischen Labors, insbesondere Frau Dr. Bärbel Spring für ihre tatkräftige Unterstützung in der Durchführung der Experimente.

Zu ganz besonderem Dank bin ich all den Familien verpflichtet, die sich bereit erklärten, an dieser Studie teilzunehmen und diese so erst ermöglicht haben. Auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrallabors möchte ich mich herzlich bedanken, für ihre bereitwillige Hilfe bei der Zurückforderung der Blutprobenreste.

Zuletzt und vor allem habe ich jenen Menschen zu danken, die mich tagtäglich seelisch, moralisch und organisatorisch unterstützten. Ganz besonders sind hier zu nennen meine Eltern Dr. Susanne und Thomas Scheckenbach, die mich über das gesamte Projekt hinweg uneingeschränkt gestärkt haben, des Weiteren Herrn Gottfried Scheckenbach, Herrn Prof. Dr. Thomas Abele und Herrn Stephan Abele für ihre Hilfe in allen technischen und formalen Belangen. Auch möchte ich von ganzem Herzen meinen Großmüttern Frau Dorothea Scheckenbach und Frau Hilde Baur für ihren moralischen Rückhalt danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Wolf Hirschmann, ohne dessen Rat und Hilfe ich es niemals gewagt hätte, ein experimentelles Thema wie dieses in Angriff zu nehmen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Name: Vera Clarissa Maximiliane Scheckenbach
- Geburtstag: 21. Januar 1990
- Geburtsort: Schwäbisch Gmünd
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

- 1996-2000 Grundschule Mutlangen
- 2000-2006 Realschule Mutlangen
- 2006-2009 Berufliches Gymnasium mit wirtschaftswissenschaftlicher Richtung an der Kaufmännischen Schule Schwäbisch Gmünd
- 2009 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

- 2009 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 1.9.2011 Ablegen der 1. Ärztlichen Prüfung
- 2013 Beginn der Promotionsarbeiten unter der Anleitung von PD Dr. Christian Gille und Prof. Dr. Christian F. Poets an der Universitätskinderklinik Tübingen, Abteilung Neonatologie
- 2014 Auslandssemester an der Université Aix-Marseille (Frankreich)
- 16.4.2015 Ablegen der 2. Ärztlichen Prüfung
- 2015 / 2016 Praktisches Jahr
1.Tertial: Chirurgie an der Université de la Réunion (Frankreich)
2.Tertial: Anästhesie an der Universitätsklinik Tübingen
3.Tertial: Innere Medizin am Kantonsspital Obwalden (Schweiz) und dem Royal Liverpool Hospital (Großbritannien)
- 16.6.2016 Ablegen der 3. Ärztlichen Prüfung