

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

**Erhöhte Expression von Bcl-2 führt zu verlängertem
Überleben von myeloiden Suppressorzellen nach
Phagozytose von *Escherichia coli***

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

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

vorgelegt von

Schwarz, Julian Lukas Frederik

2020

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Gille

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Tenenbaum

3. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

Tag der Disputation: 28.10.2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Einleitung	4
2.1	Das neonatale Immunsystem	4
2.2	Myeloide Suppressorzellen.....	5
2.3	Phagozytose	6
2.4	Apoptose.....	7
2.5	Ziel der Arbeit	8
3	Material	10
3.1	Patientenkollektiv	10
3.2	Materialien biologischen Ursprungs.....	10
3.3	Materialien nicht-biologischen Ursprungs	11
3.4	Antikörper für die Durchflusszytometrie	12
3.5	Glas- und Plastikmaterialien.....	13
3.6	Geräte und Software	14
3.7	Zellen	15
4	Methoden.....	16
4.1	Isolierung mononukleärer Zellen und autologer Granulozyten aus Nabelschnurblut.....	16
4.2	Zellzahlbestimmung	17
4.3	Kultivierung von Bakterien	17
4.4	Zellkultur	17
4.4.1	<i>in-vitro</i> Infektionsmodell von CBMC und Granulozyten mit <i>E. coli</i> –GFP.....	18
4.5	Durchflusszytometrie.....	18
4.5.1	Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität	18

4.5.2	Immunphänotypisierung	19
4.5.3	Quantifizierung der Phagozytoseaktivität.....	19
4.5.4	Apoptosenachweis mittels Annexin-V/7-AAD-Färbung	19
4.5.5	Fixierung und Permeabilisierung der G-MDSC und Granulozyten	20
4.5.6	Färbung von Bcl-2, Bcl-xL und Bax	20
4.5.7	Hemmung von Bcl-2 und Bcl-xL mit Hilfe von ABT-737	20
4.6	Isolation von G-MDSC aus CBMC durch <i>magnetic cell sorting</i> (MACS).....	21
4.7	CFSE-Markierung	21
4.8	Konfokalmikroskopie	22
4.8.1	Herstellung der Konfokalmikroskopieproben	22
4.8.2	Kernfärbung mittels DAPI.....	22
4.8.3	Cytospin.....	23
4.9	Elektronenmikroskopie.....	23
4.9.1	Herstellung der Elektronenmikroskopieproben.....	23
4.10	Statistische Analyse.....	23
5	Ergebnisse	25
5.1	Flussdiagramm der Arbeitsschritte.....	25
5.2	G-MDSC besitzen eine vergleichbare Phagozytoserate wie reife Granulozyten	26
5.3	MDSC und Granulozyten können <i>E. coli</i> phagozytieren - Nachweis durch Konfokalmikroskopie	27
5.4	MDSC und Granulozyten können <i>E. coli</i> phagozytieren - Nachweis durch Elektronenmikroskopie.....	31
5.5	G-MDSC sind morphologisch unreifer als Granulozyten	31
5.6	Keine Beeinträchtigung der Phagozytoserate durch assoziierte Microbeads.....	32
5.7	G-MDSC haben eine geringere spontane und postphagozytäre Apoptoserate als reife Granulozyten	34
5.8	G-MDSC haben eine verminderte spontane und postphagozytäre Apoptosegeschwindigkeit im Vergleich zu reifen Granulozyten.....	35

5.9	<i>Bystander</i> -G-MDSC haben geringere Apoptose als bystander-Granulozyten....	36
5.10	G-MDSC exprimieren basal und postphagozytär mehr Bcl-2 als reife Granulozyten	37
5.11	Keine Unterschiede in der Expression von Bcl-xL und Bax zwischen G-MDSC und reifen Granulozyten	39
5.12	Inhibition von Bcl-2 durch den Bcl-Inhibitor ABT 737 führt zu Erhöhung der Spontanapoptose von G-MDSC	40
5.13	Inhibition von Bcl-2 durch den Bcl-Inhibitor ABT 737 führt zu Erhöhung der postphagozytären Apoptose von G-MDSC	42
5.14	G-MDSC inhibieren auch postphagozytär die T-Zellproliferation	43
5.15	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45
6	Diskussion.....	46
7	Zusammenfassung	55
8	Verzeichnisse.....	57
8.1	Literaturverzeichnis	57
8.2	Abbildungsverzeichnis	62
9	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	65
10	Veröffentlichungen	66
11	Anhang.....	67
11.1	Danksagung	67

1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Afap1q	Apoptotischer Protease aktivierender Faktor
APC	<i>Allophycocyanin Conjugat</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CBMC	<i>Cord blood mononuclear cell</i> (mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CLP	<i>cecal ligation and punctation</i>
<i>CLSM</i>	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
Cyt C	Cytochrom c
Cyt D	Cytochalasin D
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GBS	beta-hämolisierende Gruppe-B Streptokokken
<i>GFP</i>	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Ig-G	Immunglobulin G

IFN γ	Interferon γ
IL-2	Interleukin-2
IMM	innere Mitochondrialmembran
iNOS	<i>inducible nitrogen oxide synthase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MACS	<i>magnetic activated cell separation</i>
LPS	Lipopolysaccharid
(G/M)-MDSC	<i>granulocytic-/monocytic myeloid derived suppressor cells</i> (granulozytäre-/monozytäre-myeloide Suppressorzellen)
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOS	<i>Nitric oxide synthases</i> (Stickstoffmonoxid Synthase)
NSB	Nabelschnurblut
OD	<i>Optical density</i>
OMM	äußere Mitochondrienmembran
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Pathogen- assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphate buffered saline
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (mononukleäre Zellen)
p.i.	post infectionem
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PICD	<i>phagocytosis-induced-cell death</i> (Phagozytose- induzierter Zelltod)
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
PRR	<i>Pathogen Recognition Receptors</i> (Pathogen-erkennende Rezeptoren)

PVL	periventrikuläre Leukomalazie
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoff Spezies)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute = Zellkulturmedium
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TRAIL	<i>TNF-related-apoptosis-inducing ligand</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>

2 Einleitung

2.1 Das neonatale Immunsystem

Infektionen sind eine der Hauptursachen für perinatale Morbidität und Mortalität [1-3]. Eines von tausend Neugeborenen erkrankt an einer Sepsis [1], wobei die Inzidenz bei Frühgeborenen mit abnehmendem Gestationsalter auf bis zu 55% ansteigt [4]. Die Folgen der neonatalen Sepsis sind schwerwiegend; neben einer Mortalität von 10-20% [1, 5] spielen vor allem postinflammatorische Folgeerkrankungen wie die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) und die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) eine wichtige Rolle für das Langzeit *Outcome* der erkrankten Kinder [6-9]. So entwickeln Frühgeborene mit neonataler Sepsis im Vergleich zu Kindern ohne Infektion etwa doppelt so häufig eine infantile Zerebralparese [7].

Die erhöhte Anfälligkeit des Neugeborenen für Infektionen wird vor allem durch den „neonatalen“ Zustand des Immunsystems erklärt [10]. Das Immunsystem des Neugeborenen muss sich innerhalb kürzester Zeit vom fetalen Zustand, bei dem Toleranzinduktion gegenüber dem mütterlichen Organismus entscheidend ist, an die Bedingungen außerhalb des Mutterleibes anpassen und „lernen“ verschiedenste Pathogene abzuwehren [11]. Viele Immunzellen reagieren während dieser Phase anders auf Infektionserreger als im adulten Organismus. So ist die neonatale Immunantwort unter anderem gekennzeichnet durch eine reduzierte antimikrobielle Aktivität von neonatalen Granulozyten [12-14], eine verminderte ko-stimulatorische Fähigkeit antigen-präsentierender Zellen [15, 16], eine veränderte Zytokin-Produktion [17] und eine veränderte Zusammensetzung der T-Zellpopulation [18-20]. Durch die im Vergleich zum adulten Immunsystem funktionelle „Unreife“ des neonatalen Immunsystems kommt es vermehrt zur Generalisierung von Infektionen und schwerwiegenden Komplikationen wie einer Sepsis [21].

Die häufigsten Ursachen einer neonatalen Sepsis sind bakterielle Infektionen durch beta-hämolyisierende Gruppe-B Streptokokken (GBS) [1, 2] oder *Escherichia coli* (*E.*

coli) [2, 22], welche oftmals schon während der Geburt von der Mutter auf das Kind übertragen werden.

Welche Mechanismen zum „neonatalen“ Zustand des Immunsystems beitragen und wie es zur Immunadaptation hin zum adulten Funktionszustand kommt, ist nur wenig verstanden.

2.2 Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind Vorläuferzellen der myeloiden Zellreihe mit immunsuppressiven Eigenschaften, welche erstmals in tumortragenden Mäusen durch Gabrilovich et al. [23] beschrieben wurden. Es handelt sich um angeborene Immunzellen, welche sich durch eine suppressive Aktivität auf andere Immunzellen, insbesondere T-Zellen und NK-Zellen, auszeichnen [24-26]. Ein wichtiger Effektor-Mechanismus von MDSC ist der Abbau verschiedener Aminosäuren, die für die Funktion von T-Zellen eine wesentliche Rolle spielen. Hierzu gehören die essentiellen Aminosäuren Arginin und Tryptophan. Durch die Expression des Enzyms Arginase I in MDSC kommt es zur Depletion von Arginin [27-29]. In ähnlicherer Weise kommt es durch die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zur Depletion von Tryptophan [30, 31]. Außerdem sind die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) [32, 33] sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) wichtige Effektor-Mechanismen [34, 35] .

Beim Menschen sind bisher keine spezifischen Oberflächenmarker bekannt, mit welchen man MDSC klar von anderen Zellpopulationen abgrenzen könnte. Nach Auftrennung von Blutzellen über einen Dichtegradienten finden sich MDSC in der Fraktion der mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). MDSC können näherungsweise anhand ihrer Oberflächenmarker in zwei Subpopulationen unterteilt werden; monozytäre MDSC (M-MDSC) exprimieren den monozytären Marker CD14, granulozytäre MDSC (G-MDSC) exprimieren granulozytäre Marker wie CD11b, CD15 oder CD66b. Beide Subtypen tragen den myeloiden Zellmarker CD33 und sind negativ für HLA-DR [23, 25, 31, 34, 36, 37]. Zur sicheren Identifikation der MDSC ist aufgrund fehlender spezifischer phänotypischer

Marker der Nachweis der immunsuppressiven Wirkung z.B. durch den Nachweis einer Hemmung der T-Zell-Proliferation notwendig.

Während MDSC unter physiologischen Bedingungen nur einen sehr geringen Anteil der PBMC ausmachen (<1%), kommt es unter pathologischen Bedingungen [26], wie Tumorerkrankungen [35, 36, 38], Trauma [39], bakteriellen und parasitären Infektionen, akuten [34, 39] und chronischen [40] Entzündungen, Autoimmunerkrankungen [41] und Transplantationen [28, 42] zu einer Expansion dieser Zellpopulation. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (AG Gille) konnten darüber hinaus zeigen, dass es auch unter physiologischen Bedingungen, wie in der Schwangerschaft oder bei Neugeborenen zu einer Akkumulation von MDSC kommt. Wir konnten zeigen, dass MDSC sowohl im peripheren Blut gesunder Schwangerer [43], in der Plazenta [44] als auch im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener [45] in bis zu 10-fach erhöhter Zahl vorkommen.

2.3 Phagozytose

Als Phagozytose wird die aktive Aufnahme von Partikeln ($>0,5\mu\text{m}$) bezeichnet. Sie wird in höheren Lebewesen hauptsächlich von spezialisierten Zellen, den sogenannten professionellen Phagozyten, betrieben [46]. Die wichtigsten Vertreter sind Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten [47, 48].

Zu Beginn der Phagozytose erkennt der Phagozyt das zu phagozytierende Partikel über Erkennungsmerkmale z.B. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns; PAMP) eines Pathogens, Immunglobulin G (IgG), den Komplementfaktor C3b oder Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen. Im nächsten Schritt wird das Partikel über spezifische Rezeptoren gebunden (z.B. PRR, CD14, CD36, CD68) [49]. Danach kommt es durch die Restrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zur Ausbildung von Pseudopodien, zur Umschließung und Internalisierung des Partikels und schlussendlich zur Bildung eines Phagosom. Dieses verbindet sich mit einem Lysosom zu einem Phagolysosom und der Fremdkörper wird durch die im Lysosom befindlichen Enzyme abgebaut [50-53].

Nach der Phagozytose eines Pathogens kommt es häufig zu einem Phagozytose-induzierten Zelltod (phagocytosis-induced-cell-death; PICD) [54, 55]. Durch den PICD

werden Phagozyten, welche Partikel phagozytiert haben, in den kontrollierten Zelltod getrieben. Die apoptotische Zelle kann anschließend durch Makrophagen degradiert und damit eliminiert werden. Somit wird eine sekundäre Nekrose der apoptotischen Zellen vermieden und die Entzündungsreaktion beendet [56, 57]. Ein Beispiel hierfür ist der PICD von neonatalen Monozyten nach Phagozytose von *E. coli* Bakterien [58].

Durch den PICD kann auch bei benachbarten Zellen, sogenannten *bystander*-Zellen welche selbst keine Pathogene phagozytiert haben, die Apoptose induziert werden [55, 59]. In der Untersuchung neonataler Monozyten zeigte sich vor allem TNF- α als auslösender Faktor der Apoptose der *bystander*-Zellen.

2.4 Apoptose

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod dient dem kontrollierten Abbau von Zellen und ruft im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktion hervor [56, 60, 61]. Apoptose kann über mindestens zwei Signalwege erfolgen, einen Caspase-abhängigen und einen Caspase-unabhängigen Weg. Die Caspase-abhängige Apoptose kann wiederum auf einem intrinsischen Weg und einem extrinsischen Weg ausgelöst werden [62].

Der extrinsische Weg ist charakterisiert durch Bindung und Aktivierung von Transmembranrezeptoren wie CD95/APO-1/Fas [52, 53], Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-Rezeptoren und TNF-related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-Rezeptoren [63] durch die entsprechenden Liganden (APO-1/FasL, TNF, TRAIL). Es folgt die Aktivierung von Caspase 8 und im Zuge dessen kommt es zur Auslösung der sogenannten Caspase-Kaskade [62, 64].

Bei der Auslösung der Apoptose über den intrinsischen Weg ist die Permeabilität der Mitochondrienmembran entscheidend. Wesentlich für die Steuerung der Membranpermeabilität der Mitochondrien sind Proteine der Bcl-2-Familie [65, 66]. Bcl-2 Proteine werden in drei verschiedene Subfamilien unterteilt, die anti-apoptotisch wirkende Bcl-2-Subfamilie mit ihren wichtigsten Vertretern Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1, die pro-apoptotisch wirkende Bax-Subfamilie mit ihren wichtigsten

Vertretern Bax, Bak und Bok und die pro-apoptotisch wirkende BH3 Subfamilie mit ihren wichtigsten Vertretern Bad, Bid, Bik, Blk, Hrk, BNIP3 und BimL. Bcl-2-Proteine steuern die Permeabilität der Mitochondrienmembran und die Freisetzung des an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran (IMM) befindlichen Moleküls Cytochrom C (Cyt C). Kommt es zur Freisetzung von Cyt C durch Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) ins Zytosol, so bindet dieses zusammen mit Adenosintriphosphat (ATP) an den apoptotische Protease aktivierenden Faktor (Afp1) und bildet mit ihm den Apoptosom-Komplex. Dieser aktiviert die Caspase 9, welche gleich wie beim extrinsischen Weg zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führt [62].

Das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Bcl-Proteinen ist essenziell für das Überleben oder Sterben einer Zelle. Verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten der pro-apoptotischen Bcl-Proteine, wird die Permeabilität der OMM erhöht und es kommt zur Apoptose. Verschiebt es sich in Richtung der anti-apoptotischen Bcl-Proteine, so entwickelt die Zelle eine gesteigerte Resistenz gegenüber Apoptose-auslösenden Reizen [62].

2.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese überprüft werden, dass G-MDSC aus dem Nabelschnurblut ähnlich wie reife Granulozyten in der Lage sind, Bakterien zu phagozytieren und somit aktiv an der Abwehr von Infektionen teilnehmen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob G-MDSC nach Phagozytose von *E. coli* durch Induktion von Apoptose nicht weiter am Entzündungsgeschehen teilnehmen können. Außerdem sollte geklärt werden, welche Mechanismen den PICD auslösen bzw. verhindern. Zuletzt sollte untersucht werden, ob G-MDSC auch nach Phagozytose noch in der Lage sind, T-Zellproliferation zu supprimieren.

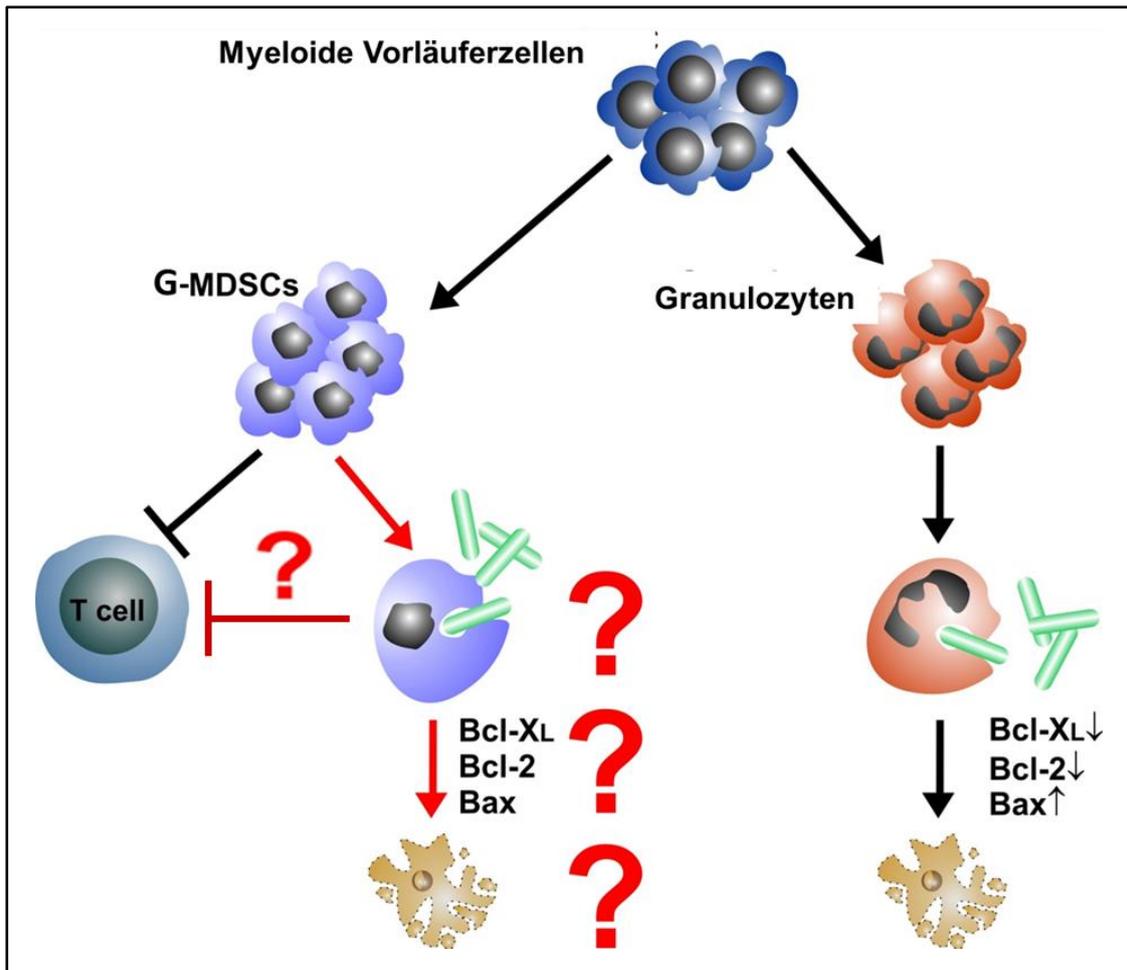


Abb. 1: Graphische Darstellung der Fragestellungen: Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob G-MDSC in der Lage sind, Bakterien zu phagozytieren und ihr postphagozytäres Verhalten zu untersuchen.

3 Material

3.1 Patientenkollektiv

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen genehmigt (178/2011BO1). Es wurde nur Nabelschnurblut reifer Neugeborener ohne Anzeichen einer pränatal erworbenen Infektion verwendet. Die Blutentnahme aus der abgetrennten Nabelschnur erfolgte nach vorangegangener schriftlicher Einwilligung der Eltern.

3.2 Materialien biologischen Ursprungs

Anti-human CD3 Clone: OKT-3	Janssen-Cilag, Neuss
Brefeldin A	Fa. Sigma, Taufkirchen
Cytochalasin D (CytD)	Fa. Sigma, Taufkirchen
<i>E. coli</i> DH5 α (GFP)-mut2	(Dehio et al. 1998)
<i>E. coli</i> DH5 α –nicht fluoreszierend	(Dehio et al. 1998)
Gentamycin	Fa. Sigma, Taufkirchen
Fetal bovine serum (FCS)	Fa. Biochrom, Berlin
IL-2 (Interleukin-2)	Fa. R&D Systems, Wiesbaden
Kanamycin	Fa. Sigma, Taufkirchen
Mitomycin	Fa. Medac, Wedel
Polyglobin (10%)	Fa. Bayer, Leverkusen

3.3 Materialien nicht-biologischen Ursprungs

Ammoniumchlorid	Universitätsapotheke, Tübingen
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Bioscience
BD Perm/Wash Buffer	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml)	Fa. Biochrom, Berlin
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Fa. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
FACS Flow	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Floupprep-Eindeckelmedium	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Heparin-Natrium (5000 I.E. / 0,5 ml)	Fa. B. Braun, Melsungen
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fa. Sigma, Taufkirchen
Karnowsky-Lösung	Eigene Herstellung im Labor der Dermatologie
Lennox-L-Broth-medium	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Dulbecco)	Fa. Biochrom, Berlin
<i>Running Buffer</i>	Universitätsapotheke, Tübingen
Saponinpuffer (2,5g BSA, 0,5 Gramm Saponin, 0,02% NaN ₃ (20%ig) in 500ml PBS)	Eigene Herstellung
Trypanblau	Fa. Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Fa. Biochrom, Berlin
Waschpuffer (PBS+0,1%BSA+0,1%Natriumacid)	Eigene Herstellung

3.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alexa Fluor 647/ Allophycocyanin Conjugate (APC)-markiert:

Bax; B-9 sc-7480	Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Annexin-V	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
<i>Mouse Anti-Human CD66b-G10F5</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
<i>Mouse Anti-Human CD4 APC-RPA-T4</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiert:

<i>Mouse Anti-Human CD66b-G10F5</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
-------------------------------------	--------------------------------

Phycoerythrin (PE)-markiert:

Bcl-2; Bcl-2/100	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Bcl-xL; H-5	Fa. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<i>Isotype control</i> ; IgG1 (Isotyp)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Isotype control</i> ; IgG2 (Isotyp)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Mouse Anti-Human CD4-RPA-T4</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
<i>Mouse Anti-Human CD66b-G10F5</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Zap 70; 1E7.2	Fa. Invitrogen, Karlsruhe

Peridinin-chlorophyll-protein Complex Conjugate (PerCP) markiert

7-Aminoactinomycin (7-AAD)	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
----------------------------	--------------------------------

Antikörper für die Isolierung der MDSC

Anti-FITC MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Anti-PE MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach

Bcl-xL, Bcl-w und Bcl-2 Inhibitor

ABT-737	Selleck Chemicals, Houston Texas, U.S.A.
---------	---

3.5 Glas- und Plastikmaterialien

15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24 und 48 well <i>Cell culture Cluster, f-bottom</i>	Fa. Costar, Bodenheim
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes (“FACS-Röhrchen”)	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
<i>96 well cell culture plate, f- und u-bottom</i>	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
<i>Cover glass</i>	VWR International
Einmalspritzen, Plastikpack (30 ml, 50 ml)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Cup Reaction Tubes	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer	Fa. Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Objektträger	Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen blau (500-1000 µl) und gelb (20-200 µl)	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen farblos (10 µl)	Viozym Scientific, Oldendorf
	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette 9 ml mit 1,6 mg EDTA / ml Blut	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.6 Geräte und Software

8-Kanal-Transferpipette (20-200 µl)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Abzugs-Bank HeraSafe HS12	Heraeus Instruments, Stuttgart
Auto Macs pro	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Brutschrank(5% CO ₂ , 37°C, wasserdampfgesättigt)	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
CellQuest Pro	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Cytospin 16A Zentrifuge	Fa. Hettich, Tuttlingen
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Elektronenmikroskop LIBRA 120p	Fa. Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank (-80°C)	Telstar Igloo GreenLine 570L
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
Konfokalmikroskop-cLSM 710 NLO	Fa. Zeiss, Oberkochen
Kühlschrank „Bosch economic“	Fa. Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Fa. Olympus, Hamburg
Microsoft Excel 2002	Fa. Microsoft Corporation, Unterschleißheim,
Microsoft Word 2002	Fa. Microsoft Corporation, Unterschleißheim,
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Photometer	Fa. Eppendorf, Hamburg
Schüttelmixer Certomat H	Fa. B. Braun Biotech International, Göttingen
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt
Vortexer	Fa. Bender & Hobein AG, USA
ZEN 2011	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge Rotanta 460 RS und 46 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

3.7 Zellen

G-MDSC und autologe Granulozyten wurden aus dem Nabelschnurblut reifer Neugeborener gewonnen. Die Blutentnahme aus der Nabelschnur erfolgte durch sterile Punktion. Zur Gerinnungshemmung wurden 4 I.E. Heparin/ml Blut verwendet.

4 Methoden

4.1 Isolierung mononukleärer Zellen und autologer Granulozyten aus Nabelschnurblut

Die mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut (cord blood mononuclear cells, CBMC) und Granulozyten aus dem Nabelschnurblut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum [67-69] gewonnen. Zunächst wurden 15 ml Vollblut 1:2 mit PBS verdünnt und anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen vorsichtig ohne Durchmischung auf 15 ml Biocoll Trennlösung geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation mit 400 x g bei 20°C über 25 Minuten ohne Bremse. Nach diesem Schritt befanden sich die CBMC im Zellring in der Zwischenschicht und die Granulozyten im Zellpellet.

Der entstandene Zellring, bestehend aus CBMC, wurde abgesaugt und in 50 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 500 x g über 10 Minuten bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 20 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung mittels Sysmex XP-300, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 400 x g bei 4°C über 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Nach Entfernung des Zellrings wurde die restliche Flüssigkeit bis auf die sich im Bodensatz befindlichen Granulozyten und Erythrozyten abgesaugt. Daraufhin wurde das Pellet in 50 ml Ammoniumchlorid aufgenommen und die Zellsuspension für maximal 30 Minuten auf Eis inkubiert, bis die Erythrozyten komplett lysiert waren. Anschließend wurde bei 300 x g über 5 Minuten bei 10°C zentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Probe resuspendiert und auf 35 ml mit kaltem PBS aufgefüllt. Daraufhin wurde erneut bei 300 x g über 5 Minuten bei 10°C zentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Probe resuspendiert und auf 20 ml mit kaltem PBS aufgefüllt. Nach der Zellzahlbestimmung mittels Sysmex XP-300, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt

mit 400 x g bei 4°C über 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

4.2 Zellzahlbestimmung

Vor der Kultivierung der CBMC und der Granulozyten in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt, um eine Einstellung auf 2×10^6 Zellen/ml zu gewährleisten. Die Messung erfolgte durch ein automatisches Hämozytometer (Sysmex XP-300). Die Messgenauigkeit wurde durch manuelle Zählung in der Neubauer Zählkammer validiert. Beide Methoden unterscheiden sich in ihrer Genauigkeit um weniger als 10% (Daten nicht gezeigt).

4.3 Kultivierung von Bakterien

Für die Experimente kamen zwei verschiedene *E. coli* K1 Laborstämme zum Einsatz: *E. coli*-GFP, der sich durch die Expression eines plasmidkodierten green-fluorescence-protein (gfp mut2) Gen unter Kontrolle eines lac-Promotors auszeichnet, sowie der Laborstamm *E. coli* DH5 α –nicht fluoreszierend [70]. Bakterien wurden aus der -80°C Gefrierkultur in 5 ml LB-Medium überführt und unter Zugabe von 50 μ Mol Kanamycin und 50 μ Mol IPTG über Nacht bei 37°C mit 200 *rounds per minute* (rpm) geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 100 μ l der Bakteriensuspension in 5 ml neues LB-Medium mit Zusätzen (s.o.) pipettiert und für weitere 2-4 Stunden im Schüttelmixer bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Diese ist bei OD 600nm = 0,3 bis 0,7 erreicht. Dann wurde die Bakterienzahl mittels Spektrophotometrie bestimmt. Eine OD 600nm entspricht circa 2×10^6 Bakterien/ μ l. Die Kultur wurde fortan auf Eis gestellt um eine weitere Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Ferner wurde definiert in welchem Verhältnis Zellen zu Bakterien stehen, d.h. die *multiplicity of infection* (MOI). Im Folgenden wurde immer mit einer MOI von 1:50 gearbeitet.

4.4 Zellkultur

Sowohl CBMC als auch Granulozyten wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, 48- und 96-Well-Format mit Volumina von jeweils 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0,5 ml bzw. 0,2 ml) bei 37°C mit 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die absolute Zahl der Zellen variierte

mit der Größe der Wells. Als Kulturmedium wurde RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) verwendet.

4.4.1 *in-vitro* Infektionsmodell von CBMC und Granulozyten mit *E. coli* –GFP

Granulozyten und CBMC wurden in Zellkulturplatten eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ mit *E. coli*-GFP (MOI 1:50) infiziert. Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die adhärennten Zellen vom Plattenboden gespült, bei 300 x g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen auf ein FCS-Kissen (1,5 ml) in 5 ml Falcon-Röhrchen geschichtet und bei 300 x g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert, um verbleibende extrazellulären Bakterien zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, und die Zellen in neuem RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz in dem ursprünglichen Volumen aufgenommen. Zusätzlich wurden der Suspension 200 µg/ml Gentamycin zugesetzt, um verbliebene extrazelluläre Bakterien zu eliminieren. Die Zellen wurden entweder direkt durchflußzytometrisch analysiert oder in RPMI-Medium mit 10% FCS-Zusatz und 10µl/ml Probe Gentamycin im Brutschrank weiter inkubiert.

4.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt eine etablierte Methode zur Beurteilung von Zellen hinsichtlich Größe, Granularität und Expression angefärbter Antigene dar [71]. Für die durchflußzytometrischen Messungen wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet. Die Datenerfassung und -weiterverarbeitung erfolgte an einem Macintosh-Computer mit Hilfe der *Cell Quest Research Software* (Becton Dickinson, Heidelberg).

4.5.1 Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Größe und Granularität

Durch die Analyse der Streulicht-Messergebnisse und ihrer graphischen Darstellung ließen sich Zellen ohne Fluoreszenzmarkierung bereits anhand ihrer Größe und Granularität unterscheiden. Dabei wurde auf der x-Achse das Vorwärtsstreulicht (FSC) und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht (SSC) in einer Dot-Plot Graphik dargestellt.

4.5.2 Immunphänotypisierung

Zur Färbung der extrazellulären Antigene wurden Granulozyten und CBMC aus der Kultur in FACS-Röhrchen überführt und mit entsprechenden Antikörpern 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension mit 4 ml FACS-Flow verdünnt und bei 330 x g bei 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

4.5.3 Quantifizierung der Phagozytoseaktivität

Nach Inkubation mit *E. coli*-GFP (siehe 4.4.1) wurden die Zellen strikt in Eiswasser weiter behandelt. Die Färbung gegen CD-66b erfolgte wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben mittels anti-CD66b-PE. 5000 CD66b positive Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Phagozytoseaktivität wurde als Prozentsatz CD66b-GFP-doppelt positiver Zellen bezogen auf alle CD66b-positiven Zellen sowie der mittleren Fluoreszenzaktivität (MFI) der CD66b-GFP-doppelt positiven Zellen ermittelt.

4.5.4 Apoptosenachweis mittels Annexin-V/7-AAD-Färbung

Der Nachweis von Apoptose der Granulozyten und G-MDSC erfolgte mittels Färbung mit Annexin-V und 7-AAD. Annexin-V ist ein früher Apoptosemarker und bindet an das Membranphospholipid Phosphatidylserin. Dieses transloziert bei der Apoptose von der Membranninnenseite nach außen und kann dann von Annexin-V gebunden werden [72, 73]. 7-AAD bindet direkt an die DNA zwischen Cytosin und Guanin. Es kann nur in die Zelle gelangen, wenn die Zellmembran zerstört ist und ist somit ein später Apoptosemarker [74]. Dies erlaubt die Differenzierung zwischen lebenden Zellen (Annexin-V negativ und 7-AAD negativ), frühapoptotischen Zellen (Annexin-V positiv und 7-AAD negativ) und spätapoptotischen Zellen (Annexin-V positiv und 7-AAD positiv) [75].

Nach vorangehender Inkubation der Zellen (4×10^5 /Probe) folgt die Zugabe von 2 ml Annexinbuffer und die Zentrifugation bei 300 x g bei 4°C für 5 Minuten und anschließendem Abkippen des Überstands und Resuspendieren der Probe. Danach wurden 2,5 µl Annexin-V APC und 0,5 µl anti-CD66b PE hinzugegeben und über 15

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Annexinbuffer hinzugegeben und der vorherige Waschgang wiederholt. Im letzten Schritt wurden 2,5 µl 7-AAD zur Probe hinzugefügt und noch einmal für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die durchflußzytometrische Analyse.

4.5.5 Fixierung und Permeabilisierung der G-MDSC und Granulozyten

Zur Quantifizierung der verschiedenen intrazellulären Bcl-2-Proteine war eine Permeabilisierung der Plasmamembran und Fixierung der Zellen nötig. Diese erfolgte mit einer *Cytofix/Cytoperm*-Lösung. Nach Überführung der jeweiligen Zellansätze in FACS-Teströhrchen wurden diese mit Waschpuffer bei 4°C und 350 x g über 5 Minuten gewaschen. Danach wurden 100 µl *Cytofix/Cytoperm*-Lösung pro Ansatz hinzugegeben und die Ansätze 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Ansätze zweimalig mit 100 µl BD *Perm/Wash Buffer* verdünnt und über 5 Minuten bei 4°C und 350 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 µl *Washperm* Lösung resuspendiert.

4.5.6 Färbung von Bcl-2, Bcl-xL und Bax

Nach 4 bzw. 16 stündiger Kultivierung von Granulozyten und CBMC erfolgte zunächst die Färbung des Oberflächen-Antigens CD66b (siehe 4.5.2) und anschließend die Fixierung sowie Permeabilisierung (siehe 4.5.5). Im Anschluss daran erfolgte die intrazelluläre Färbung der verschiedenen Bcl-2-Proteine mit IgG₁ (Isotyp) 3 µl / 50 µl Zellsuspension, anti-Zap 70 0,5 µl / 50µl Zellsuspension, anti-Bcl-2 PE 10 µl / 50 µl Zellsuspension, anti-Bcl-xL PE 7µl / 50µl Zellsuspension oder anti-Bax APC 7µl / 50µl Zellsuspension für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit. Nach Zugabe von 4 ml FACS-Flow wurden die Proben bei 4°C und 350 x g über 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Probe resuspendiert, um überschüssige Antikörper zu eliminieren.

4.5.7 Hemmung von Bcl-2 und Bcl-xL mit Hilfe von ABT-737

Zur Hemmung von Bcl-2 und Bcl-xL wurde nach *in-vitro* Infektion (siehe 4.4.1) 10µl/ml ABT-737 [76, 77] aus einem 1 mM Stammlösung hinzugegeben um eine Endkonzentration von 10µM zu erreichen. Nach 4 bzw. 16 Stunden wurde die

Apoptoserate mittels Annexin-V / 7-AAD Färbung (siehe 4.5.4) durchflußzytometrisch bestimmt.

4.6 Isolation von G-MDSC aus CBMC durch *magnetic cell sorting* (MACS)

Durch magnetische Zellseparation können G-MDSC aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle aus einer Zellsuspension von CBMC isoliert werden [78-80]. G-MDSC werden mit dem Antikörper anti-CD-66b PE markiert. Mithilfe von PE-gekoppelten Eisenpartikeln (*PE-MicroBeads*) wurden die G-MDSC sekundär mit magnetischem Eisen beladen. In dieser Weise markierte CBMC wurden in eine Separationssäule gefüllt, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, sodass alle an *MicroBeads*-gebundenen Zellen zurückgehalten wurden und alle nicht-gebundenen Zellen die Säule durchfließen konnten. Die Versuche wurden nach dem Protokoll des Herstellers (Fa. Miltenyi Biotec) durchgeführt. Die Reinheit der isolierten G-MDSC wurde durch eine Immunphänotypisierung mittels Durchflußzytometrie überprüft und betrug über 95% (Daten nicht gezeigt). Die absolute Anzahl der nun gewonnenen reinen MDSC wurde mittels einer Trypanfärbung in einer Neubauerzählkammer ermittelt und die Zellen wieder auf eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml gebracht.

4.7 CFSE-Markierung

Die CFSE-Markierung ermöglicht die Analyse von proliferierenden Zellen. Hierbei wird die Farbstoffmenge pro Zellteilung zur Hälfte an die Tochtergeneration weiter gegeben. Der so entstehende Verdünnungseffekt kann durchflußzytometrisch als Surrogatmarker für die Zellteilung detektiert werden [81, 82].

CBMCs wurden mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation (siehe 4.1) isoliert und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Es folgte die Färbung mit $25 \mu\text{M}$ CFSE und Inkubation über 10min bei Raumtemperatur mit anschließender Zugabe von 2-3 ml FCS und eine weitere Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur. Daraufhin folgte das Auffüllen mit RPMI-Medium und eine Zentrifugation bei 4°C und $350 \times g$ über 5 Minuten. Die Zellzahl wurde erneut bestimmt und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Es erfolgte die Stimulation der CBMC mit $1 \mu\text{g/ml}$ OKT3 und 100 U/ml IL-2 mit Inkubation für vier Tage bei 37°C und 5% CO_2 . Je nach Versuchsansatz erfolgt die

Zugabe von Granulozyten, G-MDSC oder G-MDSC nach einstündiger Infektion mit *E. coli* im Verhältnis 2:1. Nach vier Tagen wird die CD4⁺ T-Zell-Proliferation mit einem extrazellulären anti-CD4-Antikörper durchflusszytometrisch analysiert.

4.8 Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie (*CLSM*) [83] wurde als Ergänzung zur FACS-Analyse angewendet. Während bei der FACS-Analyse lediglich quantitative Aussagen möglich sind, kann die *CLSM* qualitative Aussagen mit räumlicher Zellzuordnung treffen. Durch die Erfassung verschiedener Fokusebenen und die Generierung von Stapelbildern ist es in der Konfokalmikroskopie möglich, eine Dreidimensionalität abzubilden. Der räumliche Eindruck ermöglicht verschiedene Zellkompartimente zu differenzieren und damit zu beurteilen, ob sich Bakterien intrazellulär oder lediglich extrazellulär an der Oberfläche befinden. Bildverarbeitungstechnisch werden in einem so genannten *Z-stack* in sechs Fokusebenen Bilder von den Zellproben aufgenommen. Um möglichst kontrastreiche Darstellungen zu erreichen, wurde eine *maximum intensity projection* des *Z-stack* durchgeführt.

4.8.1 Herstellung der Konfokalmikroskopieproben

Die Zellisolierung und -markierung der Granulozyten und MDSC erfolgte nach oben beschriebenem Schema. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Kernfarbstoff 4',6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) markiert, mit Hilfe von *Cytospin* auf Objektträgern immobilisiert und nach Applikation eines Einbettmediums dauerhaft konserviert. 4',6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff und wird z.B. zur Kernfärbung und für die Färbung lebender Zellen verwendet [84].

4.8.2 Kernfärbung mittels DAPI

Wir verwendeten die Kernfärbung mittels DAPI in Kombination mit einer anti-CD66b APC Markierung und GFP-markierten Bakterien um die intrazelluläre Aufnahme der Bakterien durch konfokalmikroskopische Aufnahmen zu demonstrieren. Nach oben bereits beschriebener Inkubation der Granulozyten und G-MDSC (jeweils 2×10^6 /ml

Zellen) mit GFP- markierten *E. coli* und Markierung mit 0,3µl anti-CD66b APC erfolgte im nächsten Schritt die Färbung mit 50µl DAPI. Nach 5 minütiger Inkubation folgte das zweimalige Waschen nach Zugabe von einem Hub FACS-Flow bei 300 x g bei 4°C für 5 Minuten.

4.8.3 Cytospin

Nachdem die Proben zunächst mit Paraformaldehyd 2% bzw. BD FIX fixiert wurden, wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 100 x g die oben beschriebenen Proben auf einen Objektträger gebracht. Nach Trocknen der Proben wurde 4µl *Floupre*-Eindeckelmedium auf die Objektträger gegeben und nach wiederholtem Trocknen die Ränder luftdicht verschlossen. Die Betrachtung und Auswertung der Versuche erfolgte am Konfokalmikroskop CLSM 710 NLO des Institutes für Mikrobiologie in Kooperation mit zuständigen Mitarbeitern.

4.9 Elektronenmikroskopie

Bei der Elektronenmikroskopie kann ähnlich wie durch die CLMS eine qualitative Aussage getroffen werden. Im Gegensatz zum CLMS steht hier allerdings nicht der räumliche Eindruck, sondern die detaillierte Betrachtung der Zellen im Vordergrund.

4.9.1 Herstellung der Elektronenmikroskopieproben

Zunächst wurden reine G-MDSC wie oben beschrieben isoliert, auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml gebracht und mit *E. coli* für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert und in einer frisch hergestellten, leicht angewärmten Fixierlösung (Karnovskylösung) resuspendiert. Die Proben wurden anschließend gekühlt und zur Analyse gebracht. Die Betrachtung und Auswertung der Versuche erfolgte am Elektronenmikroskop LIBRA 120p der Universitätshautklinik Tübingen in Kooperation mit zuständigen Mitarbeitern.

4.10 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurde bei einfachen Vergleichen der Wilcoxon-Rangsummen-Test oder der Students t-Test verwendet. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde ein *one way* ANOVA mit post-hoc Test verwendet. Die

Berechnung wurde mit der Software *GraphPad Prism 5.0* für Windows durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant erachtet. Die im Text aufgeführten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

5 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse und z.T. auch die dargestellten Abbildungen wurden mit geteilter Erstautorenschaft bereits in folgendem Artikel veröffentlicht: Leiber A, Schwarz J, Köstlin N, Spring B, Fehrenbach B, Katava N, Poets CF, Gille C., Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with *Escherichia coli*. *Eur J Immunol*, 2017. 47(6): p. 1009-1021 [85]. Es erfolgte freundlicherweise die Genehmigung des *European Journal of Immunology* die hier dargestellten Abbildungen benutzen zu dürfen.

5.1 Flussdiagramm der Arbeitsschritte

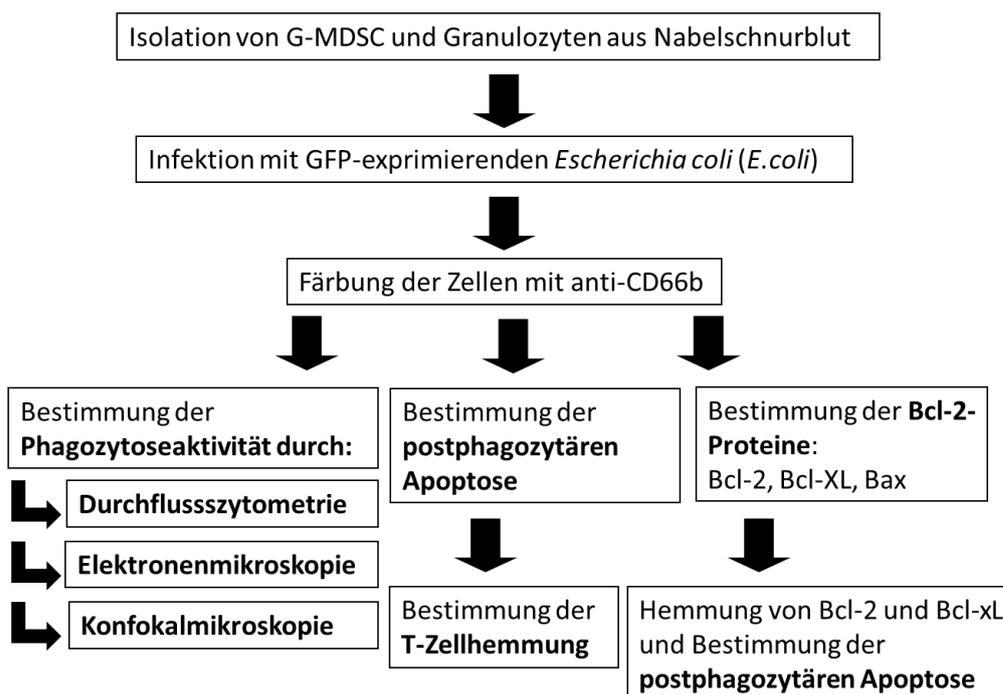


Abb. 2: Flussdiagramm der einzelnen Arbeitsschritte. Ziel war es in *in vitro* Versuchen die bakterielle Phagozytosekapazität und das postphagozytäre Verhalten von G-MDSC im Vergleich zu Granulozyten zu bestimmen. Hierzu erfolgte die Identifikation bzw. Isolation von G-MDSC und Granulozyten aus humanem Nabelschnurblut mittels eines CD66b-Antikörpers. Anschließend erfolgte die Ko-kultivierung mit *E. coli*. In den darauf folgenden Schritten wurde entweder (1) die Phagozytosekapazität, (2) die postphagozytäre Apoptose, (3) die postphagozytäre T-Zellhemmung durch die Zellen und (4) die postphagozytäre Expression von Bcl-2-Proteinen analysiert.

5.2 G-MDSC besitzen eine vergleichbare Phagozytoserate wie reife Granulozyten

Die Ergebnisse zeigten, dass G-MDSC in der Lage sind Phagozytose zu betreiben. In Abb. 3A und 3B sind repräsentative *density-plots* der Phagozytose von G-MDSC (A) und Granulozyten (B) zu sehen. Abb. 3C zeigt die Phagozytoserate von G-MDSC und Granulozyten im Vergleich. Die Phagozytoserate von G-MDSC und Granulozyten für *E. coli* waren nicht unterschiedlich (38,0%±18,6% vs. 38,6%±11,7%, n=10, p>0,05, Abb. 3C).

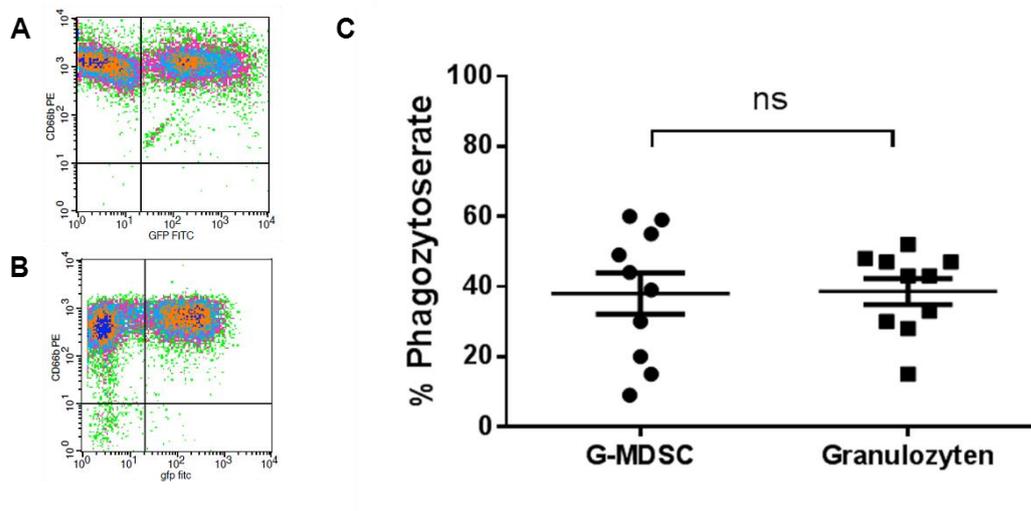


Abb. 3: Die Phagozytoseaktivitäten von G-MDSC und reifen Granulozyten sind sehr ähnlich. Nach einstündigen Inkubationen mit fluoreszierenden GFP-exprimierenden *E. coli* erfolgten die durchflusszytometrischen Messungen der Phagozytoseraten (C) von G-MDSC (A) und Granulozyten (B). Darstellung exemplarischer *Dotplots* der Phagozytose von *E. coli* durch G-MDSC (A) bzw. Granulozyten (B) (n=10, p>0,05, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*). (modifiziert nach [85]).

Durch diese Versuche konnte erstmals gezeigt werden, dass G-MDSC die Fähigkeit besitzen, nicht nur Mikropartikel, sondern auch Bakterien zu phagozytieren.

5.3 MDSC und Granulozyten können *E. coli* phagozytieren - Nachweis durch Konfokalmikroskopie

Abb. 4 zeigt ein *Z-stack* mit mehreren G-MDSC im Bildausschnitt. Die sechs Bilder (A-F) zeigen von oben nach unten gehend sechs verschiedene Schnittebenen des Präparats. In den Bildern A-F ist am linken Bildrand eine Zelle zu erkennen (in Bild c mit einem roten Pfeil markiert). Man sieht zusätzlich zur Blaufärbung des Zellkernes durch DAPI die kreisförmigen gelb dargestellten Signale der CD66b-Färbung und zwei stabförmige grün dargestellte GFP-Signale der *E. coli* Bakterien. Diese GFP-Signale werden von den gelben CD66b-Signalen umschlossen. Da CD66b ein Oberflächenantigen darstellt konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Bakterien tatsächlich intrazellulär lokalisiert waren. Des Weiteren fiel auf, dass neben G-MDSC noch andere Zelltypen (nur Blaufärbung durch DAPI, aber keine Gelbfärbung durch CD66b) ebenso grüne GFP-markierte *E. coli* phagozytiert hatten. Zu sehen ist dies zum Beispiel in Bild A-D am unteren mittigen Bildrand. Vermutlich handelte es sich bei diesen Zellen um Monozyten oder um MDSC mit einem CD66b-Expressionsniveau unterhalb der mikroskopischen Erfassungsgrenze.

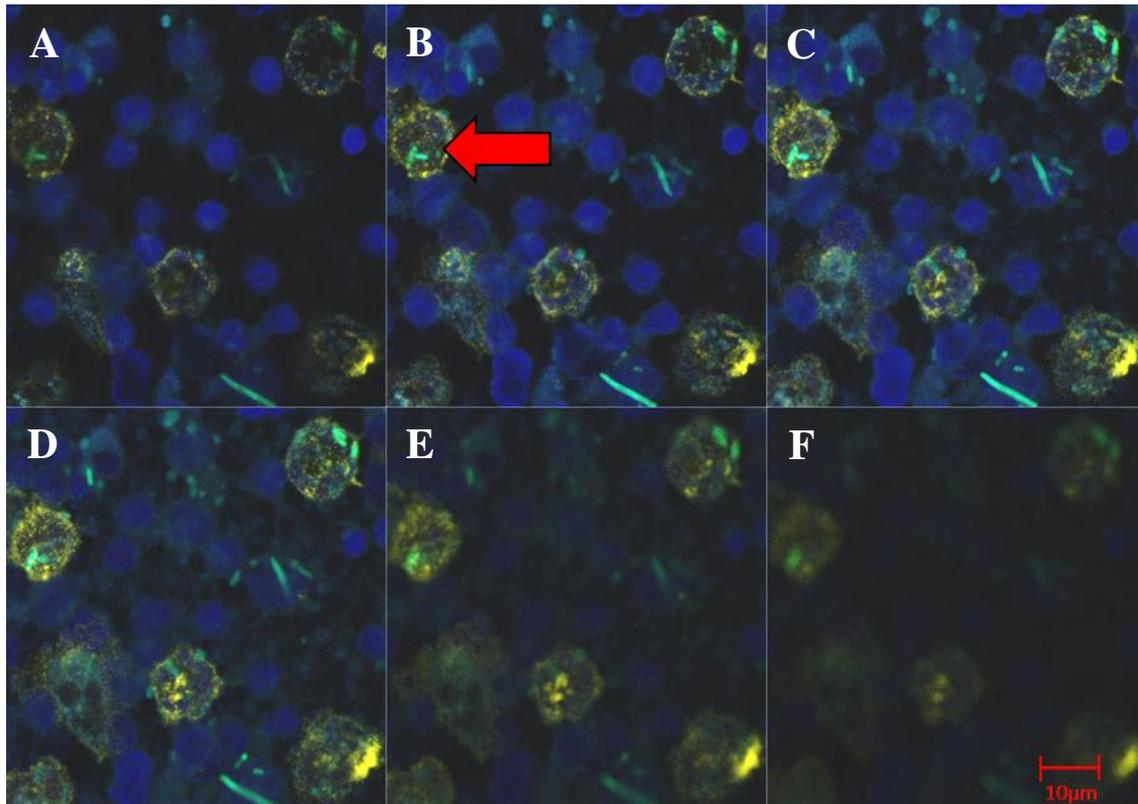


Abb. 4: Konfokalmikroskopischer Phagozytosenachweis von G-MDSC. Sechs konfokalmikroskopische Stapelaufnahmen der gleichen Zellen. Aufgereinigte G-MDSC wurden zuvor mit GFP-markierten *E. coli* (grün) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit DAPI (blau) und anti-CD66b PE (gelb) gefärbt. Der rote Pfeil markiert eine Zelle mit einem mittig liegenden blauen rundlichen DAPI-Signal und mit 2 länglichen grünen GFP-Signalen. Diese werden von einem kreisrunden gelben CD66b-Signal umschlossen. Es handelte sich um eine MDSC-Zelle welche zwei *E. coli* Bakterien phagozytiert hatte. Maßstab: 10µm

Für Abb. 5 wurden Granulozyten unter dem Konfokalmikroskop analysiert. In Bild B-D sind am linken oberen Bildrand bzw. am rechten mittigen Bildrand eine Blaufärbung des Zellkernes durch DAPI, die kreisförmigen gelb dargestellten Signale der CD66b-Färbung und stabförmige grün dargestellte GFP-Signale der *E. coli* Bakterien zu sehen. Auch hier werden die GFP-Signale von den gelben DC66b-Signalen umschlossen, wodurch die intrazelluläre Lokalisation der *E. coli* bestätigt wird (siehe roter Pfeil). Man beobachtet bei fast allen blauen DAPI-Signalen auch ein rundes, das blaue Signal umschließende, gelbe CD66b-Signal. Das heißt, dass nahezu jede Zelle CD66b positiv war und damit als Granulozyt identifiziert werden konnte. Die konfokalmikroskopischen Daten können also die angestrebte Reinheit von über 90%

Granulozyten, durch die zuvor stattgefundene Aufreinigung der Granulozyten durch Dichtegradientenzentrifugation bestätigen.

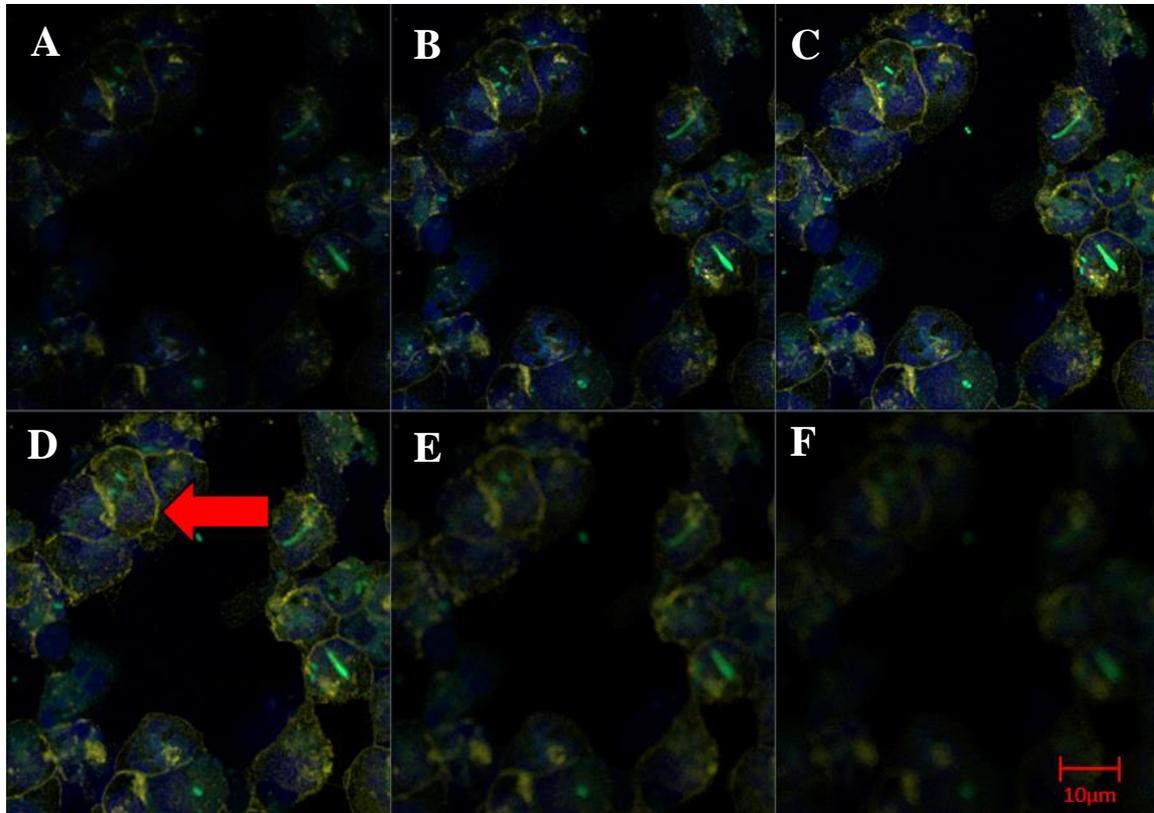


Abb. 5: Konfokalmikroskopischer Phagozytosenachweis von reifen Granulozyten. Sechs konfokalmikroskopische Stapelaufnahmen der gleichen Zellen. Aufgereinigte Granulozyten wurden zuvor mit GFP-markierten *E. coli* (grün) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit DAPI (blau) und anti-CD66b PE (gelb) gefärbt. Der rote Pfeil markiert eine Zelle mit einem mittigen blauen rundlichen DAPI-Signal und mit 2 länglichen grünen GFP-Signalen. Diese werden von einem kreisrunden gelben CD66b-Signal umschlossen. Es handelte sich um einen Granulozyten, welcher zwei *E. coli* Bakterien phagozytiert hatte. Maßstab: 10 μm .

Bei der „*maximum intensity projection*“ (Abb. 6) werden jeweils die sechs Bilder des *Z-stacks* digital übereinander gelegt und zu einem noch kontrastreicherem Bild zusammengeführt. Dies erlaubt eine noch detailliertere Analyse der phagozytierten Bakterien. Wie in Abb.4 und Abb.5 dargestellt sieht man jeweils in der rechten oberen Bildhälfte durch den roten Pfeil markiert, zusätzlich zur Blaufärbung des Zellkerns durch DAPI die kreisförmigen gelb dargestellten Signale der CD66b-Färbung und zwei stabförmige grün dargestellte GFP-Signale der *E. coli* Bakterien. Diese GFP-Signale

werden von den gelben CD66b-Signalen umschlossen und erlaubten somit die Annahme, dass sich die Bakterien intrazellulär lokalisiert waren.

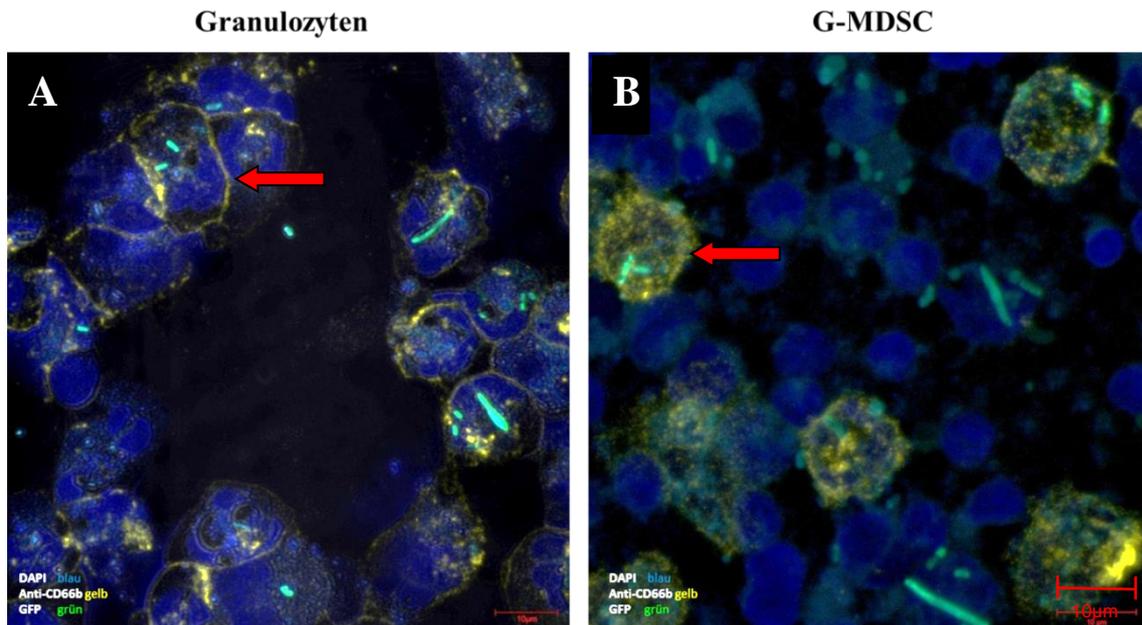


Abb. 6: *Maximum intensity projection* Modus zur verdeutlichten Darstellung, dass reife Granulozyten (A) und G-MDSC (B) *E. coli* internalisieren können. Aufgereinigte Granulozyten und G-MDSC wurden jeweils zuvor mit GFP-markierten *E. coli* (grün) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit DAPI (blau) und anti-CD66b PE (gelb) gefärbt. Rote Pfeile markieren mehrfach markierte Zellen (Bakterien in CD66b+Zellen). Maßstab: 10 µm. (modifiziert nach [85]).

5.4 MDSC und Granulozyten können *E. coli* phagozytieren - Nachweis durch Elektronenmikroskopie

Sowohl FACS- wie auch die mikroskopische CLSM-Analyse ließen die Frage von submikroskopischen Unterschieden der Phagozytose von G-MDSC und reifen Granulozyten offen. Durch die elektronenmikroskopische Analyse sollte zusätzlich geklärt werden, ob die Bakterien nicht nur internalisiert wurden, sondern ob es auch zu der Bildung von Phagolysosomen und einer Degradierung der Bakterien in diesen kommen würde. Ein Phagolysosom lässt sich morphologisch anhand seiner Granularität, der heterogenen Strukturierung und der relativ einheitlichen Größe von 200-300 nm identifizieren [50, 53]. Mit dem *-Zeichen markiert sieht man in Abb. 7A am linken mittigen Bildrand und auch in Abb. 7B am rechten mittigen Bildrand jeweils ein Phagolysosom. Darin lokalisiert sind jeweils quer angeschnittene *E. coli* zu sehen (in Abb. 7A ein *E. coli* und in Abb. 7B zwei *E. coli*). Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten also, dass sowohl G-MDSC (Abb. 7 B) als auch reife Granulozyten (Abb. 7A) Phagolysosomen mit *E. coli* ausbilden. Sowohl in Abb. 7A und 7B sind in den Phagolysosomen weitere kleinere Partikel zu sehen. Diese lassen vermuten, dass die sich in den Phagolysosomen befindlichen Bakterien degradiert und folglich abgebaut wurden.

5.5 G-MDSC sind morphologisch unreifer als Granulozyten

Außerdem konnten weitere morphologische Charakteristika von G-MDSC bestimmt werden. Die Zellkerne sind jeweils mit einem *-Zeichen markiert. Abb. 7A zeigt einen reifen Granulozyten mit ausgeprägter Segmentierung des Kerns, wohingegen die G-MDSC in Abb. 7B und Abb. 7C einen eher nierenförmigen Kern aufweisen. Durch die dargestellten Bilder wird beispielhaft gezeigt, dass G-MDSC eine deutlich geringere Kernlappung aufwiesen als Granulozyten. Dies spricht für eine geringere Reife von G-MDSC und unterstützt die Hypothese, dass es sich bei G-MDSC um unreife Vorläufer von Granulozyten handelt.

5.6 Keine Beeinträchtigung der Phagozytoserate durch assoziierte Microbeads

Um zu untersuchen, ob die Bindung von eisenhaltigen CD66b-Antikörper-*Microbead*-Komplexen, die für die MACS-basierte Zellanreicherung eingesetzt werden mussten, - zur Beeinflussung der Bindung und Internalisierung von *E. coli*-GFP führte, wurde eine Elementanalyse durchgeführt. Abb. 7D zeigt eine Elementanalyse bezogen auf Eisen. Man sieht am rechten Bildrand an der Membran der Zelle rote Signale (zusätzlich mit \$ markiert). Diese befinden sich zum Großteil am rechten Rand der Zellmembran und sind somit extrazellulär lokalisiert. Durch die Eisen-spezifische Elementanalyse konnte bestätigt werden, dass es sich bei den schwarzen Profilen tatsächlich um die eisenhaltigen *Microbeads* handelte. Aufgrund der sehr geringen Größe im Vergleich zu den Bakterien ist eine Beeinträchtigung der bakteriellen Phagozytose durch die *Microbeads* entsprechend unwahrscheinlich.

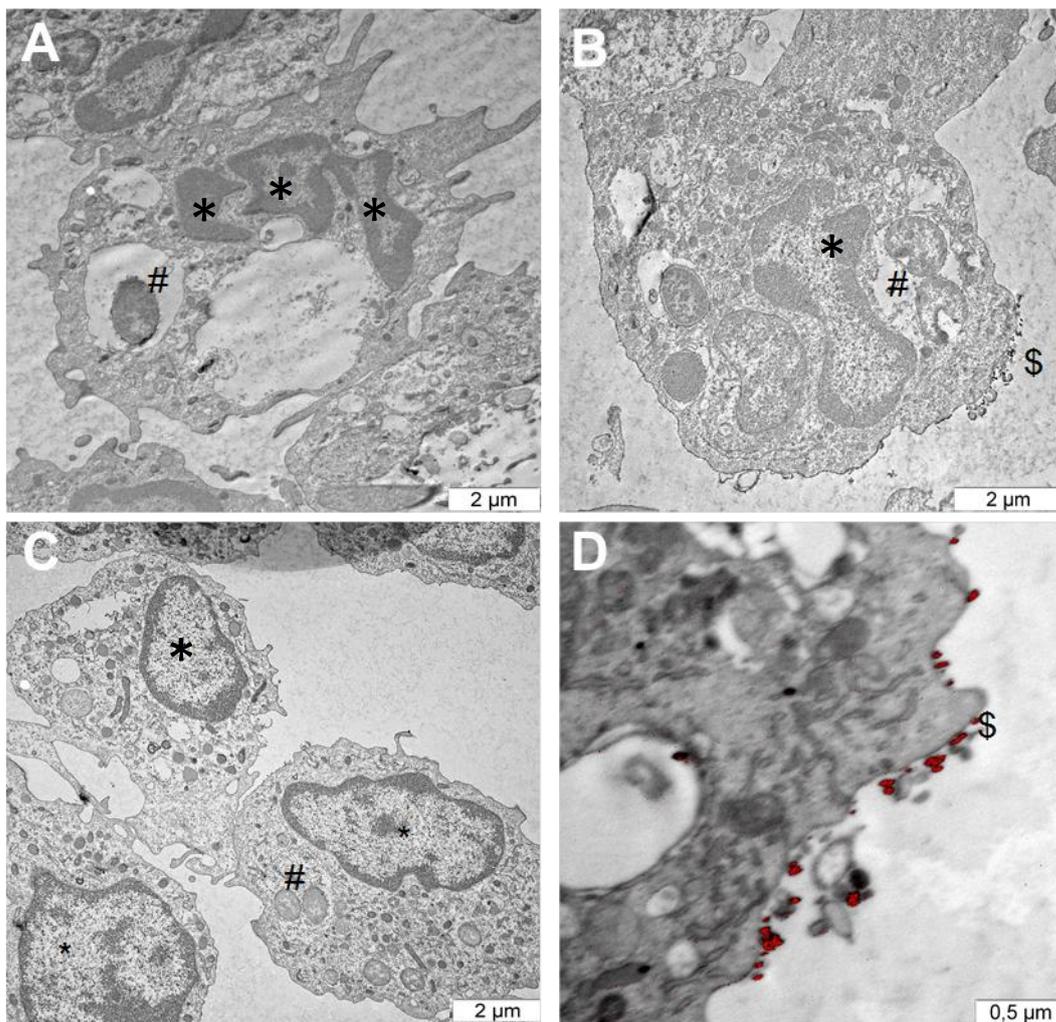


Abb. 7: G-MDSC und Granulozyten können Bakterien in Phagolysosomen aufnehmen und dort abbauen. Granulozyten und G-MDSC wurden jeweils zunächst mit *E. coli* für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mittels Karnovskylösung, Schneiden der Proben und Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Granulozyten (A) und G-MDSC (B), mit phagozytierten *E. coli* Bakterien (modifiziert nach [85]). G-MDSC zeigen in der Regel eine geringere Kernlappung (C) Nachweis von Eisenpartikeln mittels Elementanalyse auf der Zelloberfläche (D). #Phagolysosom, *=Zellkern, \$=Microbeads. (modifiziert nach [85]).

Zusammenfassend zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass 1) G-MDSC und Granulozyten Bakterien in Phagolysosomen aufnehmen und verdauen können, 2) dass MDSC aufgrund ihrer geringeren Kernlappung aber sonst großen morphologischen Ähnlichkeit als unreife Vorstufen von Granulozyten gedeutet werden

können und dass 3) *Microbeads* die Phagozytose von *E. coli* wahrscheinlich nicht behindern.

Zusammenfassend konnten wir mittels quantitativer und qualitativer Analysetechniken zeigen, dass Granulozyten und granulozytäre MDSC aus Nabelschnurblut in der Lage sind *E. coli* zu internalisieren, in ein Phagolysosom aufzunehmen, zu verdauen und dass beide Zelltypen quantitativ eine vergleichbare Phagozytosefähigkeit besitzen.

5.7 G-MDSC haben eine geringere spontane und postphagozytäre Apoptoserate als reife Granulozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Granulozyten und G-MDSC vergleichbare Phagozytoseraten hatten, wurde im Folgenden vergleichend der postphagozytäre Zelltod beider Zellgruppen untersucht. Abb. 8A zeigt die Spontanapoptoserate von G-MDSC und Granulozyten nach 1, 4 und 16 Stunden. Während an den frühen Zeitpunkten (1h, 4h) kein Unterschied zwischen G-MDSC und Granulozyten ermittelt werden konnten (t=1h: $2,6\% \pm 1,9\%$ vs. $2,7\% \pm 2,5\%$, n=5, $p > 0,05$ und t=4h: $4,3\% \pm 2,4\%$ vs. $5,5\% \pm 4,6\%$, n=5, $p > 0,05$, Abb. 8A), zeigte sich ein Unterschied nach 16 Stunden ($10,7\% \pm 7,1\%$ vs. $28,2\% \pm 9,7\%$, n=5, $p < 0,05$, Abb. 8A). Hier kam es zu einer deutlich geringeren Spontanapoptoserate von G-MDSC im Vergleich zu Granulozyten [85].

Anders als bei der Spontanapoptose zeigte sich bei der postphagozytären Apoptose zu allen Zeitpunkten ein Unterschied zwischen der Apoptose von G-MDSC und Granulozyten. Eine Stunde *post infectionem* wurden weniger apoptotische G-MDSC als Granulozyten gemessen ($3,8\% \pm 2,2\%$ vs. $11,9\% \pm 6,9\%$, n=5, $p > 0,05$, Abb. 8B). Diese Tendenz war auch vier Stunden *post infectionem* deutlich zu erkennen, jedoch weiterhin ohne einen signifikanten Unterschied zu ergeben ($12,7\% \pm 5,2\%$ vs. $29,4\% \pm 24,0\%$, n=5, $p > 0,05$, Abb. 8B). Ein signifikanter Unterschied ergab sich indessen nach einer 16-stündigen Kultivierung der Zellen ($30,3\% \pm 12,2\%$ vs. $64,7\% \pm 26,5\%$, n=5, $p < 0,05$, Abb. 8B) [85].

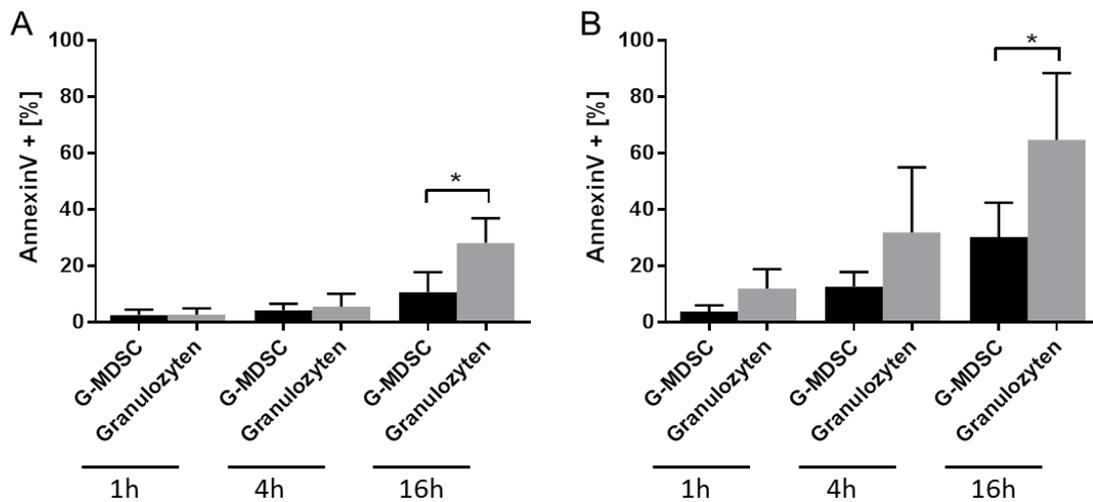


Abb. 8: G-MDSC haben eine geringere spontane und post-phagozytäre Apoptoserate als Granulozyten. G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (A) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (B) kultiviert. Messung der apoptotischen Zellen mittels einer AnnexinV-Färbung erfolgte durchflusszytometrisch 1, 4 und 16 Stunden post infectionem (p.i.) (n=5, $p > 0,05$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test) (modifiziert nach [85]).

5.8 G-MDSC haben eine verminderte spontane und postphagozytäre Apoptosegeschwindigkeit im Vergleich zu reifen Granulozyten

Um die Geschwindigkeit der Apoptoseinduktion zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen mit Annexin-V als Marker früher Apoptose und 7-AAD als Marker später Apoptose durchgeführt. Die Quantifizierung früher Apoptosestadien ergab nach 16-stündiger Inkubationszeit eine geringere Apoptoserate bei G-MDSC, sowohl in nicht-infizierten ($10.7 \pm 7.1\%$ vs. $28.2 \pm 8.7\%$, $n=6$, $p < 0.05$, Abb. 9A) als auch in infizierten Proben ($12.7 \pm 5.2\%$ vs. $31.9 \pm 23.0\%$, $n=6$, $p < 0.05$, Abb. 9A) im Vergleich zu Granulozyten. Die Quantifizierung später Apoptosestadien ergab, dass die Apoptoserate in nicht-infizierten als auch in infizierten G-MDSC weiterhin gering blieb, während es im Vergleich zu G-MDSC zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate in infizierten Granulozyten kam ($30.3 \pm 12.2\%$ vs. $64.7 \pm 23.7\%$, $n=6$, $p < 0.05$, Abb. 9B) [85].

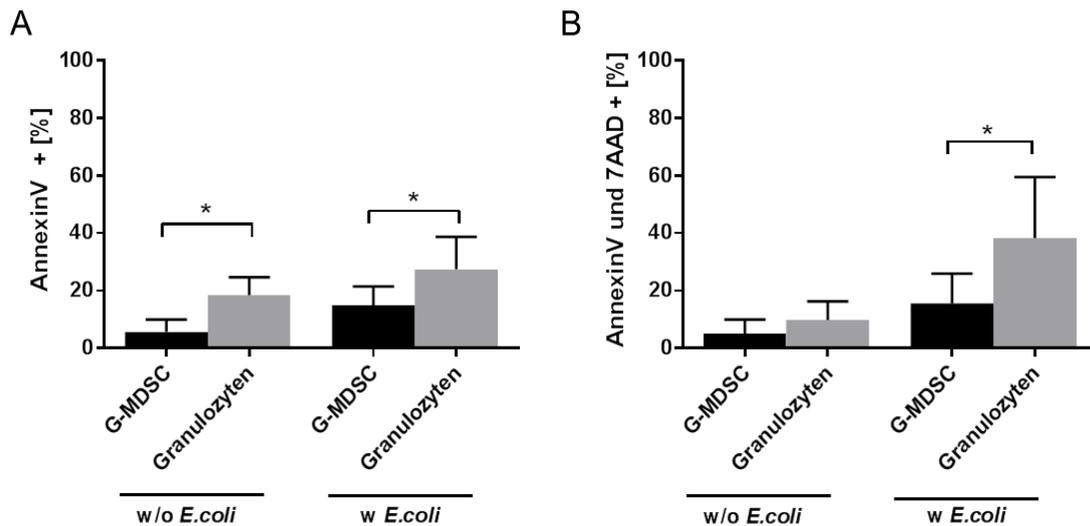


Abb. 9: Die Apoptosegeschwindigkeit nach Phagozytose von *E. coli* ist in G-MDSC im Vergleich zu reifen Granulozyten vermindert. G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (w/o *E. coli*) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (w *E. coli*) für weitere 16 Stunden kultiviert. Färbung entweder mit AnnexinV zur Bestimmung der frühapoptischen Zellen (A) oder mit AnnexinV und 7AAD zur Bestimmung der spätapoptischen Zellen (B) und durchflusszytometrische Messung. (n=6, p>0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test) (modifiziert nach [85]).

5.9 *Bystander*-G-MDSC haben geringere Apoptose als *bystander*-Granulozyten

Die in Abb. 10 dargestellte Quantifizierung der Apoptose von Zellen, welche selbst keine Bakterien phagozytiert hatten, sogenannte *bystander*-Zellen, ergab eine signifikant verminderte Apoptose von *bystander*-G-MDSC im Vergleich zu *bystander*-Granulozyten (8,5%±2,8% vs. 19,6%± 9,8%, n=5, p<0,05, Abb. 10).

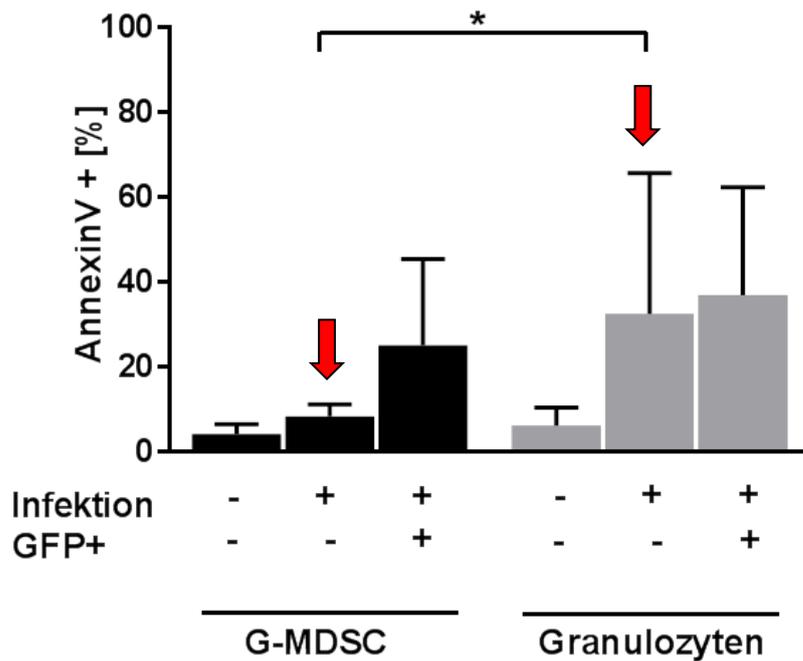


Abb. 10: Die Apoptose von *bystander* G-MDSC ist vermindert. G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* für weitere 4 Stunden kultiviert: ohne Kontakt zu Bakterien (- -), als *Bystander* (+ -, zusätzlich mit Pfeil markiert) oder nach Phagozytose von *E. coli*-GFP (+ +). Färbung mit AnnexinV zur Bestimmung der frühapoptischen Zellen und durchflusszytometrische Messung. (n=6, p>0,05, one way ANOVA).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass G-MDSC nach 16 Stunden eine signifikant geringere Spontanapoptoserate als Granulozyten aufweisen, nach Phagozytose von *E. coli* eine signifikant geringere Apoptoserate haben und postphagozytär langsamer auf Apoptosereize reagieren. Zudem ist die *Bystander*-Apoptose der MDSC im Vergleich zu reifen Granulozyten reduziert.

5.10 G-MDSC exprimieren basal und postphagozytär mehr Bcl-2 als reife Granulozyten

Um die Unterschiede in den Apoptoseraten von G-MDSC und reifen Granulozyten näher zu untersuchen, wurde die Expression von Bcl-Proteinen durchflusszytometrisch quantifiziert.

In Abb. 11A ist der prozentuale Anteil von Bcl-2 exprimierenden G-MDSC und Granulozyten dargestellt. Ohne Ko-Kultivierung mit *E. coli* exprimierte bei G-MDSC ein höherer Anteil der Zellen Bcl-2 als bei Granulozyten ($82,8\% \pm 14,7\%$ vs. $60,0\% \pm 17,5\%$, $n=5$, $p < 0,05$, Abb. 11A). Nach einstündiger Infektion mit *E. coli* sank die Bcl-2 Expression bei Granulozyten im Vergleich zu der basalen Expression ($60,0\% \pm 17,5\%$, vs. $35,6\% \pm 14,5\%$, $n=5$, $p < 0,05$, Abb. 11A). Diese Reduktion war bei G-MDSC nicht zu beobachten ($82,8\% \pm 14,7\%$ vs. $79,0\% \pm 17,1\%$, $n=5$, $p > 0,05$, Abb. 11A). Folglich kam es im Vergleich von G-MDSC und Granulozyten nach Phagozytose zu einem noch deutlicheren Unterschied der Bcl-2 Expression ($79,0\% \pm 17,1\%$, vs. $35,6\% \pm 14,5\%$, $n=5$, $p < 0,0005$, Abb. 11A). Nach fünfstündiger Kultur waren bei nicht-infizierten und infizierten Zellen keine Unterschiede im Anteil Bcl-2-exprimierender G-MDSC und Granulozyten mehr messbar.

Zudem wurde die Bcl-2-Menge pro Zelle ermittelt. Nach einstündiger Inkubation war die Expression von Bcl-2 pro Zelle bei nicht-infizierten ($22,6 \pm 4,4$ MFI vs. $10,1 \pm 1,1$ MFI $n=5$, $p < 0,05$, Abb. 11B) und infizierten G-MDSC ($23,5 \pm 11,1$ MFI vs. $7,1 \pm 2,0$ MFI, $n=5$, $p < 0,05$, Abb. 11B) im Vergleich zu Granulozyten deutlich erhöht. Durch eine einstündige Infektion mit *E. coli* kam es weder bei G-MDSC noch bei Granulozyten zu einer Veränderung der Bcl-2-Menge pro Zelle. Nach fünfstündiger Kultur waren bei nicht-infizierten und infizierten Zellen keine Unterschiede in der Bcl-2 Menge pro Zelle in G-MDSC und Granulozyten mehr messbar.

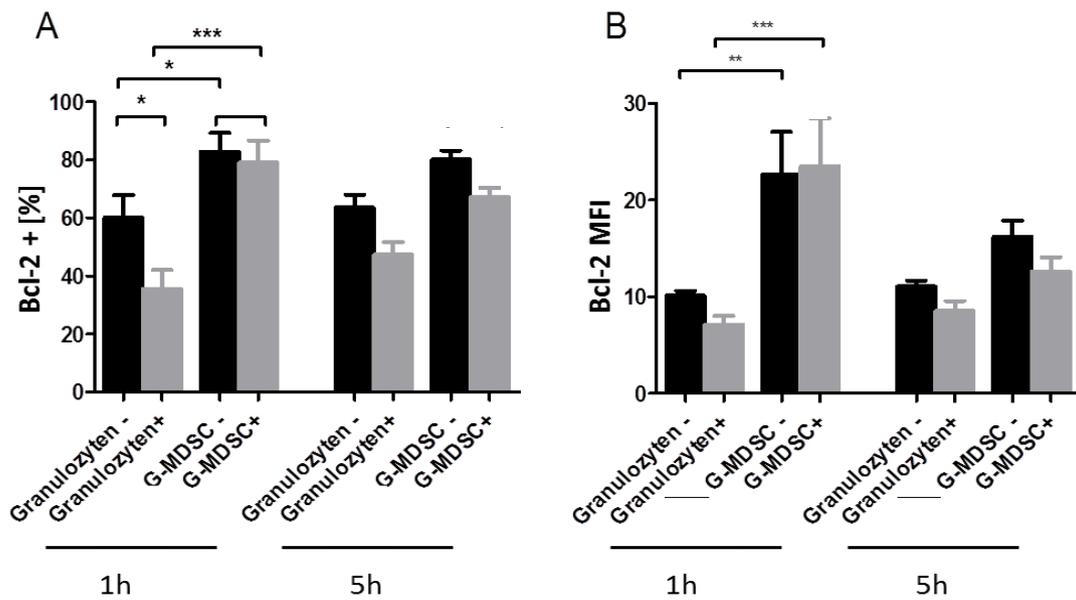


Abb. 11: G-MDSC exprimieren basal und postphagozytär mehr antiapoptisches Bcl-2 als Granulozyten. G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (-) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (+) entweder direkt gemessen oder für 4 Stunden kultiviert. Färbung mit Zellen auf Bcl-2 und anschließende durchflusszytometrische Messung des prozentual exprimierten Anteils von Bcl-2 auf den Zellen (A), sowie der absoluten Bcl-2 Menge pro Zelle (MFI) (B) auf G-MDSC und Granulozyten. Schwarz = basal, grau = postphagozytär. (n=5, p>0,05, one way ANOVA) (modifiziert nach [85]).

5.11 Keine Unterschiede in der Expression von Bcl-xL und Bax zwischen G-MDSC und reifen Granulozyten

Bei beiden Zelltypen waren Bcl-xL und Bax in 100% der Zellen exprimiert. Es wurde keine Veränderung nach Phagozytose beobachtet. Auch in der Menge (MFI) gab es weder basal noch postphagozytär einen Unterschied zwischen G-MDSC und Granulozyten (Abb. 12).

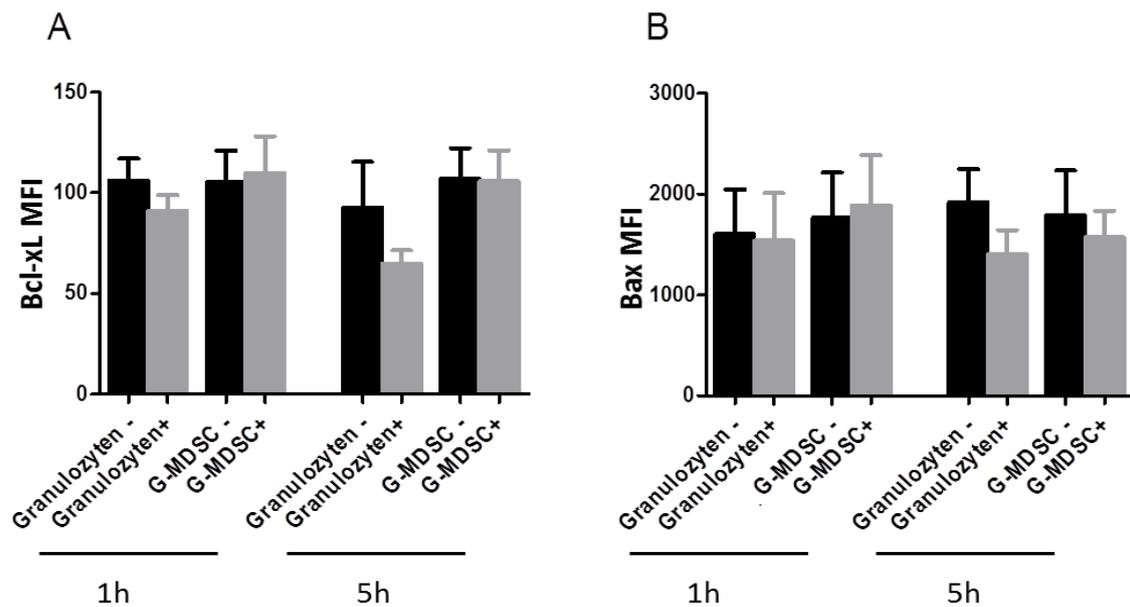


Abb. 12: Die Expression von Bcl-xL und Bax ist in G-MDSC und Granulozyten ähnlich. G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (-) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (+) entweder direkt gemessen oder für 4 Stunden kultiviert. Färbung mit Zellen auf Bcl-xL (A) oder Bax (B) und anschließende durchflusszytometrische Messung der absoluten Menge pro Zelle. Schwarz = basal, grau = postphagozytär. (n=5, p>0,05, one way ANOVA) (modifiziert nach [85]).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die basale und postphagozytäre prozentuale Bcl-2 Expression von G-MDSC signifikant höher war als bei Granulozyten. Bei G-MDSC nahm im Gegensatz zu Granulozyten die postphagozytäre Bcl-2 Expression langsamer ab. Zudem war die basale und postphagozytäre absolute Bcl-2 Menge pro Zelle (MFI) von G-MDSC signifikant höher als bei Granulozyten. Keine Unterschiede zeigten sich in der basalen und postphagozytären Bcl-xL und Bax Expression.

5.12 Inhibition von Bcl-2 durch den Bcl-Inhibitor ABT 737 führt zu Erhöhung der Spontanapoptose von G-MDSC

Um zu beweisen, dass die erhöhte Expression von Bcl-2 der Grund für die reduzierte und verlangsamte postphagozytäre Apoptose war, wurden die anti-apoptotischen Bcl-Proteine Bcl-2 und Bcl-xL mit einem Inhibitor (ABT-737) gehemmt. Hiermit sollte getestet werden, ob dadurch die Apoptoserate der G-MDSC gesteigert werden konnte

und es dadurch eventuell zu einer Angleichung der Apoptoserate der G-MDSC an die der Granulozyten kommen würde. Da in der Expression des Bcl-2-Proteins die größten Unterschiede zwischen G-MDSC und Granulozyten festgestellt wurden, wohingegen sich die Expression von Bcl-xL zwischen G-MDSC und Granulozyten nicht unterschied, lag der Schwerpunkt der Beobachtung auf der Inhibition von Bcl-2.

Zunächst wurde die Auswirkung einer Inhibition von Bcl-2 und Bcl-xL auf die Spontanapoptose von G-MDSC und Granulozyten analysiert. Durch Zugabe von ABT-737 kam es in G-MDSC zu folgenden Steigerungen der Apoptoseraten: nach eine Stunde $2,6\% \pm 1,9\%$, vs. $13,4\% \pm 8,0\%$, $n=5$, $p<0,005$), nach vier Stunden $4,3\% \pm 2,3\%$, vs. $11,8\% \pm 8,0\%$, $n=5$, $p<0,05$ und nach 24 Stunden $10,7\% \pm 7,1\%$, vs. $33,9\% \pm 17,6\%$, $n=5$, $p<0,005$ (Abb. 13A). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für die Granulozyten (Abb. 13B). Allerdings kam es hier eine Stunde ($2,7\% \pm 2,5\%$, vs. $10,7\% \pm 10,9\%$, $n=5$, $p>0,05$) und vier Stunden ($4,5\% \pm 4,4\%$, vs. $12,5\% \pm 12,5\%$, $n=5$, $p>0,05$) nach Beginn der Inkubation, trotz einer starken Tendenz wegen der hohen individuellen Unterschiede zwischen den Versuchen nicht zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Apoptose nach Zugabe des Bcl-Inhibitors. Nur nach 24 Stunden kam es jedoch zu einer signifikanten Differenz ($28,2\% \pm 9,7\%$, vs. $42,9\% \pm 12,7\%$, $n=5$, $p>0,05$).

Wie oben schon gezeigt, wurden nach 24 Stunden weniger G-MDSC apoptotisch als Granulozyten ($10,7\% \pm 7,1\%$ vs. $28,2\% \pm 9,7\%$, $n=5$, $p<0,05$, Abb. 13C). Nach Zugabe des Bcl-Inhibitors wurde die Apoptoserate von G-MDSC auf das Niveau von Granulozyten gesteigert ($33,8\% \pm 17,8\%$ vs. $42,4\% \pm 12,7\%$, $n=5$, $p>0,05$, Abb. 13C).

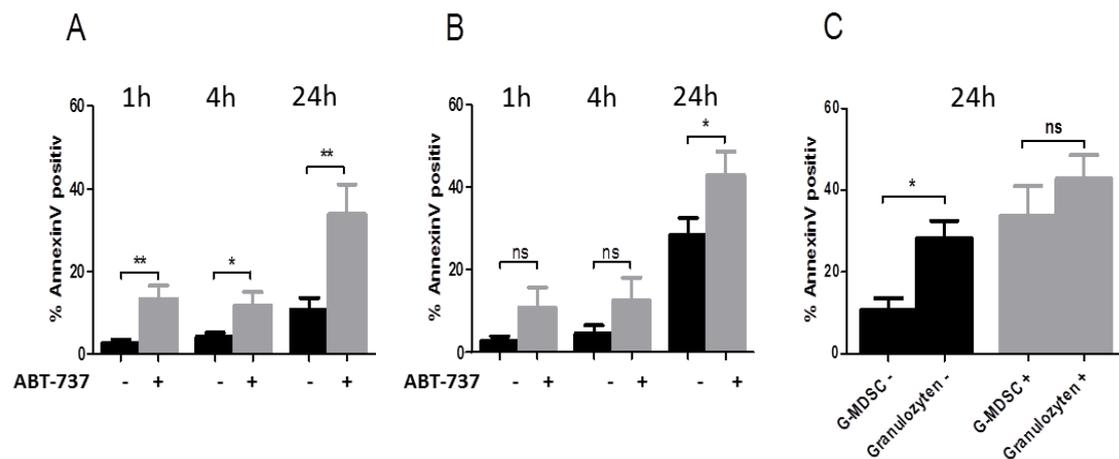


Abb. 13: Der Bcl-2/ Bcl-xL-Inhibitor ABT-737 hemmt den Bcl-2-vermittelten Schutz gegen Spontanapoptose in G-MDSC. G-MDSC (A) und Granulozyten (B) wurden entweder nativ (schwarz) oder nach Zugabe des Bcl-Inhibitors ABT-737 (grau) für 1 Stunde, 4 Stunden oder 24 Stunden kultiviert. Färbung mit AnnexinV zur Bestimmung der Apoptose und durchflusszytometrische Messung. (C) Direkter Vergleich der Spontanapoptose nach 24h von G-MDSC und Granulozyten nativ (schwarz) und nach Inhibitorgabe (grau). (n=5, p>0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test) (modifiziert nach [85]).

5.13 Inhibition von Bcl-2 durch den Bcl-Inhibitor ABT 737 führt zu Erhöhung der postphagozytären Apoptose von G-MDSC

Auch in infizierten G-MDSC steigerte ABT-737 eine Stunde ($3,8\% \pm 2,2\%$, vs. $11,8\% \pm 9,5\%$, n=5, p<0,05), vier Stunden ($12,7\% \pm 5,2\%$, vs. $18,6\% \pm 8,2\%$, n=5, p>0,05) und 24 Stunden ($30,9\% \pm 12,2\%$, vs. $49,2\% \pm 16,2\%$, n=5, p<0,005) nach Infektion mit *E. coli* die Apoptoserate, während ABT-737 in infizierten Granulozyten keinen Effekt hatte (Abb. 14B).

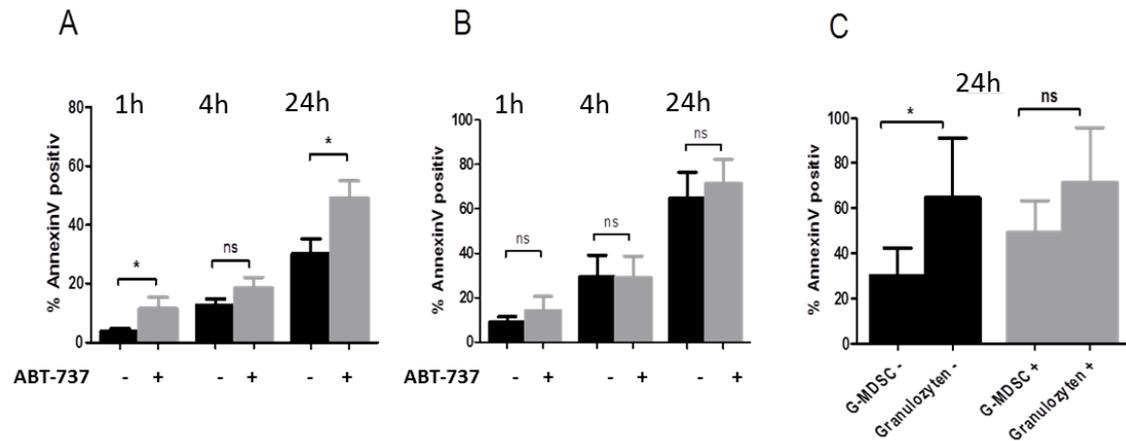


Abb. 14: Der Bcl-2/ Bcl-xL-Inhibitor ABT-737 hemmt den Bcl-2-vermittelten Schutz gegen postphagozytäre Apoptose in G-MDSC. G-MDSC (A) und Granulozyten (B) wurden entweder nativ (schwarz) oder nach Zugabe des Bcl-Inhibitors ABT-737 (grau) für 1 Stunde, 4 Stunden oder 24 Stunden kultiviert. Färbung mit AnnexinV zur Bestimmung der Apoptose und durchflusszytometrische Messung. (C) Direkter Vergleich der postphagozytären Apoptose nach 24h von G-MDSC und Granulozyten nativ (schwarz) und nach Inhibitorgabe (grau). (n=5, $p > 0,05$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test) (modifiziert nach [85]).

Durch den Bcl-Inhibitor ABT-737 konnte die verminderte Spontanapoptose als auch die verminderte postphagozytäre Apoptose von G-MDSC an die der Granulozyten angeglichen werden. Die Inhibition von Bcl-2/ Bcl-xL konnte also die partielle Apoptoseresistenz von G-MDSC wieder aufheben.

5.14 G-MDSC inhibieren auch postphagozytär die T-Zellproliferation

Durch fehlende phänotypische Alleinstellungsmerkmale der G-MDSC wurde zur weiteren Identifikation der G-MDSC ein Nachweis der T-Zellsuppression mit Hilfe eines CFSE-Proliferationsassays durchgeführt. Die Proliferationsrate von PBMC ohne Zugabe von G-MDSC wurde als 100% indexiert. In Abb. 15A sind repräsentative durchflusszytometrische Dotplots dargestellt. Abb. 15B zeigt den Proliferationsindex $CD4^+$ -T-Zellen. Der T-Zellproliferationsindex war bei Ko-kultivierung mit G-MDSC im Verhältnis 4:1 im Vergleich zum T-Zellproliferationsindex ohne G-MDSC reduziert (0.64 ± 0.13 , n=4, $p < 0.05$ vs. keine Ko-kultivierung Abb. 15A, B). Eine Ko-kultivierung

mit Granulozyten hatte keinen Effekt (0.86 ± 0.11 , $n=4$, $p > 0.05$ vs. keine Ko-kultivierung, Abb. 15A, B). Die suppressiven Eigenschaften der G-MDSC verstärkten sich nach Infektion mit *E. coli* (0.53 ± 0.27 , $n=4$, $p < 0.05$ vs. keine Ko-kultivierung, $p > 0.05$ vs. G-MDSC, Abb. 15A, B).

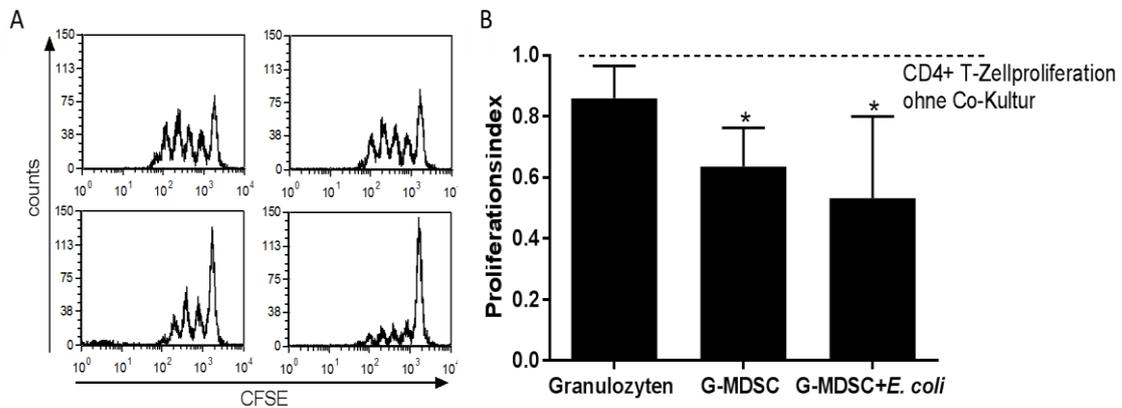


Abb. 15: G-MDSC verlieren auch nach Phagozytose ihre Fähigkeit zur T-Zellhemmung nicht. CBMC wurden mit CFSE gefärbt, mit OKT-3 und Interleukin-2 stimuliert und jeweils im Verhältnis 4:1 entweder mit Granulozyten (A, oben rechts), G-MDSC (A, unten links) oder mit G-MDSC, welche mit *E. coli* infiziert wurden (A, unten rechts) ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten CBMC allein (A, oben links). Durchflusszytometrische Messung der T-Zellproliferation nach 3 Tagen. (A) Zeigt repräsentative Histogrammplots (B) zeigt den Proliferationsindex. ($n=5$, $p > 0,05$, one way ANOVA) (modifiziert nach [85]).

G-MDSC waren auch nach Infektion mit *E. coli* in der Lage die T-Zellproliferation zu hemmen.

5.15 Zusammenfassung der Ergebnisse

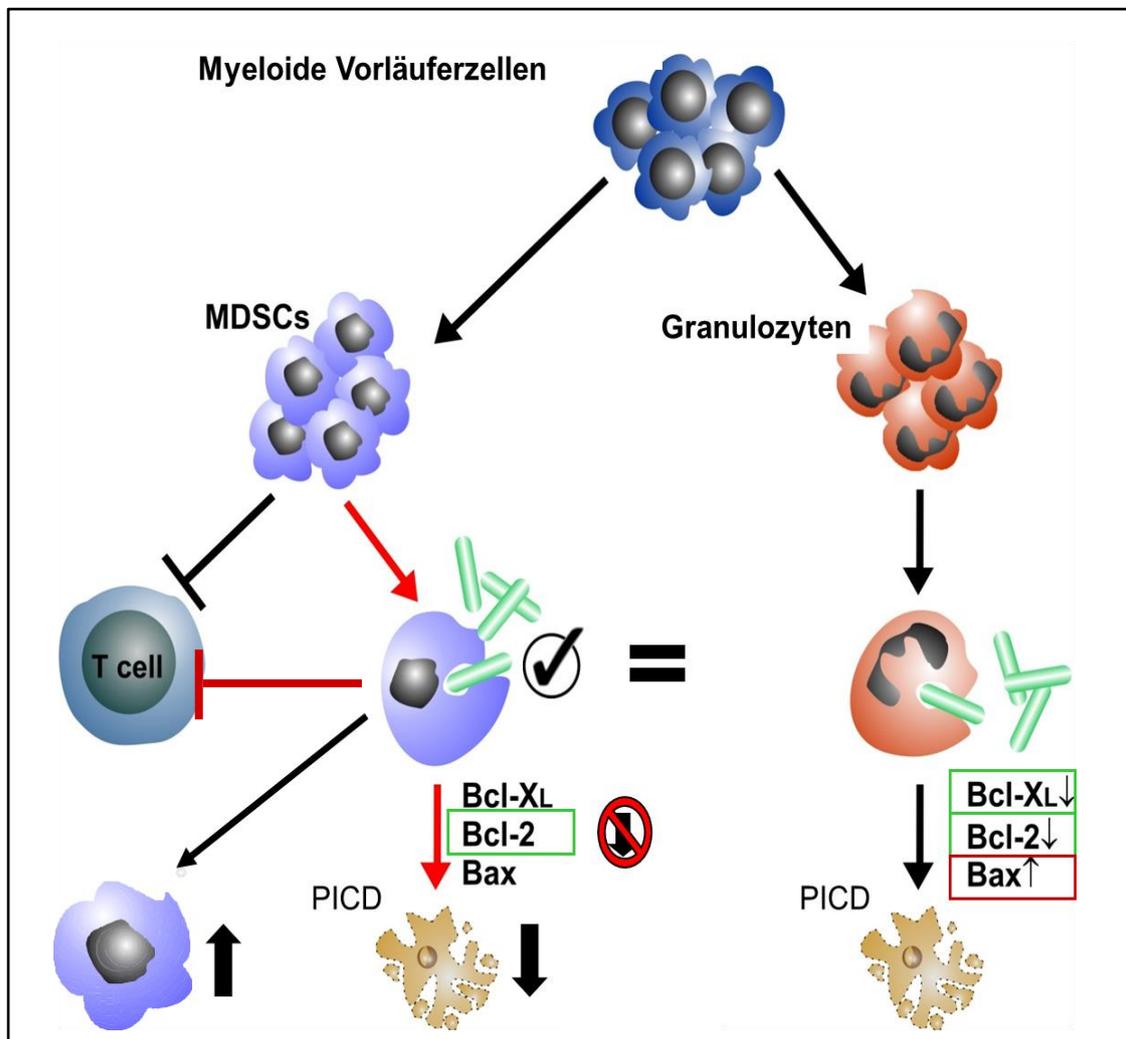


Abb. 16: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse. G-MDSC besitzen die Fähigkeit *E. coli* zu phagozytieren. Durch eine erhöhte Expression von Bcl-2 zeigen G-MDSC eine verminderte und verlangsamte postphagozytäre Apoptose im Vergleich zu reifen Granulozyten. Nach Phagozytose bleibt ihnen die charakteristische Eigenschaft, die T-Zellproliferation zu hemmen, erhalten.

6 Diskussion

In der Literatur, wie auch im Rahmen dieser Arbeit werden MDSC in die Subpopulationen monozytäre „M-MDSC“ und granulozytäre „G-MDSC“ unterteilt. Sollte in der Literatur keine weitere Unterteilung der MDSC vorgenommen worden sein, so wird im Folgenden nur der Begriff „MDSC“ verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass (1) G-MDSC aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener in der Lage sind Bakterien (*E. coli*) zu phagozytieren, eine vergleichbare Phagozytoserate wie reife Granulozyten aufweisen und (2) auch postphagozytär ihre Fähigkeit, die T-Zellproliferation zu inhibieren, aufrechterhalten. (3) Die Spontanapoptose und die postphagozytäre Apoptose der G-MDSC waren im Vergleich zu Granulozyten vermindert. Die mögliche Ursache hierfür könnte die (4) vermehrte Expression des anti-apoptischen Bcl-2 bei G-MDSC sein. (5) Durch die Blockade von Bcl-2 und Bcl-xL konnte die verminderte Apoptose der G-MDSC im Vergleich zu Granulozyten wieder aufgehoben werden.

In unseren Experimenten konnten wir G-MDSC aus dem Nabelschnurblut als potente Phagozyten identifizieren.

Die Phagozytosefähigkeit von MDSC ist bisher in der Literatur wenig beschrieben. Unseres Wissens wurden bisher keine diesbezüglichen Daten bei Neugeborenen publiziert. Maeda et al. Konnten jedoch bereits bei Erwachsenen zeigen, dass humane M-MDSC (CD33⁺ CD14⁺ HLA-DR⁻) in der Lage sind, zytotoxische T-Lymphzyten zu phagozytieren [86]. Poe et al. konnten Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen durch MDSC nachweisen [87]. Je-In Youn et al. hatten die Phagozytosefähigkeit für *Latexbeads* von G-MDSC aus tumortragenden Mäusen beschrieben und mit der von reifen Granulozyten verglichen [35]. Sie konnten nachweisen, dass G-MDSC aus Tumorgewebe und neutrophile Granulozyten aus tumorfreiem Gewebe eine sehr ähnliche Morphologie und einen vergleichbaren Phänotyp zeigten. Beide Zellgruppen waren in der Lage *Beads* zu phagozytieren. Granulozyten wiesen allerdings eine höhere Phagozytoseleistung und eine höhere TNF- α Produktion als G-MDSC auf.

Andere Arbeiten beschrieben im Mausmodell eine Phagozytose von *Mycobacterium tuberculosis* [88] und *Leishmania major* [89] durch MDSC. Eine effiziente Phagozytose mit Degradierung des Erregers konnte allerdings nur bei den Leishmanien nachgewiesen werden. *M. tuberculosis* scheint dabei MDSC als agonistische Nische zu nutzen, indem ein effizienter Abbau unterdrückt wird.

Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsaufbauten mit verschiedenen Spezies und experimentellen Grundbedingungen sind die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten nicht direkt miteinander vergleichbar. Zusammenfassend zeigen die bisher publizierten Daten, dass MDSC unterschiedlicher Herkunft zur Phagozytose fähig sind und dass diese Eigenschaft nicht auf Bakterien beschränkt ist.

Doch warum ist die Phagozytosefähigkeit der G-MDSC eine bemerkenswerte Eigenschaft?

G-MDSC können aktiv bei der Bekämpfung von Pathogenen teilnehmen und scheinen somit ein Teil der Population professioneller Phagozyten zu sein. Dass MDSC bei Sepsis und Trauma nicht nur reine Suppressoren des adaptiven Immunsystems sind, konnten auch Cuenca et al. zeigen, indem sie die Produktion von antimikrobiellen Substanzen und anti-inflammatorischen Zytokinen nachwiesen [39]. Entsprechend könnten MDSC sogar eine protektive Rolle für den Organismus einnehmen. Diese und die hier vorgestellten neuen Ergebnisse ergänzen das Bild der vorwiegend immunsupprimierend wirkenden G-MDSC und erweitern es um eine aktive Funktion in die Erregerbekämpfung.

Während die Phagozytoserate der G-MDSC sich von der der Granulozyten nicht unterschied, konnten signifikante Unterschiede in der spontanen und vor allem in der postphagozytären Apoptose nachgewiesen werden. Verminderte Apoptose von MDSC in einem inflammatorischen Milieu konnte bereits in Tumormodellen in der Maus beschrieben werden [90]. In nicht inflammatorischem Milieu sind allerdings kontroverse Ergebnisse berichtet worden: Condamine et al. zeigten eine erhöhte

Apoptose von MDSC im Vergleich zu PBMC [91]. Im Gegensatz dazu zeigte Hu et al. eine geringere Spontanapoptose in MDSC von tumortragenden Mäusen im Vergleich zu tumorfreien Mäusen [92]. Ein inflammatorisches Milieu scheint in jedem Fall eine tragende Rolle im Überleben von MDSC zu spielen [93].

Als mögliche Ursache für erhöhte Apoptoseresistenz von G-MDSC vermuteten wir eine Dysregulation der Bcl-2-Proteinfamilie. Dieser Hypothese folgend konnten wir als möglichen Grund für die erhöhte Apoptoseresistenz in G-MDSC eine verstärkte Expression von Bcl-2 nachweisen. Interessanterweise nahm die Expression von Bcl-2 auch nach Phagozytose nicht merklich ab. Inhibition von Bcl-2 und Bcl-xL konnte die Apoptoseresistenz der G-MDSC aufheben.

Die hier beobachtete erhöhte Apoptoseresistenz von MDSC steht im Einklang mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Es wurde einerseits eine Imbalance der pro- und anti-apoptotischen Bcl-Proteine diskutiert. Andererseits wurde über eine Dysregulation des Fas/FasL-Signalwegs (so genannter „death pathway“) als mögliche Ursache spekuliert.

Pilon-Thomas et al. zeigen in ihrer Arbeit, dass tumortragende Mäuse eine verminderte Expression von SHIP-1 aufweisen. SHIP-1 ist ein Schlüsselfaktor für Proliferation, Apoptose und Differenzierung. SHIP-knockout Mäuse zeichnen sich durch einen pro-inflammatorischen Phänotyp und vor allem durch eine erhöhte Anzahl von MDSC aus. In der Untersuchung dieser Mäuse war eine Hochregulation von anti-apoptotischem Bcl-2 bei konstanter Expression des pro-apoptotischen Bad zu beobachten. Pilon-Thomas et al. Vermuteten die verminderte Expression von SHIP-1 als Grund für die erhöhte Apoptoseresistenz der MDSC als Ursache [94].

Andere Arbeitsgruppen konnten die zentrale Rolle von Bcl-2 für das Überleben von MDSC verifizieren: Medina-Echeverez et al. zeigten eine erhöhte Expression von Bcl-2a1 mit erhöhtem Überleben und gleichzeitiger suppressiver Aktivität von MDSC in tumortragenden Mäusen. Durch IFN- γ konnte das erhöhte Überleben von MDSC verhindert werden [95].

Wie weiter oben bereits beschrieben, konnten Hu et al. eine signifikant geringere Apoptose von MDSC in Tumormodellmäusen nachweisen [93]. Ursächlich hierfür war eine verminderte Expression des Fas-Rezeptors, von IRF8, pro-apoptotischem Bax und eine Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl-xL. Durch den unspezifischen Bcl-Inhibitor ABT-737 konnte *in vitro* und auch *in vivo* eine erhöhte Fas induzierte Apoptose, eine erhöhte spontane Apoptose und eine verminderte MDSC Akkumulation erreicht werden. Ein dysregulierter Fas-Pfad wurde hier als möglicher Grund für die erhöhte Apoptoseresistenz in Betracht gezogen. Erstaunlicher Weise konnte kein Bcl-2 in Tumor-MDSC detektiert werden. Die Herunterregulierung von IRF8 wurde als möglicher Grund in Erwägung gezogen. Aus diesem Grund machten Hu et al. vor allem Bcl-xL für die verminderte Apoptoserate verantwortlich. Die hier vorgestellten Ergebnisse neonataler G-MDSC zeigten eine Erhöhung von Bcl-2, aber keine Modifikation der Bcl-xL Expression. In dem Perturbationsansatz durch ABT-737 kam es ferner zu einer erhöhten Apoptose der G-MDSC. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob Bcl-xL bei Tumoren die Rolle von Bcl-2 einnimmt, da Bcl-2 als bekannter Tumorpromotor oftmals verändert und damit funktionslos ist [92, 96].

Die Regulation von Bcl-2 Proteinen stellt nur den ersten Schritt der Apoptose dar. Weiterführenden Arbeiten sollten auf *downstream* Phänome der apoptotischen Kaskade fokussieren. Hierzu zählen Änderungen von Membranpotentialen, Expressionniveaus relevanter Caspasen und auch Cytochrom C als zentrales Element des Regulationsweges.

Im nächsten Schritt müsste man nun ergänzend zu den Ergebnissen der Bcl-2-Proteine, welche den intrinsischen Weg der Apoptose darstellen, auch den extrinsischen Weg basierend auf dem Fas/FasL-Signalweg untersuchen. Von besonderem Interesse in diesem Kontext ist die Expression von Fas, interzellulärem FasL und membranständigen FasL auf neonatalen G-MDSC und neonatalen Granulozyten mit und ohne Phagozytose.

In Vorarbeiten mit Monozyten aus Nabelschnurblut konnte bereits gezeigt werden, dass FasL bei der Immunregulation im Neonaten eine Rolle spielen könnte [97]. Sinah und Oststrand et al. untersuchten in einer Reihe von Studien die Rolle des Fas-FasL-Signalwegs bei MDSC. Sie zeigten, dass FasL Apoptose in MDSC induziert, inflammatorisches Milieu jedoch zu einer Apotoseresistenz in MDSC führt [100]. Der Fas/FasL-Signalweg könnte daher auch für die Regulation von MDSC im Neonaten eine regulatorische Rolle spielen.

In unseren Experimenten arbeiteten wir mit dem gram-negativen Bakterium *E. coli*. In Studien mit gram-negativen Sepsismodellen konnten M-MDSC als vorherrschende MDSC-Subgruppe identifiziert werden [98]. Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, da wir im Gegensatz zu den G-MDSC keine Erhöhung der M-MDSC im Nabelschnurblut beobachten konnten. Weitere Experimente unter Einsatz von M-MDSC *E. coli* Ko-kulturen sind anvisiert.

Diese Paradigmen basieren jedoch ausschließlich auf *in vitro* Experimenten. Ergebnisse hieraus können bei einer komplexen immunologischen Situation wie einer Sepsis nicht eins zu eins übernommen werden. Allerdings können *in vitro* Versuche wichtige Hinweise für weiter folgende Studien geben.

Weiterhin verglichen wir im Einklang mit anderen Arbeitsgruppen [99] G-MDSC mit reifen Granulozyten. Ein Vergleich zwischen G-MDSC von Neonaten mit oder ohne Infektion bzw. Sepsis konnten bisher nicht realisiert werden und sollte deshalb in Folgestudien in den Mittelpunkt gerückt werden.

Aktuell ist noch unklar, ob MDSC damit eher positiv oder negativ auf das Outcome einer Infektion bzw. Sepsis wirken. Durch die Immunsuppression könnten sie die nach der initialen Immunantwort folgende Antwort des adaptiven Immunsystems behindern und damit eine Ausbreitung des Pathogens mit dem klinischen Bild einer Sepsis begünstigen. Mit der Unterdrückung des adaptiven Immunsystems könnte aber auch eine überschießende Immunantwort mit Zytokinsturm und massivem Schaden der

einzelnen Organe oder auch des gesamten Organismus im Sinne eines septischen Schocks verhindert werden.

Erste Hinweise, dass MDSC bei der Sepsis eine wichtige Rolle spielen, konnten 2007 durch Delano et al. erbracht werden [100]. Sie zeigten in einer polymikrobiellen Sepsis in der Maus eine Erhöhung von MDSC Zellen in Milz und Knochenmark, welche die T-Zellfunktion blockierten. Weitere darauf aufbauende Studien deuteten auf eine protektive Rolle von MDSC in einem septischen Geschehen. Sander et al. konnten eine erhöhte Mortalität bei Mäusen mit reduzierten MDSC Zahlen zeigen [101]. Interessanterweise konnte dieser protektive Effekt der MDSC auch in einem sterilen Sepsismodell, in welchem mit Hilfe von LPS ein septischer Schock ausgelöst wurde, beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass vor allem die Eindämmung einer überschießenden Inflammation ein wichtiger Teil der MDSC-Funktion sein könnte. Brudecki et al. beobachteten in Mäusen nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch CLP in der frühen Phase der Sepsis ein verbessertes Überleben nach Transfer von aktivierten MDSC aus einem septischen Milieu [102]. Als Grund hierfür vermuteten sie eine Verschiebung des Zytokinprofils in die anti-inflammatorische Richtung. Dieser Effekt zeigte sich allerdings nur beim Transfer von aktivierten MDSC aus der Spätphase einer Sepsis. Transferierte man aktivierte MDSC aus der Frühphase der Sepsis, so konnte kein verbessertes Überleben beobachtet werden. MDSC könnten so für die Verhinderung von chronisch inflammatorischen Erkrankungen wichtig sein, indem sie helfen, die Immunantwort zu beenden. Besonders in der Neonatalphase, in der es zu einem vermehrten Auftreten von chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie BPD oder PVL kommt, könnte z.B. ein MDSC Transfer oder eine Unterstützung der MDSC-Funktion einen neuen Therapieansatz darstellen.

Dazu gilt es zu klären, welche Konsequenzen das verlängerte postphagozytäre Überleben von G-MDSC hat. Um herauszufinden, welche Rolle G-MDSC nach der Phagozytose einnehmen, wäre es aufschlussreich, das Zytokinprofil der Zellen zu differenzieren, um beurteilen zu können, ob neonatale G-MDSC durch pro-

inflammatorische Zytokine Entzündungsvorgänge unterstützen oder ob sie durch die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen Entzündungen eindämmen.

In einem inflammatorischen Milieu wie z.B. Tumoren oder bakteriellen Infektionen spielen G-MDSC und reife Granulozyten beide eine entscheidende aber komplett gegensätzliche Rolle. G-MDSC sind wichtig für die Kontrollierung, Eindämmung und Beendigung der Inflammation um die Ausbreitung des Entzündungsherdens zu verhindern. Reife Granulozyten hingegen sind essentiell in der primären Pathogeneleminierung.

Aufgrund der immer noch nur rudimentär möglichen Unterscheidung mittels Oberflächenmarkern von G-MDSC einerseits und reifen Granulozyten andererseits, sowie ihres gemeinsamen Ursprungs, wird immer wieder kontrovers diskutiert, ob G-MDSC und reife Granulozyten nicht doch eine zusammengehörige Zellgruppe darstellen [103]. Eine Reihe von Daten spricht jedoch dagegen. Aufgrund der hohen Komplexität und Kontroversität, mit welcher dieses Thema diskutiert wird, soll in dieser Arbeit nur kurz darauf eingegangen werden. Condamine et al. konnten z.B. zeigen, dass der Lectin-type oxidized LDL receptor-1 in verschiedenen Tumorarten auf G-MDSC deutlich stärker exprimiert wird als auf reifen Granulozyten [104].

Die zentrale Eigenschaft der G-MDSC, die Immunantwort zu supprimieren ist weiterhin ein entscheidendes Kriterium, in dem sich G-MDSC von reifen Granulozyten unterscheiden [105].

Da es sich bei MDSC um noch eine erst seit relativ kurzer Zeit beschriebener Zellgruppe handelt, sind nicht nur die Einteilung der Subgruppen, und die Definition der MDSC in einem ständigen Wandel. Auch werden immer wieder neue funktionelle Charakteristika und Bedingungen, unter denen MDSC zu finden sind, entdeckt. Erhöhte MDSC-Zahlen waren zunächst nur unter pathologischen Bedingungen beschrieben worden, in welchen sie z.B. einen Tumorprogress ermöglichten. Daher galt das Interesse zunächst der Inhibition bzw. Depletion der MDSC.

Neuere Studien konnten nun bei Autoimmunkrankheiten, bei welchen die überschießende inadäquate Immunantwort eine entscheidende Rolle spielt, eine

protektive Rolle der MDSC nachweisen [106, 107]. Beispielsweise konnten Wen-Chin Yang et al in einem Diabetes mellitus Typ I Mausmodell eine deutliche Reduktion der Antigen spezifischen Immunreaktion und somit der Entwicklung eines klinischen Bildes des Diabetes mellitus Typ I durch einen Transfer von MDSC erreichen [108].

Besonders interessant ist das nun bei Betrachtung der neonatalen Infektionen und Inflammationen. Hier sind zwei essentielle Unterscheide im Vergleich zu einer Infektion im adulten Organismus hervorzuheben. Der Erste ist der verzögerte Beginn einer suffizienten Immunantwort assoziiert mit dem erhöhten Risiko einer Sepsis beim Neonaten. Zweitens ist auch die Beendigung der Immunreaktion verzögert und damit das häufigere Auftreten einer Chronifizierung der Inflammation mit Ausbildung einer PVL oder BPD.

Durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften, würde man annehmen, dass MDSC den Beginn der Immunreaktion eher behindern. Im Gegensatz dazu würde bei der Terminierung der Immunreaktion und damit Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion eine protektive Rolle der MDSC postulieren. Welche Rolle MDSC genau in diesem noch wenig verstandenen und hochkomplexen Ablauf des Immunsystems spielen, muss in weiteren Studien beleuchtet werden.

Zusammenfassend weisen unsere Daten auf eine duale Rolle neonataler G-MDSC in der Entzündungsregulation beim Neugeborenen hin. Zum einen nehmen sie durch Phagozytose und Eliminierung von Pathogenen eine Rolle an vorderster Front der Erregerabwehr und damit der Beseitigung pro-inflammatorischer Stimuli ein. Zum anderen unterstützen sie durch ihre auch nach Phagozytose persistierende T-Zellhemmung eine Beendigung der Immunantwort. G-MDSC könnten daher eine wichtige Rolle im Verlauf von neonatalen Infektionen spielen.

In zukünftigen Projekten sollte daher beispielsweise das postphagozytäre Zytokinprofil von G-MDSC detaillierter analysiert werden um deren pro- und/oder anti-inflammatorische Wirkung situationsspezifisch zuordnen zu können.

Zusätzlich müssen in folgenden Studien neben *E. coli* auch andere relevante Erreger der Neonatalperiode wie etwa *Gruppe B Streptokokken (GBS)* im Zusammenhang mit G-MDSC untersucht werden.

Weitere therapierelevante Fragen ließen sich gezielt in *in-vivo* Modellen der neonatalen Sepsis bearbeiten. Ändern sich die Anzahl und Funktionen von MDSC in verschiedenen Inflammationsphasen? Wie beeinflusst eine Depletion der G-MDSC die Funktion verschiedener Immuneffektorzellen während einer Infektion? Verändert eine Depletion der G-MDSC das *Outcome* nach neonataler Sepsis und deren Langzeitfolgen?

7 Zusammenfassung

Hintergrund und Hypothese: Infektionen sind eine der Hauptursachen für perinatale Morbidität und Mortalität. Neben einer Mortalität von 10-20% spielen vor allem postinflammatorische Folgeerkrankungen wie die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) und die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) eine wichtige Rolle für das Langzeit-*Outcome* der erkrankten Kinder. Pathophysiologisch scheinen dabei eine überschießende und prolongierte Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle zu spielen.

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind Vorläuferzellen von Granulozyten mit immunsuppressiven Eigenschaften auf andere Immuneffektorzellen, vor allem T-Zellen. MDSC wurden zunächst im Rahmen von Tumorerkrankungen beschrieben, wo sie durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften zum „*Tumor-Escape*“ beitragen. Neuere Arbeiten zeigten, dass die Anzahl von MDSC auch im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener stark erhöht ist. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob MDSC neben der bekannten Funktion der Immunsuppression auch an der Abwehr von Bakterien beteiligt sind, und ob so das neonatale Immunsystem agonistisch oder antagonistisch regulieren.

Methoden: In einem *in-vitro*-Modell mit granulozytären MDSC (G-MDSC) aus dem NSB gesunder Termingeborener wurde die Phagozytose von *green-fluorescence-protein* (GFP)- exprimierenden *Escherichia coli* (*E. coli*) mit der Phagozytoseleistung autologer Granulozyten aus dem Nabelschnurblut des gleichen Kindes mittels Durchflusszytometrie (FACS) sowie Konfokal- und Elektronenmikroskopie verglichen. Anschließend wurde die Apoptoserate mittels Annexin-V/ 7-AAD Färbung ermittelt. Die Expression von pro- (Bax) und anti-apoptischen (Bcl-2, Bcl-xL) Bcl-Proteinen wurde mittels FACS bestimmt. Zuletzt verglichen wir durch CFSE-Markierung die Fähigkeit der Granulozyten und G-MDSC vor und nach Phagozytose die T-Zellproliferation zu hemmen.

Ergebnisse: G-MDSC waren in der Lage *E. coli* zu phagozytieren und zeigten die gleiche Phagozytoseleistung wie autologe Granulozyten (38,0%±18,6% vs. 39,17%±11,0%, n=10-14, p>0,05). Die postphagozytäre Apoptoserate von G-MDSC war nach 16 Stunden deutlich geringer als bei reifen Granulozyten (19,8%±13,2% vs. 58,6%±19,9%, n=5, p<0,05). Sowohl der Anteil an Bcl-2-exprimierenden Zellen (82,7%±14,4% vs. 60,4%±17,5%, n=5, p<0,05) als auch die Stärke der Bcl-2-Expression (19,7±9,7 MFI vs 10,1±1,2 MFI, n=5, p<0,05) war bei G-MDSC im Vergleich zu reifen Granulozyten vor Kontakt mit Bakterien erhöht. Nach Phagozytose von *E. coli* sank der Anteil an Bcl-2-exprimierenden Granulozyten auf 35,8%±14,3% (n=5, p<0,05 vs. ohne *E. coli*), während der Anteil bei G-MDSC nicht abnahm (74,8%±19,2%, n=5, p>0,05 vs. ohne *E. coli*). Die Expression des anti-apoptotischen Bcl-xL und des pro-apoptotischen Proteins Bax unterschied sich nicht zwischen G-MDSC und reifen Granulozyten. Durch den Bcl-2/ Bcl-xL-Inhibitor ABT-737 konnte der Bcl-2-vermittelte Schutz gegen postphagozytäre Apoptose in G-MDSC wieder aufgehoben werden. So wurde die Apoptoserate von G-MDSC wieder auf das Niveau von Granulozyten gesteigert (33,8%±17,8% vs. 42,4%±12,7%, n=5, p>0,05). Zudem konnte eine Hemmung der T-Zellproliferation durch G-MDSC sowohl prä- (0.64±0.13, n=4, p<0.05 vs. keine Ko-kultivierung) als auch postphagozytär (0.53±0.27, n=4, p<0.05 vs. keine Ko-kultivierung, p>0.05 vs. G-MDSC) nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Wir konnten erstmals zeigen, dass G-MDSC aus NSB die Fähigkeit besitzen Bakterien zu phagozytieren und sich ihre Phagozytosekapazität nicht von der reifer Granulozyten aus NSB unterscheidet. Im Gegensatz zu reifen Granulozyten zeigten G-MDSC jedoch durch eine höhere Expression von Bcl-2 eine verminderte und verzögerte postphagozytäre Apoptose. Durch die Fähigkeit von MDSC in signifikanter Weise Bakterien zu phagozytieren, zeigten wir erstmals, dass MDSC neben der schon bekannten und viel beschriebenen Immunsuppression, auch einen Anteil an der aktiven Abwehr von Erregern haben. Sie könnten damit für die primäre Immunantwort bei bakterieller Infektion in der Neonatalzeit wichtig sein. Entsprechend darf auf Grund der neuen Daten eine situationsregulierte **Balancefunktion** der MDSC postuliert werden. Ob das verlängerte Überleben der G-MDSC zu einer verstärkten Immunsuppression beiträgt, wird Gegenstand zukünftiger Analysen sein.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

1. Shane, A.L. and B.J. Stoll, *Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes*. J Infect, 2014. **68 Suppl 1**: p. S24-32.
2. Shah, B.A. and J.F. Padbury, *Neonatal sepsis: an old problem with new insights*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 170-8.
3. Zea-Vera, A. and T.J. Ochoa, *Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis*. J Trop Pediatr, 2015. **61**(1): p. 1-13.
4. Stoll, B.J., et al., *Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics, 2010. **126**(3): p. 443-56.
5. Stoll, B.J., et al., *Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012*. JAMA, 2015. **314**(10): p. 1039-51.
6. Watterberg, K.L., et al., *Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops*. Pediatrics, 1996. **97**(2): p. 210-5.
7. Stoll, B.J., et al., *To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants*. Pediatrics, 2004. **113**(5): p. 1181-6.
8. Bose, C., et al., *Blood protein concentrations in the first two postnatal weeks that predict bronchopulmonary dysplasia among infants born before the 28th week of gestation*. Pediatr Res, 2011. **69**(4): p. 347-53.
9. Leviton, A. and F.H. Gilles, *An epidemiologic study of perinatal telencephalic leucoencephalopathy in an autopsy population*. J Neurol Sci, 1973. **18**(1): p. 53-66.
10. Dowling, D.J. and O. Levy, *Ontogeny of early life immunity*. Trends Immunol, 2014. **35**(7): p. 299-310.
11. Levy, O., *Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 379-90.
12. Drossou, V., et al., *Impact of prematurity, stress and sepsis on the neutrophil respiratory burst activity of neonates*. Biol Neonate, 1997. **72**(4): p. 201-9.
13. Gessler, P., et al., *Neutrophil respiratory burst in term and preterm neonates without signs of infection and in those with increased levels of C-reactive protein*. Pediatr Res, 1996. **39**(5): p. 843-8.
14. Yost, C.C., et al., *Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6419-27.
15. Sadeghi, K., et al., *Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling*. J Infect Dis, 2007. **195**(2): p. 296-302.
16. Canaday, D.H., et al., *Class II MHC antigen presentation defect in neonatal monocytes is not correlated with decreased MHC-II expression*. Cell Immunol, 2006. **243**(2): p. 96-106.
17. 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.
18. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke, *Neonatal adaptive immunity comes of age*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 553-64.
19. Adkins, B., et al., *Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2347-53.

20. Forsthuber, T., H.C. Yip, and P.V. Lehmann, *Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice*. Science, 1996. **271**(5256): p. 1728-30.
21. Simonsen, K.A., et al., *Early-onset neonatal sepsis*. Clin Microbiol Rev, 2014. **27**(1): p. 21-47.
22. Tsai, C.H., et al., *Characteristics of early-onset neonatal sepsis caused by Escherichia coli*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2012. **51**(1): p. 26-30.
23. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
24. Talmadge, J.E. and D.I. Gabrilovich, *History of myeloid-derived suppressor cells*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 739-52.
25. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
26. Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy, *Myeloid derived suppressor cells in human diseases*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(7): p. 802-7.
27. Wu, H., et al., *Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2016. **8**(331): p. 331ra40.
28. Highfill, S.L., et al., *Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5738-47.
29. Cao, Y., et al., *L-Arginine supplementation inhibits the growth of breast cancer by enhancing innate and adaptive immune responses mediated by suppression of MDSCs in vivo*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 343.
30. Yu, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3783-97.
31. Maeda, A., et al., *Monocytic MDSCs regulate macrophage-mediated xenogenic cytotoxicity*. Transpl Immunol, 2015. **33**(2): p. 140-5.
32. O'Connor, M.A., et al., *Subpopulations of M-MDSCs from mice infected by an immunodeficiency-causing retrovirus and their differential suppression of T- vs B-cell responses*. Virology, 2015. **485**: p. 263-73.
33. Yang, F., et al., *TNFalpha-induced M-MDSCs promote transplant immune tolerance via nitric oxide*. J Mol Med (Berl), 2016. **94**(8): p. 911-20.
34. Janols, H., et al., *A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(5): p. 685-93.
35. Youn, J.I., et al., *Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(1): p. 167-81.
36. Solito, S., et al., *Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1319**: p. 47-65.
37. Mandruzzato, S., et al., *Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(2): p. 161-9.
38. Qu, P., L.Z. Wang, and P.C. Lin, *Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment*. Cancer Lett, 2016. **380**(1): p. 253-6.
39. Cuenca, A.G., et al., *A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma*. Mol Med, 2011. **17**(3-4): p. 281-92.
40. Zhang, H., et al., *[The frequency of peripheral blood CD14(+)HLA-DR(-/low) MDSCs is negatively correlated with the inflammation in patients with chronic hepatitis B]*. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2015. **31**(10): p. 1387-90, 1395.
41. Zhang, L., et al., *Myeloid-derived suppressor cells protect mouse models from autoimmune arthritis via controlling inflammatory response*. Inflammation, 2014. **37**(3): p. 670-7.

42. Wu, T., Y. Zhao, and Y. Zhao, *The roles of myeloid-derived suppressor cells in transplantation*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014. **10**(10): p. 1385-94.
43. Kostlin, N., et al., *Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(9): p. 2582-91.
44. Kostlin, N., et al., *Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype*. *J Immunol*, 2016. **196**(3): p. 1132-45.
45. 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.
46. Gray, M. and R.J. Botelho, *Phagocytosis: Hungry, Hungry Cells*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1519**: p. 1-16.
47. *Repair*.
48. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 593-623.
49. Djaldetti, M., et al., *Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors*. *Microsc Res Tech*, 2002. **57**(6): p. 421-31.
50. Rosales, C. and E. Uribe-Querol, *Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 9042851.
51. de Chastellier, C. and L. Thilo, *Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle*. *Eur J Cell Biol*, 1997. **74**(1): p. 49-62.
52. Pauwels, A.M., et al., *Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(6): p. 407-422.
53. Levin, R., S. Grinstein, and J. Canton, *The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution*. *Immunol Rev*, 2016. **273**(1): p. 156-79.
54. DeLeo, F.R., *Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens*. *Apoptosis*, 2004. **9**(4): p. 399-413.
55. Hotchkiss, R.S., et al., *The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression*. *Nat Med*, 2009. **15**(5): p. 496-7.
56. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
57. Booth, L.A., et al., *The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis*. *Cell Signal*, 2014. **26**(3): p. 549-55.
58. Gille, C., et al., *Diminished phagocytosis-induced cell death (PICD) in neonatal monocytes upon infection with Escherichia coli*. *Pediatr Res*, 2008. **63**(1): p. 33-8.
59. Dreschers, S., et al., *Infection-induced bystander-apoptosis of monocytes is TNF-alpha-mediated*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53589.
60. Curtin, J.F. and T.G. Cotter, *Defects in death-inducing signalling complex formation prevent JNK activation and Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(10): p. 1950-7.
61. Curtin, J.F. and T.G. Cotter, *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*. *Cell Signal*, 2003. **15**(11): p. 983-92.
62. Fuchs, Y. and H. Steller, *Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(6): p. 329-44.
63. Mahalingam, D., et al., *TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?* *Cancer Treat Rev*, 2009. **35**(3): p. 280-8.
64. Sayers, T.J., *Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(8): p. 1173-80.
65. Siddiqui, W.A., A. Ahad, and H. Ahsan, *The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(3): p. 289-317.
66. Delbridge, A.R., et al., *Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(2): p. 99-109.

67. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.* Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 77-89.
68. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction.* Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
69. Boyum, A., *Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review.* Lymphology, 1977. **10**(2): p. 71-6.
70. Dehio, C. and M. Meyer, *Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in Bartonella henselae following conjugal plasmid transfer from Escherichia coli.* J Bacteriol, 1997. **179**(2): p. 538-40.
71. Kubota, K. and M. Makino, *[Application and usefulness of flowcytometry in the haematology laboratory].* Rinsho Byori, 1991. **39**(2): p. 167-72.
72. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.* Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
73. Demchenko, A.P., *Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis.* Cytotechnology, 2013. **65**(2): p. 157-72.
74. Lecoeur, H., L.M. de Oliveira-Pinto, and M.L. Gougeon, *Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay.* J Immunol Methods, 2002. **265**(1-2): p. 81-96.
75. Lecoeur, H., et al., *Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods.* J Immunol Methods, 1997. **209**(2): p. 111-23.
76. Parrondo, R., et al., *ABT-737, a small molecule Bcl-2/Bcl-xL antagonist, increases antimitotic-mediated apoptosis in human prostate cancer cells.* PeerJ, 2013. **1**: p. e144.
77. Rooswinkel, R.W., et al., *Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B.* Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e366.
78. Nelson, N., et al., *Preparation of myeloid derived suppressor cells (MDSC) from naive and pancreatic tumor-bearing mice using flow cytometry and automated magnetic activated cell sorting (AutoMACS).* J Vis Exp, 2012(64): p. e3875.
79. He, J., et al., *Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review.* J Pharm Biomed Anal, 2014. **101**: p. 84-101.
80. Plouffe, B.D., S.K. Murthy, and L.H. Lewis, *Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review.* Rep Prog Phys, 2015. **78**(1): p. 016601.
81. Fulcher, D. and S. Wong, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(6): p. 559-64.
82. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution.* J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 147-54.
83. Nwaneshiudu, A., et al., *Introduction to confocal microscopy.* J Invest Dermatol, 2012. **132**(12): p. e3.
84. Chazotte, B., *Labeling nuclear DNA using DAPI.* Cold Spring Harb Protoc, 2011. **2011**(1): p. pdb prot5556.
85. Leiber, A., et al., *Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with Escherichia coli.* Eur J Immunol, 2017. **47**(6): p. 1009-1021.
86. Maeda, A., et al., *Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic immune reactions.* Xenotransplantation, 2014. **21**(1): p. 46-56.

-
87. Poe, S.L., et al., *STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia*. *Mucosal Immunol*, 2013. **6**(1): p. 189-99.
 88. Knaul, J.K., et al., *Lung-residing myeloid-derived suppressors display dual functionality in murine pulmonary tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **190**(9): p. 1053-66.
 89. Pereira, W.F., et al., *Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to *Leishmania major* infection despite suppressed T cell responses*. *J Leukoc Biol*, 2011. **90**(6): p. 1191-7.
 90. Chornoguz, O., et al., *Proteomic pathway analysis reveals inflammation increases myeloid-derived suppressor cell resistance to apoptosis*. *Mol Cell Proteomics*, 2011. **10**(3): p. M110 002980.
 91. Condamine, T., et al., *ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(6): p. 2626-39.
 92. Hu, X., et al., *Deregulation of apoptotic factors Bcl-xL and Bax confers apoptotic resistance to myeloid-derived suppressor cells and contributes to their persistence in cancer*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(26): p. 19103-15.
 93. Ostrand-Rosenberg, S., et al., *Regulating the suppressors: apoptosis and inflammation govern the survival of tumor-induced myeloid-derived suppressor cells (MDSC)*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(8): p. 1319-25.
 94. Pilon-Thomas, S., et al., *Murine pancreatic adenocarcinoma dampens SHIP-1 expression and alters MDSC homeostasis and function*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e27729.
 95. Medina-Echeverz, J., et al., *IFN-gamma regulates survival and function of tumor-induced CD11b⁺ Gr-1^{high} myeloid derived suppressor cells by modulating the anti-apoptotic molecule Bcl2a1*. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(8): p. 2457-67.
 96. Haldar, S., et al., *Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 1994. **54**(8): p. 2095-7.
 97. 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.
 98. Janols, H., et al., *A high frequency of MDSCs in sepsis patients, with the granulocytic subtype dominating in gram-positive cases*. *J Leukoc Biol*, 2014.
 99. Peranzoni, E., et al., *Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(2): p. 238-44.
 100. Delano, M.J., et al., *MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis*. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1463-74.
 101. Sander, L.E., et al., *Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function*. *J Exp Med*, 2010. **207**(7): p. 1453-64.
 102. Brudecki, L., et al., *Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response*. *Infect Immun*, 2012. **80**(6): p. 2026-34.
 103. Michaeli, J., et al., *Tumor-associated neutrophils induce apoptosis of non-activated CD8 T-cells in a TNFalpha and NO-dependent mechanism, promoting a tumor-supportive environment*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(11): p. e1356965.
 104. Condamine, T., et al., *Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. *Sci Immunol*, 2016. **1**(2).
 105. Bronte, V., et al., *Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12150.

106. Boros, P., J. Ochando, and M. Zeher, *Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity*. Hum Immunol, 2016. **77**(8): p. 631-636.
107. Zhang, Q., et al., *The Role and Potential Therapeutic Application of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Allo- and Autoimmunity*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 421927.
108. Yin, B., et al., *Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5828-34.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen wurden selbst erstellt.

- Abb. 1: Graphische Darstellung der Fragestellungen:** Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob G-MDSC in der Lage sind, Bakterien zu phagozytieren und ihr postphagozytäres Verhalten zu untersuchen..... 9
- Abb. 2: Flussdiagramm der einzelnen Arbeitsschritte.** Ziel war es in *in vitro* Versuchen die bakterielle Phagozytosekapazität und das postphagozytäre Verhalten von G-MDSC im Vergleich zu Granulozyten zu bestimmen. Hierzu erfolgte die Identifikation bzw. Isolation von G-MDSC und Granulozyten aus humanem Nabelschnurblut mittels eines CD66b-Antikörpers. Anschließend erfolgte die Ko-kultivierung mit *E. coli*. In den darauf folgenden Schritten wurde entweder (1) die Phagozytosekapazität, (2) die postphagozytäre Apoptose, (3) die postphagozytäre T-Zellhemmung durch die Zellen und (4) die postphagozytäre Expression von Bcl-2-Proteinen analysiert..... 25
- Abb. 3: Die Phagozytoseaktivitäten von G-MDSC und reifen Granulozyten sind sehr ähnlich.** Nach einstündigen Inkubationen mit fluoreszierenden GFP-exprimierenden *E. coli* erfolgten die durchflusszytometrischen Messungen der Phagozytoseraten (C) von G-MDSC (A) und Granulozyten (B). Darstellung exemplarischer *Dotplots* der Phagozytose von *E. coli* durch G-MDSC (A) bzw. Granulozyten (B) (n=10, p>0,05, *Wilcoxon matched-pairs signed rank test*). 26
- Abb. 4: Konfokalmikroskopischer Phagozytosenachweis von G-MDSC.** Sechs konfokalmikroskopische Stapelaufnahmen der gleichen Zellen. Aufgereinigte G-MDSC wurden zuvor mit GFP-markierten *E. coli* (grün) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit DAPI (blau) und anti-CD66b PE (gelb) gefärbt. Der rote Pfeil markiert eine Zelle mit einem mittig liegenden blauen rundlichen DAPI-Signal und mit 2 länglichen grünen GFP-Signalen. Diese werden von einem kreisrunden gelben CD66b-Signal umschlossen. Es handelte sich um eine MDSC-Zelle welche zwei *E. coli* Bakterien phagozytiert hatte. Maßstab: 10µm 28

- Abb. 5: Konfokalmikroskopischer Phagozytosenachweis von reifen Granulozyten.** Sechs konfokalmikroskopische Stapelaufnahmen der gleichen Zellen. Aufgereinigte Granulozyten wurden zuvor mit GFP-markierten *E. coli* (grün) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit DAPI (blau) und anti-CD66b PE (gelb) gefärbt. Der rote Pfeil markiert eine Zelle mit einem mittigen blauen rundlichen DAPI-Signal und mit 2 länglichen grünen GFP-Signalen. Diese werden von einem kreisrunden gelben CD66b-Signal umschlossen. Es handelte sich um einen Granulozyten, welcher zwei *E. coli* Bakterien phagozytiert hatte. Maßstab: 10 µm. 29
- Abb. 6: Maximum intensity projection Modus zur verdeutlichten Darstellung, dass reife Granulozyten (A) und G-MDSC (B) *E. coli* internalisieren können.** Aufgereinigte Granulozyten und G-MDSC wurden jeweils zuvor mit GFP-markierten *E. coli* (grün) für eine Stunde inkubiert, anschließend mit DAPI (blau) und anti-CD66b PE (gelb) gefärbt. Rote Pfeile markieren mehrfach markierte Zellen (Bakterien in CD66b+Zellen). Maßstab: 10 µm..... 30
- Abb. 7: G-MDSC und Granulozyten können Bakterien in Phagolysosomen aufnehmen und dort abbauen.** Granulozyten und G-MDSC wurden jeweils zunächst mit *E. coli* für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mittels Karnovskylösung, Schneiden der Proben und Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Granulozyten (A) und G-MDSC (B), mit phagozytierten *E. coli* Bakterien. G-MDSC zeigen in der Regel eine geringere Kernlappung (C) Nachweis von Eisenpartikeln mittels Elementanalyse auf der Zelloberfläche (D). #Phagolysosom, *=Zellkern, \$=Microbeads..... 33
- Abb. 8: G-MDSC haben eine geringere spontane und post-phagozytäre Apoptoserate als Granulozyten.** G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (A) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (B) kultiviert. Messung der apoptotischen Zellen mittels einer AnnexinV-Färbung erfolgte durchflusszytometrisch 1, 4 und 16 Stunden post infectionem (p.i.) (n=5, p>0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test)..... 35
- Abb. 9: Die Apoptosegeschwindigkeit nach Phagozytose von *E. coli* ist in G-MDSC im Vergleich zu reifen Granulozyten vermindert.** G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (w/o *E. coli*) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (w *E. coli*) für weitere 16 Stunden kultiviert. Färbung entweder mit AnnexinV zur Bestimmung der frühapoptischen Zellen (A) oder mit AnnexinV und 7AAD zur Bestimmung der spätapoptischen Zellen (B) und durchflusszytometrische Messung. (n=6, p>0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test)... 36
- Abb. 10: Die Apoptose von bystander G-MDSC ist vermindert.** G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* für weitere 4 Stunden kultiviert: ohne Kontakt zu Bakterien (- -), als *Bystander* (+ -, zusätzlich mit Pfeil markiert) oder nach Phagozytose von *E. coli*-GFP (+ +). Färbung mit AnnexinV zur Bestimmung der frühapoptischen Zellen und durchflusszytometrische Messung. (n=6, p>0,05, one way ANOVA)..... 37
- Abb. 11: G-MDSC exprimieren basal und postphagozytär mehr antiapoptisches Bcl-2 als Granulozyten.** G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (-) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (+) entweder direkt gemessen oder für 4 Stunden kultiviert. Färbung mit Zellen auf Bcl-2 und anschließende durchflusszytometrische Messung des prozentual exprimierten Anteils von Bcl-2 auf den Zellen (A), sowie der absoluten Bcl-2 Menge pro Zelle (MFI) (B) auf G-MDSC und Granulozyten. Schwarz = basal, grau = postphagozytär. (n=5, p>0,05, one way ANOVA)..... 39
- Abb. 12: Die Expression von Bcl-xL und Bax ist in G-MDSC und Granulozyten ähnlich.** G-MDSC und Granulozyten wurden entweder nativ (-) oder nach einer einstündigen Inkubation mit *E. coli* (+) entweder direkt gemessen oder für 4 Stunden kultiviert. Färbung mit Zellen auf

Bcl-xL (A) oder Bax (B) und anschließende durchflusszytometrische Messung der absoluten Menge pro Zelle. Schwarz = basal, grau = postphagozytär. (n=5, p>0,05, one way ANOVA). 40	
Abb. 13: Der Bcl-2/ Bcl-xL-Inhibitor ABT-737 hemmt den Bcl-2-vermittelten Schutz gegen Spontanapoptose in G-MDSC. G-MDSC (A) und Granulozyten (B) wurden entweder nativ (schwarz) oder nach Zugabe des Bcl-Inhibitors ABT-737 (grau) für 1 Stunde, 4 Stunden oder 24 Stunden kultiviert. Färbung mit AnnexinV zur Bestimmung der Apoptose und durchflusszytometrische Messung. (C) Direkter Vergleich der Spontanapoptose nach 24h von G-MDSC und Granulozyten nativ (schwarz) und nach Inhibitorgabe (grau). (n=5, p>0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test).....	42
Abb. 14: Der Bcl-2/ Bcl-xL-Inhibitor ABT-737 hemmt den Bcl-2-vermittelten Schutz gegen postphagozytäre Apoptose in G-MDSC. G-MDSC (A) und Granulozyten (B) wurden entweder nativ (schwarz) oder nach Zugabe des Bcl-Inhibitors ABT-737 (grau) für 1 Stunde, 4 Stunden oder 24 Stunden kultiviert. Färbung mit AnnexinV zur Bestimmung der Apoptose und durchflusszytometrische Messung. (C) Direkter Vergleich der postphagozytären Apoptose nach 24h von G-MDSC und Granulozyten nativ (schwarz) und nach Inhibitorgabe (grau). (n=5, p>0,05, Wilcoxon matched-pairs signed rank test).....	43
Abb. 15: G-MDSC verlieren auch nach Phagozytose ihre Fähigkeit zur T-Zellhemmung nicht. CBMC wurden mit CFSE gefärbt, mit OKT-3 und Interleukin-2 stimuliert und jeweils im Verhältnis 4:1 entweder mit Granulozyten (A, oben rechts), G-MDSC (A, unten links) oder mit G-MDSC, welche mit <i>E. coli</i> infiziert wurden (A, unten rechts) ko-kultiviert. Als Kontrolle dienten CBMC allein (A, oben links). Durchflusszytometrische Messung der T-Zellproliferation nach 3 Tagen. (A) Zeigt repräsentative Histogrammplots (B) zeigt den Proliferationsindex. (n=5, p>0,05, one way ANOVA).....	44
Abb. 16: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse. G-MDSC besitzen die Fähigkeit <i>E. coli</i> zu phagozytieren. Durch eine erhöhte Expression von Bcl-2 zeigen G-MDSC eine verminderte und verlangsamte postphagozytäre Apoptose im Vergleich zu reifen Granulozyten. Nach Phagozytose bleibt ihnen die charakteristische Eigenschaft, die T-Zellproliferation zu hemmen, erhalten.	45

9 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinderheilkunde Abteilung IV. Neonatologie unter Betreuung von PD Dr. med. Christian Gille durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Doktorvater PD Dr. med. Christian Gille.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder: Dr. rer. nat. Bärbel Spring, Dr. med. Natascha Köstlin, PD Dr. med. Christian Gille) von mir und z.T. in Zusammenarbeit mit Dr. med. Anja Leiber durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Ich versichere, dass die eingereichte Arbeit weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens gewesen ist.

Tübingen, den **04.09.2019**

Unterschrift

10 Veröffentlichungen

Publizierter Artikel im Rahmen dieser Dissertation:

Leiber A*, Schwarz J*, Köstlin N, Spring B, Fehrenbach B, Katava N, Poets CF, Gille C., Neonatal myeloid derived suppressor cells show reduced apoptosis and immunosuppressive activity upon infection with *Escherichia coli*. Eur J Immunol, 2017.

Publiziertes Abstract im Rahmen dieser Dissertation:

Schwarz J, Leiber A, Köstlin N, Spring B, Poets CF, Gille C. Die Überexpression von Bcl-2 führt zu verlängertem Überleben von myeloiden Suppressorzellen nach Phagozytose von *Escherichia coli*. Monatszeitschrift Kinderheilkunde 2014, 162 Suppl 1: 14-15.

Wissenschaftlicher Vortrag im Rahmen dieser Dissertation:

Schwarz J, Leiber A, Köstlin N, Spring B, Poets CF, Gille C. Die Überexpression von Bcl-2 führt zu verlängertem Überleben von myeloiden Suppressorzellen nach Phagozytose von *Escherichia coli*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, GNPI, Bonn Juni 2014).

11 Anhang

11.1 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. med. Christian Gille für die hervorragende Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich für die zahlreichen Anregungen und intensiven Diskussionen, sowie die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich herzlich für die große Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bei Anja Leiber, Natascha Köstlin, Bärbel Spring und Hellen Kugel bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Eltern, welche sich bereiterklärt haben, unsere Studie zu unterstützen sowie den Mitarbeitern der Neonatologie und der Geburtshilfe für die Bereitstellung von Nabelschnurblut.

Das größte Dankeschön geht an meine Familie, die mir während dieser Doktorarbeit und meinem gesamten Studium zu jeder Zeit in vielerlei Hinsicht eine große Stütze war und mir immer Rückhalt gab.