

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung für Neonatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Christian Poets

**Untersuchungen zur Expression myeloider
Suppressorzellen in der Muttermilch von
Frühgeborenen und die Mechanismen ihrer
Akkumulation**

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

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

vorgelegt von

Flaig, Lara Antonia

2021

Dekan:

Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler

1. Berichterstatter:

Dr. med. N. Köstlin-Gille

2. Berichterstatter:

Apl. Professor Dr. med. Dr. rer. nat. K. Hamprecht

Tag der Disputation: 03.12.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	VI
2	Einleitung	1
2.1	Frühgeburtlichkeit	1
2.2	Neonatale Sepsis und nekrotisierende Enterokolitis (NEK)	2
2.3	Das neonatale Immunsystem und das Mikrobiom	3
2.4	Muttermilch	4
2.5	Myeloide Suppressorzellen (MDSC)	5
2.6	Ziel der Arbeit	6
3	Material und Methoden	7
3.1	Material	7
3.1.1	Patientenkollektiv	7
3.1.2	Materialien biologischen Ursprungs	9
3.1.3	Materialien nicht-biologischen Ursprungs	9
3.1.4	Antikörper für die Durchflusszytometrie	10
3.1.5	Antikörper für die Isolierung der MDSC	11
3.1.6	Glas- und Plastikmaterialien	11
3.1.7	Geräte und Software	12
3.2	Methoden	13
3.2.1	Isolation von Zellen aus der Muttermilch	13
3.2.2	Isolation von PBMC	13
3.2.3	Gewinnung von Muttermilchüberstand für MDSC-Induktionsversuche	14
3.2.4	T-Zell-Proliferations-Assay	16
3.2.5	Durchflusszytometrische Analyse von GR-MDSC aus der Muttermilch	16
3.2.6	<i>In-vivo</i> -Modell	17
3.2.7	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	19
3.2.8	Statistische Auswertung	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Induktion von MDSC durch Muttermilch	20
4.1.1	Muttermilch führt zu einer quantitativen MDSC-Induktion aus PBMC	20

4.1.2	Muttermilch induzierte MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation	22
4.1.3	Denaturierung und Kochen beeinflussen die MDSC-induzierende Wirkung von Muttermilch nicht.....	23
4.2	Longitudinale Quantifikation von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener	24
4.2.1	Der Anteil von GR-MDSC an allen Leukozyten in der Muttermilch nimmt mit zunehmendem Gestationsalter zu.....	25
4.2.2	Der Anteil von MM-MDSC an allen Leukozyten in der Muttermilch steigt mit zunehmendem postnatalen Alter	29
4.2.3	Einfluss mütterlicher Faktoren auf den Anteil an GR-MDSC in der Muttermilch	31
4.2.4	Einfluss kindlicher Faktoren auf den Anteil von GR-MDSC in der Muttermilch	33
4.3	<i>In-vivo</i> -Fütterungsmodell.....	34
4.3.1	MDSC aus der Muttermilch gelangen in die Systemzirkulation der neugeborenen Mäuse.....	35
5	Diskussion.....	39
5.1	Induktion von GR-MDSC durch Muttermilch	39
5.2	Quantifikation von MM-MDSC in den ersten 35 Lebenstagen.....	44
5.3	<i>In-vivo</i> -Modell: MDSC aus der Muttermilch in der Systemzirkulation des Neugeborenen	50
5.4	Mögliche Bedeutung von GR-MDSC in der Muttermilch und Ausblick	52
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis.....	56
8	Abbildungsverzeichnis.....	70
9	Tabellenverzeichnis.....	70
10	Erklärung zum Eigenanteil.....	71
11	Veröffentlichungen	72
12	Danksagung	73
13	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Abkürzungsverzeichnis

ANS	Antenatale Steroidgabe
APC	Allophycocyanin
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CFSE	Carboxylfluorescinsuccinimidylester
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DPBS/PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline, Phosphatpuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELBW	Extremely low birth weight
ELGAN	Extremely low gestational age newborns
EOS	Early onset sepsis, Frühsepsis
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FATP2	Fettsäuretransportprotein 2
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdschwerebeschleunigung $g = 9,81\text{m/s}^2$
GFP	Green fluorescent protein, grün-fluoreszierendes Protein
G(M)-CSF	Granulocyte-(macrophage) colony-stimulating factor, Granulozyten-(Makrophagen-) Kolonie-stimulierender Faktor
GR-MDSC	Granulocytic myeloid-derived suppressor cells, granulozytäre myeloide Suppressorzellen
HGF	Hepatocyte growth factor, Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HLA-DR	Antigen-D-assoziiertes Leukozytenantigen
HLA-G	Humanes Leukozytenantigen G
IL	Interleukin
LBW	Low birth weight
LOS	Late onset sepsis, Spätsepsis
MACS	Magnetic Cell Separation, magnetische Zellseparation
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells, myeloide Suppressorzellen
MFI	Mean fluorescence intensity, mittlere Fluoreszenzintensität

MLGAN	Moderate Low Gestational Age Newborns
MM	Muttermilch
MM-Ü	Muttermilch-Überstand
MM-MDSC	Muttermilch-MDSC
MO-MDSC	Monocytic myeloid-derived suppressor cells, monozytäre myeloide Suppressorzellen
NEK	Nekrotisierende Enterokolitis
NGAN	Normal gestational age newborns
P	Tag
PAF-A	Platelet-activating factor A, plättchenaktivierender Faktor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen von Erwachsenen
PD-L1/2	Programmed cell death ligand 1/2, programmierter Zelltodligand 1/2
PE	Phycoerythrin
PerCP Cy 5.5	Peridinin-chlorophyll proteins Cy 5.5
PGE ₂	Prostaglandin E2
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3, Transkriptionsfaktor
TLR	Toll-like receptor, Toll-like-Rezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VLBW	Very low birth weight
VLGAN	Very Low Gestational Age Newborns

2 Einleitung

2.1 Frühgeburtlichkeit

Frühgeburtlichkeit ist definiert als die Geburt eines Kindes vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) post menstruationem (BfArM, 2021). Weltweit sind ca. 11 % aller Geburten Frühgeburten, was etwa einer jährlichen Zahl von 15 Millionen entspricht (Harrison and Goldenberg, 2016, Shulhan et al., 2017, Galindo-Sevilla et al., 2019). Frühgeburtlichkeit ist – u. a. bedingt durch erhöhte Infektanfälligkeit und Vulnerabilität – die führende Ursache für perinatale Morbidität und Mortalität (Black et al., 2010, Harrison and Goldenberg, 2016, Patel, 2016).

Frühgeburten werden entweder nach dem Geburtsgewicht oder dem Gestationsalter (Accardo and Hoon, 2008) in 2 verschiedene Gruppen unterteilt (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1: Neugeborenen-Klassifikation nach Geburtsgewicht

Klassifikation	Geburtsgewicht
Extremely Low Birth Weight (ELBW)	<500 g
Very Low Birth Weight (VLBW)	<1000 g
Low Birth Weight (LBW)	<2500 g
Normal Birth Weight (NBW)	2500 g – 4000 g

Tabelle 2: Neugeborenen-Klassifikation nach Gestationsalter

Klassifikation	Gestationsalter
Extremely Low Gestational Age Newborns (ELGAN)	23+0 – 27+6 SSW
Very Low Gestational Age Newborns (VLGAN)	28+0 – 31+6 SSW
Moderate Low Gestational Age Newborns (MLGAN)	32+0 – 36+6 SSW
Normal Gestational Age Newborns (NGAN)	>37+0 SSW

2.2 Neonatale Sepsis und nekrotisierende Enterokolitis (NEK)

Nach respiratorischen Komplikationen sind generalisierte bakterielle Infektionen und die nekrotisierende Enterokolitis (NEK) die wichtigsten Todesursachen von sehr kleinen Frühgeborenen (Stichtenoth et al., 2012, Stoll et al., 2015, Masi and Stewart, 2019).

Neonatale bakterielle Infektionen werden in die Early Onset Sepsis (EOS) und die Late Onset Sepsis (LOS) unterteilt. Die EOS tritt innerhalb der ersten 72 Lebensstunden auf und wird durch Keime aus der mütterlichen Vaginalflora ausgelöst, während die LOS nach dem 3. Lebenstag auftritt und durch Keime aus der Krankenhausumgebung verursacht wird. Die Mortalität der Frühgeborenen-Sepsis liegt bei ca. 10 bis 20 % (Stoll et al., 2015). Außerdem prädisponiert die Sepsis für inflammatorische Folgeerkrankungen wie die Periventrikuläre Leukomalazie (PVL) und die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) (Stoll et al., 2004a, Rocha et al., 2006, Bose et al., 2011) und darüber hinaus für neurologische Entwicklungsstörungen und Wachstumsverzögerungen (Stoll et al., 2004b).

Bei der NEK handelt es sich um eine schwere Darmerkrankung Frühgeborener (Nino et al., 2016). Sie betrifft ca. 5 bis 12 % aller VLBW-Kinder und hat eine Mortalität von 20 bis 30 % (Patel and Denning, 2015, Shulhan et al., 2017). Die Pathogenese der NEK ist bisher noch unvollständig verstanden. Es wird angenommen, dass das noch unreife intestinale Epithel eine überschießende Entzündungsreaktion auslöst, die dann zu einer Zerstörung der Mukosa und zur mesenterialen Hypoperfusion führt (Nino et al., 2016). Letztendlich kommt es über eine Barrierestörung der Darmwand zu einer Durchwanderungsperitonitis und dann zu einer systemischen Infektion (Good et al., 2014, Shulhan et al., 2017, Masi and Stewart, 2019). Die wichtigsten bekannten Risikofaktoren für eine NEK sind Frühgeburtlichkeit, eine bakterielle Fehlbesiedlung und eine Ernährung mit Formula-Nahrung, anstelle von Muttermilch (Siggers et al., 2011, Patel and Denning, 2015, Corpeleijn et al., 2016, Quigley et al., 2019, Wu et al., 2019).

2.3 Das neonatale Immunsystem und das Mikrobiom

Durch die mütterliche Immunität vor Pathogenen geschützt, kann sich der Fötus während der Schwangerschaft in einem meist sterilen Umfeld entwickeln. Bestimmte Toleranzmechanismen verhindern dabei eine Abstoßungsreaktion des semi-allogenen Fötus durch mütterliche Immunzellen (Warning et al., 2011). Bei Geburt kommt es zur Keimbesiedelung des Neugeborenen, wobei das neonatale Immunsystem potentiellen Pathogenen ausgesetzt wird (Fulde and Hornef, 2014). Vor allem in dieser Phase sind Neugeborene besonders anfällig für Infektionen. Die gesteigerte Anfälligkeit von Neugeborenen gegenüber inflammatorischen Ereignissen ist einer veränderten Immunreaktion im Vergleich zu Erwachsenen geschuldet (Levy, 2007, Dowling and Levy, 2014).

Gleichzeitig findet die Entwicklung des Mikrobioms statt, wobei es Hinweise darauf gibt, dass dieselben Mechanismen, die für die Vulnerabilität gegenüber Infektionen verantwortlich sind, auf der anderen Seite eine ungestörte Mikrobiom-Entwicklung ermöglichen (Elahi et al., 2013). Das intestinale Mikrobiom ist die Gesamtheit aller im Darm befindlichen Mikroorganismen. Die wichtigste Phase der Mikrobiometablierung beginnt unmittelbar nach der Geburt und reicht bis ins Kindes- bzw. Jugendalter (Yatsunencko et al., 2012, Ringel-Kulka et al., 2013, Backhed et al., 2015, Hollister et al., 2015). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms bei Neu- und Frühgeborenen je nach Gestationsalter variiert (Patel et al., 2016, Korpela et al., 2018). Verschiedene peri- und postnatale Faktoren beeinflussen die Zusammensetzung des Mikrobioms entscheidend. Hierzu zählen neben dem Geburtsmodus (Azad et al., 2013) insbesondere die perinatale Gabe von Antibiotika (Penders et al., 2006, Koenig et al., 2011, Martin et al., 2016) und die Ernährung. Muttermilch enthält u. a. wichtige probiotische Mikroorganismen (Heikkila and Saris, 2003, Backhed et al., 2015) und Oligosaccharide (Gonia et al., 2015, Lin et al., 2017, Cavdar et al., 2019), die sich protektiv auf die Mikrobiometablierung auswirken (Masi and Stewart, 2019).

Das intestinale Mikrobiom trägt wesentlich zur Gesundheit des Menschen bei, kann aber im Falle von pathologischen Veränderungen auch an der Entstehung

von Krankheiten beteiligt sein. Sowohl für die LOS als auch für die NEK konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des Mikrobioms bereits vor Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden können (Carl et al., 2014, Shaw et al., 2015, Taft et al., 2015). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms einen Einfluss auf die Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen im späteren Leben wie der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis, dem Diabetes mellitus, der Adipositas und Atopien hat (Costello et al., 2009, Maynard et al., 2012, Frick and Autenrieth, 2013, Harsch and Konturek, 2018).

2.4 Muttermilch

Muttermilch ist die beste Ernährung für Neu- und Frühgeborene (Arendt, 2008, Moles et al., 2018). Neben einer optimalen Nährstoffzusammensetzung enthält Muttermilch viele immunologisch wirksame Substanzen; außer Immuneffektorzellen beinhaltet sie Stammzellen, Immunglobuline, Zytokine und antimikrobielle Proteine wie Lactoferrin und Lysozym (Hassiotou et al., 2013a). Weitere Faktoren wie Nitrate, L-Arginin, Präbiotika, platelet-activating factor A (PAF-A) und Wachstumsfaktoren wie vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor, HGF) wirken sich protektiv auf Wachstum und Entwicklung des Kindes aus (Kaingade et al., 2016).

Im Vergleich zu Formula-Ernährung reduziert Muttermilch die NEK-Inzidenz (Schanler et al., 2005, Siggers et al., 2011, Wu et al., 2019) und ist mit einem verminderten Auftreten von systemischen Infektionen assoziiert (Moles et al., 2018). Die genauen Mechanismen, die hier zugrunde liegen, sind bis heute allerdings nur unvollständig verstanden.

2.5 Myeloide Suppressorzellen (MDSC)

Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind myeloide Zellen mit modulierender Wirkung auf das angeborene und erworbene Immunsystem (Nagaraj et al., 2013).

Bis vor einigen Jahren kannte man sie vor allem aus der Tumorbilogie (Young et al., 1987, Gabrilovich and Nagaraj, 2009, Qu et al., 2016, Gabrilovich, 2017). Durch den Tumor induziert, sorgen MDSC durch ihre suppressiven Eigenschaften insbesondere auf T-Zellen für eine Progredienz der Erkrankung (Waldron et al., 2013, Talmadge and Gabrilovich, 2013, Solito et al., 2014). Während im Blut gesunder Menschen kaum MDSC zirkulieren, kommt es bei systemischer Inflammation wie bakteriellen und parasitären Infektionen (Delano et al., 2007, Brudecki et al., 2012), chronischen Entzündungsreaktionen (Zhang et al., 2015), Traumata (Cuenca et al., 2011), Transplantationen (Wu et al., 2014a, Koehn and Blazar, 2017, Zhang et al., 2018) und Autoimmungeschehen (Zhang et al., 2014) zu einer Akkumulation von MDSC (Almand et al., 2001). Eine eindeutige phänotypische Abgrenzung der MDSC von anderen Immunzellpopulationen beim Menschen ist aufgrund des Fehlens von spezifischen Oberflächenmarkern bisher nicht möglich. MDSC sedimentieren in der Fraktion der mononukleären Zellen (Brandau et al., 2011) und können nur durch ihre T-Zell-suppressiven Eigenschaften eindeutig identifiziert werden. Phänotypisch lassen sich MDSC in 2 Subpopulationen unterteilen - granulozytäre MDSC (GR-MDSC) und monozytäre MDSC (MO-MDSC) (Youn et al., 2008). Während GR-MDSC granulozytäre Marker wie CD11b, CD15 und CD66b exprimieren, sind MO-MDSC positiv für das monozytäre Antigen CD14 (Zea et al., 2005, Valenti et al., 2007, Greten et al., 2011, Condamine et al., 2015). Beide präsentieren den Oberflächenmarker CD33 und sind negativ für HLA-DR (Ochoa et al., 2007, Greten et al., 2011).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass GR-MDSC auch unter physiologischen Bedingungen während der Schwangerschaft im mütterlichen und fetalen Organismus akkumulieren (Rieber et al., 2013b, Kostlin et al., 2014, Kostlin et al., 2016) und einerseits wichtig für die Aufrechterhaltung der materno-

fetalen Toleranz während der Schwangerschaft sind (Kostlin-Gille et al., 2019), andererseits aber auch eine Rolle für die postnatale Immunadaption des Neugeborenen spielen (Rieber et al., 2013b, Kostlin et al., 2017, Schwarz et al., 2018).

Jüngere Arbeiten unserer Forschungsgruppe zeigen, dass GR-MDSC auch in großen Zahlen in der Muttermilch gesunder Mütter vorkommen (Muttermilch-MDSC, MM-MDSC). Diese MM-MDSC zeigen im Vergleich zu GR-MDSC aus peripherem Blut eine erhöhte Expression von Chemokin-Rezeptoren, co-inhibitorischen Molekülen, Effektorenzymen und eine gesteigerte suppressive Aktivität. Daneben scheinen MM-MDSC die Expression des Toll-like Receptor 4 (TLR4), eines in die Pathogenese der NEK involvierten Pathogen-Rezeptors, zu modulieren (Kostlin et al., 2018).

Der Transfer von MDSC über die Muttermilch an das Neugeborene könnte daher die mukosale Immunität und die Etablierung des intestinalen Mikrobioms beeinflussen und so eine wichtige Rolle für die Pathogenese von akuten Infektionen in der Neugeborenenzeit und chronischen Erkrankungen im späteren Leben spielen.

2.6 Ziel der Arbeit

In dieser Dissertation wurde untersucht, ob Muttermilch Substanzen enthält, die zu einer Induktion von MDSC führen. Außerdem wurde analysiert, wie sich die MDSC-Zahlen in der Muttermilch frühgeborener Kinder über die ersten Lebenswochen verhalten und ob es eine Assoziation zwischen MDSC-Zahlen aus der Muttermilch und klinischen Parametern gibt. Zuletzt wurde mithilfe eines *in-vivo*-Tiermodells der Frage nachgegangen, ob GR-MDSC aus der Muttermilch in den kindlichen Organismus gelangen können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Die Studie wurde durch die *Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen* genehmigt (Ethikvoten 682/2016BO1 und 419/2019BO2).

Die analysierten Milchproben wurden von Müttern gespendet, deren Neugeborene sich zum Zeitpunkt der Studienteilnahme in stationärer Behandlung auf den neonatologischen Intensiv- und Überwachungsstationen der *Universitäts-Kinderklinik Tübingen* befanden. Die Rekrutierung der Teilnehmer fand im Zeitraum von Januar 2018 bis Mai 2020 statt. Eingeschlossen wurden Mütter von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 23+0 bis 36+6 Schwangerschaftswochen und deren Frühgeborene. Die Milchproben wurden über die ersten 5 Lebenswochen gesammelt. Es wurden 1 bis 2 Muttermilchproben pro Woche gewonnen. Die Milchproben waren zum Zeitpunkt der Analyse maximal 6 Stunden alt und unbehandelt und wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

Alle Probandinnen wurden zuvor über die Studie aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet.

Überdies wurden klinische Daten der in die Studie eingeschlossenen Mütter und Neugeborenen erhoben (Quelle: Köstlin-Gille et al. (2020)). Diese sind in den folgenden 2 Tabellen zusammengefasst:

Tabelle 3: Kindliche Charakteristika der Studienpopulation

	<u>Total</u>	<u>Gestationsalter</u>		
		<28+0 SSW	28+0 - 31+6 SSW	>32+0 SSW
Teilnehmerzahl [n]	105	45	41	19
Gestationsalter [SSW, Mittelwert]	29+0	26+3	29+6	33+2
Geburtsgewicht [Gramm, Mittelwert]	1239	889	1327	1877
Geschlecht (männlich) [%]	56,2	48,9	65,9	52,6
SGA [%]	6,7	2,2	12,2	5,3
Antenatale Steroidgabe (ANS) [%]	77,1	88,9	75,6	52,6
Tokolyse [%]	46,7	60,0	36,6	36,8
Mehrlingsschwangerschaften [%]	35,2	51,1	24,4	21,1
BPD [%]	10,5	22,2	2,4	0,0
NEK [%]	2,9	2,2	4,9	0,0
Geburtsmodus [%]:				
- Spontan	11,4	8,9	12,2	15,7
- Elektiv C/S	41,0	31,1	51,2	42,1
- Notsektio C/S	47,6	60,0	36,6	42,1
Sepsis [%]:				
- Total	11,4	17,8	9,8	0,0
- EOS	3,8	2,4	7,3	0,0
- LOS	7,6	15,6	2,4	0,0

Tabelle 4: Mütterliche Charakteristika der Studienpopulation

	<u>Total</u>	<u>Gestationsalter</u>		
		<28+0 SSW	28+0 - 31+6 SSW	>32+0 SSW
Teilnehmerzahl [n]	86	34	34	18
Gestationsalter [SSW, Mittelwert]	29+1	26+3	29+5	33+2
Antenatale Steroidgabe (ANS) [%]	75,6	87,9	75,0	82,4
Tokolyse [%]	45,3	57,6	38,9	35,3
Mehrlingsschwangerschaften [%]	20,9	33,3	13,9	11,8
Geburtsmodus [%]:				
- Spontan	12,8	12,1	11,1	17,6
- Elektiv C/S	44,2	36,4	52,8	41,2
- Notsektio C/S	41,7	51,5	33,3	41,2

3.1.2 Materialien biologischen Ursprungs

Anti-human CD3 Clone: OKT-3	Janssen-Cilag, Neuss
Fetal Bovine Serum (FCS)	Fa. Biochrom, Berlin
Interleukin-2 (IL-2)	Fa. R&D Systems, Wiesbaden

3.1.3 Materialien nicht-biologischen Ursprungs

Ammoniumchlorid-Puffer (NH ₄ Cl)	Universitätsapotheke, Tübingen
Ampuwa	Fa. Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
BD Perm/Wash Buffer	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077 g/ml)	Fa. Biochrom, Berlin
Carboxylfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt
FACS-Flow	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Heparin-Natrium (5000 I.E./0,5 ml)	Fa. B. Braun, Melsungen
Natriumazid	Fa. AppliChem GmbH
Natriumchlorid	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Dulbecco)	Fa. Biochrom, Berlin
Running Buffer	Universitätsapotheke, Tübingen
Trypanblau	Fa. Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium	Fa. Biochrom, Berlin
Waschpuffer (PBS + 0,1% Bovines Serumalbumin + 0,1 % Natriumazid)	Eigene Herstellung

3.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

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

APC Mouse Anti-Human CD8	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
APC MΦP9 CD14	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
APC Mouse Anti-Human CD274 (B7-H1, PD-L1)	Fa. Biolegend, Koblenz
APC Mouse Anti-Human CD184 (CXCR4)	Fa. Thermofisher Scientific, Darmstadt
Alexa Fluor 647 Rat Anti-CD11b	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

3.1.4.2 Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markiert

FITC Mouse Anti-Human CD66b	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
FITC Mouse Anti-Human CD3	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

3.1.4.3 Phycoerythrin (PE)-markiert

PE Mouse Anti-Human CD45	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
PE Mouse Anti-Human CD124	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti-Human CD273 (B7-DC, PD-L2)	Fa. Biolegend, Koblenz
PE Mouse Anti-Human CD33	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PE Mouse Anti-Human CD4	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
PE Rat Anti-Mouse CD45	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

3.1.4.4 Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex Conjugate (PerCP)-markiert

PerCP Cy5.5 Mouse Anti-Human HLA-DR	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
PerCP Rat Anti-Mouse Ly-6G and Ly- 6C (Gr1)	Fa. BD Biosciences, Heidelberg

3.1.5 Antikörper für die Isolierung der MDSC

Anti-FITC MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Anti-PE MicroBeads (CD33)	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

3.1.6 Glas- und Plastikmaterialien

Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Flat Bottom Cell Culture Cluster, 6- und 12-Well	Fa. Corning, Kaiserslautern
Corning Zellschaber	Fa. Fisher Scientific, Schwerte
5ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	Fa. BD Biosciences, Heidelberg
F- and U-Bottom Cell Culture Cluster, 96-Well	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cover Glass	VWR International, Bristol, United Kingdom
Einmalspritzen Plastipak, 30 ml und 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 (100-1000 µl) und gelb (20-200 µl)	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen farblos (1-10 µl)	Viozym Scientific, Oldendorf
Safety Multifly Set	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette 9 ml mit 1,6 mg EDTA/ml Blut	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.1.7 Geräte und Software

8-Kanal-Transferpipette (20 - 200 µl)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Abzugs-Bank HeraSafe HS12	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
AutoMacs Pro	Fa. Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Brutschrank (5 % CO ₂ , 37 °C, wasserdampfgesättigt)	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
CellQuest Pro (Software)	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	Fa. Telstar
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 (1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Fa. Abimed, Langenfeld
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
SYSMEX-XP300	Sysmex GmbH, Norderstedt
Vortex	Fa. Bender & Hobein AG, USA
Zentrifuge Rotanta 460 RS und 46 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

3.2 Methoden

Die hier angewandten Methoden sind die Standardmethoden der Arbeitsgruppe. Die Beschreibungen sind an die Dissertationsschriften von Frau Dr. med. K. Hofstädter, Frau Dr. med. V. Scheckenbach, Frau Dr. med. H. Kugel und Herrn Dr. med. J. Schwarz angelehnt (Hofstädter, 2016, Scheckenbach, 2017, Kugel, 2018, Schwarz, 2020).

3.2.1 Isolation von Zellen aus der Muttermilch

Zur Isolation von Zellen aus der Muttermilch wurden Proben mit 5 ml bis max. 150 ml Muttermilch pro Spende verwendet. Die abgepumpte Muttermilch wurde 1:1 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt und bei 20 °C und 805 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde dreimal mit PBS gewaschen (10 Minuten bei 10 °C und 500 g, zweimal 5 Minuten bei 4 °C und 310 g). Zwischen dem 2. und 3. Waschschrift erfolgte die Bestimmung der Zellzahl am Hämozytometer (Sysmex). Die Zellzahl wurde anschließend auf 4×10^4 Zellen/ml eingestellt und für die durchflusszytometrische Analyse verwendet.

3.2.2 Isolation von PBMC

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Erwachsener wurde peripheres Blut mittels Venenpunktion gewonnen und mit Natrium-Heparin antikoaguliert. Die Aufreinigung von mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) erfolgte dann mittels Dichtegradientenzentrifugation (Böyum, 1968a, Böyum, 1968b, Boyum, 1977). Hierzu wurde das Vollblut 1:2 – 1:1 mit PBS verdünnt und dann im Verhältnis 2:1 auf Biocoll (Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077 g/ml) aufgeschichtet. Die Probe wurde für 25 Minuten bei 20 °C und 400 g ungebremst zentrifugiert. Durch die geringere Dichte der PBMC formten diese einen Ring oberhalb des Biocoll, während die Granulozyten und Erythrozyten das Zellpellet am Röhrchenboden bildeten. Die PBMC wurden mithilfe einer serologischen Pipette entnommen, in

ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen (10 Minuten bei 10 °C und 500 g und 10 Minuten bei 4 °C und 310 g). Zwischen den beiden Waschsritten erfolgte die Zellzahlbestimmung am Hämozytometer.

3.2.3 Gewinnung von Muttermilchüberstand für MDSC-Induktionsversuche

3.2.3.1 Muttermilchüberstand

Frisch abgepumpte Muttermilch wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und bei 805 g für 20 Minuten bei 20 °C abzentrifugiert. Die oberste Fettschicht wurde verworfen und der restliche Überstand entnommen und für die weiteren Versuche verwendet. Hierbei wurde der Überstand sowohl unbehandelt als auch denaturiert und gekocht verwendet. Zur Denaturierung von Proteinen in der Muttermilch wurden die Proben bei 56 °C für 30 min im Wasserbad erhitzt. In einem weiteren Ansatz wurden Proben für 10 Minuten bei 100 °C gekocht. Die Überstände wurden anschließend in den Konzentrationen 6,25 %, 12,5 % und 25 %, jeweils verdünnt in Kulturmedium, in die Kulturen eingesetzt.

3.2.3.2 Induktion von MDSC durch Muttermilch

Die Induktion von MDSC durch Muttermilch wurde in Anlehnung an Lechner et al., die eine Induktion von MDSC aus PBMC durch verschiedene Zytokine zeigen konnten (Lechner et al., 2010), durchgeführt. Zur Untersuchung einer möglichen MDSC-induktiven Wirkung von azellulären Bestandteilen der Muttermilch wurden frisch isolierte PBMC eines gesunden Spenders für 6 Tage mit unterschiedlich behandelte, zellfreie Muttermilch (s. 2.2.3.1) kultiviert und dann der Anteil CD33-positiver (CD33⁺) Zellen in der Kultur durchflusszytometrisch gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne Zugabe von Muttermilch. Als Positivkontrolle dienten Zellen mit Zugabe von 1 ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF). Hierzu wurden PBMC aufgereinigt und in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/Well in DMEM-Medium (+ 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin) in eine 12-Well-Platte gegeben. Den Zellen wurde dann Muttermilchüberstand (unbehandelt, denaturiert und gekocht) in

unterschiedlicher Konzentration (6,25 %, 12,5 % sowie 25 %) zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel durch Abzentrifugieren der 12-Well-Platte bei 310 g und 4 °C für 5 Minuten, vorsichtige Abnahme des Überstandes und Zugabe von neuem Medium inklusive der o. g. Zusätze. Nach 6 Tagen wurde das Medium mit den nicht-adhären Zellen abgenommen. Die adhären Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl Detachin/Well, sowie 10-minütiger Inkubation im Brutschrank und anschließendem Abschaben mit einem CellScraper, abgelöst. Lösliche und adhären Zellen wurden zusammengeführt und für 5 Minuten bei 4 °C und 310 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und sowohl für die durchflusszytometrische Analyse als auch die Anreicherung von MDSC mittels MACS verwendet. Die Quantifizierung von MDSC erfolgte anhand des myeloiden Markers CD33.

3.2.3.3 Isolation von Muttermilch-induzierten MDSC mittels MACS

Die magnetische Zellseparation mittels MACS (Magnetic Cell Separation) ermöglicht die Isolation von Zellen aus einer beliebigen Zellsuspension anhand ihrer Oberflächenmoleküle (He et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde eine sogenannte Positiv-Selektion angewandt. Hierzu werden Zellen mit an Antikörpern gekoppelten magnetischen Beads (MicroBeads) markiert und dann in einer Separationssäule, welche von einem starken magnetischen Feld umgeben ist, platziert. Durch das Magnetfeld werden an MicroBeads-gebundene Zellen im Gegensatz zu unmarkierten Zellen in der Säule zurückgehalten und somit selektiert. Durchgeführt wurden die Versuche nach dem Protokoll des Herstellers (Fa. Miltenyi Biotec). Zur Isolation von Muttermilch-induzierten MDSC wurden MDSC mit 25 %igem Muttermilchüberstand induziert (s. 2.2.3.2). Für die nachfolgende Zellisolation mittels MACS wurde das gewonnene Zellpellet mit Running Buffer gewaschen und im Anschluss in 80 µl Running Buffer pro 1×10^7 Zellen gelöst. Es wurden 20 µl CD33-MicroBeads hinzugegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nochmals in Running Buffer gewaschen und dann in 500 µl Running Buffer aufgenommen. Es erfolgte die Positiv-Selektion der CD33⁺-Zellen mittels AutoMacs (Programm „posseld2“).

3.2.4 T-Zell-Proliferations-Assay

Die Analyse der T-Zell-suppressiven Wirkung von GR-MDSC erfolgte mittels T-Zell-Proliferations-Assay (Lyons and Parish, 1994, Fulcher and Wong, 1999, Lyons, 2000). Hierzu wurden PBMC eines gesunden Spenders (im Falle der T-Zellproliferationshemmung durch induzierte MDSC wurde der gleiche PBMC-Spender verwendet wie für die Induktion der MDSC) aufgereinigt und mit dem Farbstoff Carboxyfluoreszeinsuccimidylester (CFSE, 5 mM, Lagerkonzentration) nach Herstellerangaben angefärbt. Die gefärbten PBMC wurden dann auf eine Zellzahl von 5×10^5 /ml in RPMI-Medium (mit 10 % Serum des PBMC-Spenders + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % L-Glutamin) eingestellt und mit 1 μ g/ml OKT3 und 100 U/ml IL-2 stimuliert. Es wurden dann zuvor aufgereinigte GR-MDSC oder induzierte MDSC in den Verhältnissen 2:1, 4:1 und 6:1 (PBMC:MDSC) zugegeben. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte PBMC und als Positivkontrolle dienten stimulierte PBMC ohne Zugabe von MDSC. Nach Inkubation von 96 Stunden erfolgte eine Entnahme der Zellen aus der Platte. Diese wurden anschließend mit 1 μ l anti-CD4-PE-Antikörper sowie 1 μ l anti-CD8-APC-Antikörper gefärbt. Danach erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der T-Zell-Proliferation durch Abnahme der CFSE-Intensität. Die Proliferation von T-Zellen ohne MDSC wurde auf 100 % gesetzt. Es wurde dann der Proliferationsindex als Quotient aus Proliferation mit MDSC und Proliferation ohne MDSC errechnet.

3.2.5 Durchflusszytometrische Analyse von GR-MDSC aus der Muttermilch

Zur Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch wurden Muttermilch-Zellen auf eine Konzentration von $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 100 μ l für die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse verwendet. Die durchflusszytometrische Färbung erfolgte nach dem folgenden Schema:

Tabelle 5: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

FACS-Röhrchen	Antikörper
1)	Keine Antikörper (Kontrolle)
2)	1 µl CD66b FITC
3)	1 µl CD66b FITC, 1 µl CD45 PE, 1 µl CD14 APC, 5 µl HLADR-PerCP (aus 1:10 Verdünnung mit PBS)
4)	3 µl CD3 FITC, 1 µl CD45 PE
5)	1 µl CD66b FITC, 5 µl CD124 PE, 2 µl CD183 APC
6)	1 µl CD66b FITC, 1 µl PDL-2 PE, 1 µl PDL-1 APC (aus 1:10 Verdünnung mit PBS)

Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und dann mit FACS-Flow gewaschen (5 Minuten bei 4 °C und 310 g). Anschließend wurde der Überstand abgekippt, die Zellen resuspendiert und am Durchflusszytometer (FACSCalibur) gemessen.

3.2.6 *In-vivo*-Modell

Die durchgeführten Tierversuche wurden durch die *Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Eberhard-Karls-Universität Tübingen* und des *Universitätsklinikums Tübingen* und durch das *Regierungspräsidium Tübingen* (§4-Mitteilung vom 26.02.2018) begleitet und genehmigt. C57Bl/6J-Mäuse und B6.Cg-Tg (S100A8-cre, -EGFP)1llw/J-Mäuse wurden über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter speziellen pathogen-freien Bedingungen in der *Einrichtung für Tierhygiene der Universitätsklinik Tübingen* gehalten. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch die Betreuerin Dr. med. Natascha Köstlin-Gille, die Organpräparation gemeinsam mit der Betreuerin.

3.2.6.1 Studiendesign

Um die Frage zu klären, ob MDSC aus der Muttermilch aus dem Darm der Jungtiere in die Systemzirkulation übergehen, wurde ein *in-vivo*-Fütterungsmodell gewählt, bei dem weibliche transgene Mäuse, welche bei hemizygotem Vorliegen der genetischen Veränderung das green fluorescent protein (GFP) in Granulozyten und granulozytären/monozytären Vorläuferzellen (also auch in MDSC) exprimieren (hier GFP-positive (GFP⁺) Mäuse, B6.Cg-Tg(S100A8-cre, -EGFP)1llw/J), mit männlichen Wildtyp-Mäusen (hier GFP-negative (GFP⁻) Mäuse, C57BL/6J) verpaart wurden. Die neugeborenen Mäuse wurden nach 1 (P1), 7 (P7), 14 (P14) und 21 (P21) Tagen getötet und die Organe Leber, Milz und Blut entnommen. Es wurden anschließend die GFP⁻-Jungtiere auf das Vorhandensein von GFP⁺-Zellen in den verschiedenen Organen durchflusszytometrisch untersucht.

3.2.6.2 Organentnahme und -aufbereitung

Jungtiere an P1 und P7 wurden durch Dekapitation getötet. Die Tötung der Jungtiere an P14 und P21 erfolgte durch CO₂-Einleitung in den Heimatkäfigen und anschließende zervikale Dislokation. Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurde Blut in ein EDTA-Röhrchen abgenommen. Dies erfolgte bei den Tieren an P1 und P7 durch Entnahme mittels Kapillare aus dem Halsstumpf und bei den Tieren an P14 und P21 durch intrakardiale Punktion. Hierbei wurden pro Tier ca. 20–50 µl Blut an P1 und P7 und bis zu 200 µl Blut an P14 und P21 gewonnen. Anschließend wurde das Abdomen eröffnet, Milz und Leber entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS gelagert.

Blut: Zur Erythrozytenlyse wurde das Blut in ca. 1 ml Ammoniumchlorid-Puffer (NH₄Cl) aufgenommen und für 12 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Blut bei 600 g für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 600 g bei 4 °C). Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 1-4 x 10⁶ Zellen/ml in PBS für die weitere durchflusszytometrische Analyse eingestellt.

Milz und Leber: Zur Isolation von Splenozyten wurden die Milzen mithilfe eines Spritzen-Stempels (1 ml Spritze) durch einen 40 µm Filter gedrückt und der Filter mit PBS gespült. Die entstandene Zellsuspension wurde dann bei 600 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf $1-4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

Die durchflusszytometrische Färbung der Zellsuspensionen erfolgte nach dem folgenden Schema:

Tabelle 6: Durchflusszytometrische Antikörperfärbung der Zellsuspensionen

FACS-Röhrchen	Antikörper
1)	Keine Antikörper (Kontrolle)
2)	0,2 µl CD45 PE, 0,2 µl Gr1 PerCP, 0,5 µl CD11b Alexa

3.2.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am FACS-Calibur (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Die Auswertung der Messungen wurde mit den Software-Programmen CellQuest Pro™ und FlowJo® durchgeführt.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische und grafische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Die Daten wurden anhand des D'Agostino-Pearson-Test auf Gaußsche Normalverteilung untersucht. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurden Unterschiede zwischen 2 Gruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ausgewertet. Unterschiede zwischen mehr als 2 Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's Multiple Comparison Test ausgewertet. Korrelationen wurden anhand des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten analysiert. Für die Korrelationsanalyse des postnatalen Alters mit den ermittelten GR-MDSC Zahlen wurden longitudinale Messungen der Milch desselben Säuglings mit einbezogen. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

Ein Teil der folgenden Ergebnisse und dargestellten Abbildungen wurde bereits veröffentlicht: Köstlin-Gille, N., Flaig, L. A., Ginzel, M., Arand, J., Poets, C. F., Gille, C. 2020. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Milk (BM-MDSC) Correlate with Gestational Age and Postnatal Age and Are Influenced by Infant's Sex. *Nutrients* 12 (Köstlin-Gille et al., 2020).

In dieser Arbeit werden die Abbildungen 5A-J, 6A-E, 7A-C und 8A+B aus o. g. Publikation zitiert. Im weiteren Verlauf wird an den entsprechenden Abbildungen nicht mehr auf die Quelle verwiesen. Die Genehmigung zur Verwendung der hier dargestellten Grafiken erfolgte durch das Journal „Nutrients“.

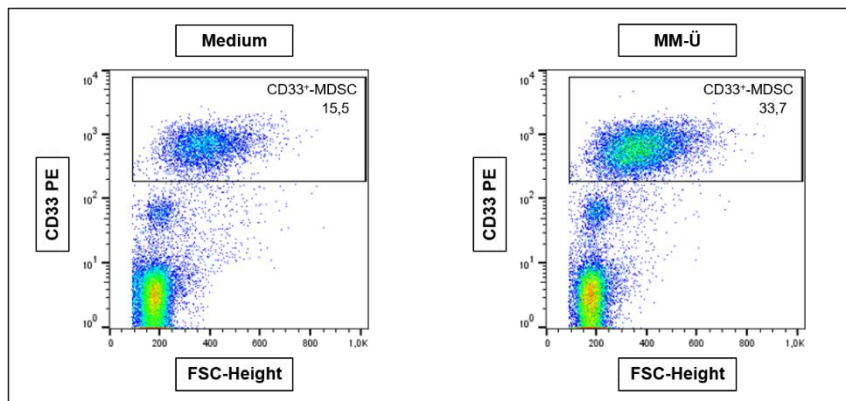
4.1 Induktion von MDSC durch Muttermilch

Nachdem in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Muttermilch einen deutlich höheren Anteil an MDSC enthält als das periphere Blut der korrespondierenden Mütter (Kostlin et al., 2018), wurde zunächst die Frage untersucht, ob azelluläre Bestandteile der Muttermilch eine Induktion von MDSC aus PBMC bewirken. Hierzu wurden isolierte PBMC für 6 Tage mit zellfreier, unterschiedlich behandelter Muttermilch kultiviert. Anschließend wurde der Anteil CD33⁺-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt und die suppressive Wirkung mittels T-Zell-Proliferationsassay untersucht.

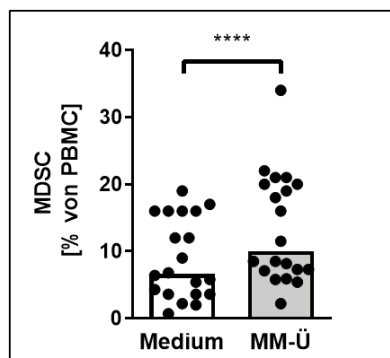
4.1.1 **Muttermilch führt zu einer quantitativen MDSC-Induktion aus PBMC**

Zunächst wurden PBMC für 6 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von zellfreier, aber sonst unbehandelter Muttermilch kultiviert. Als Kontrolle dienten Zellen, die in reinem Medium ohne Zugabe von Muttermilch kultiviert worden waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 25 %iger Muttermilch zum Medium zu einer prozentualen Zunahme von MDSC in der Kultur führte (13,4 % ± 8,1 % vs. 8,9 % ± 6,0 %, n = 20, p < 0,001, Abbildung 1B). Abbildung

1A stellt die verwendete Auswertestrategie dar. Beide Graphen zeigen den Anteil von CD33⁺-MDSC an der Gesamtheit der Zellen (Abbildung 1A).



(1A)



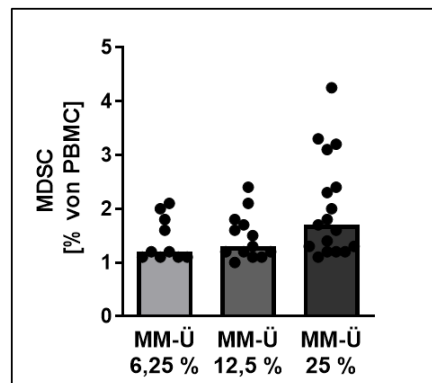
(1B)

Abbildung 1: MDSC-Induktion durch Muttermilch-Überstand

Muttermilch wurde von gesunden, stillenden Müttern gesammelt und die zellulären Bestandteile mittels Zentrifugation entfernt (Muttermilch-Überstand). Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder, nicht schwangerer Erwachsener isoliert und für 6 Tage ohne oder mit Zugabe von 25 %iger Muttermilch in Kulturmedium kultiviert. Als Kontrolle dienten PBMC in reinem Kulturmedium. Nach 6 Tagen wurde der Anteil CD33⁺-MDSC durchflusszytometrisch ermittelt. (1A) Repräsentative Density Plots zeigen den Anteil CD33⁺-MDSC an den PBMC ohne und mit Zugabe von 25 %igem Muttermilch-Überstand. (1B) Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von MDSC an allen PBMC ohne (Medium) oder mit Zugabe von 25 %igem Muttermilch-Überstand (MM-Ü). Jeder einzelne Punkt stellt den Messwert eines unabhängigen Versuches dar, der Balken zeigt den Mittelwert. n = 20, **** p < 0,001, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Um zu untersuchen, ob die Induktion von MDSC durch Muttermilch-Überstand konzentrationsabhängig erfolgt, wurde der Überstand in 6,25 %-, 12,5 %- und 25 %iger Konzentration zum Medium gegeben und es wurde dann die x-fache

Induktion als Quotient aus MDSC-Zahlen mit Zugabe von Muttermilch-Überstand und ohne Zugabe von Muttermilch-Überstand ermittelt. Abbildung 2A zeigt die konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils an MDSC an allen PBMC bei steigender Konzentration des Muttermilch-Überstandes (Abbildung 2A).



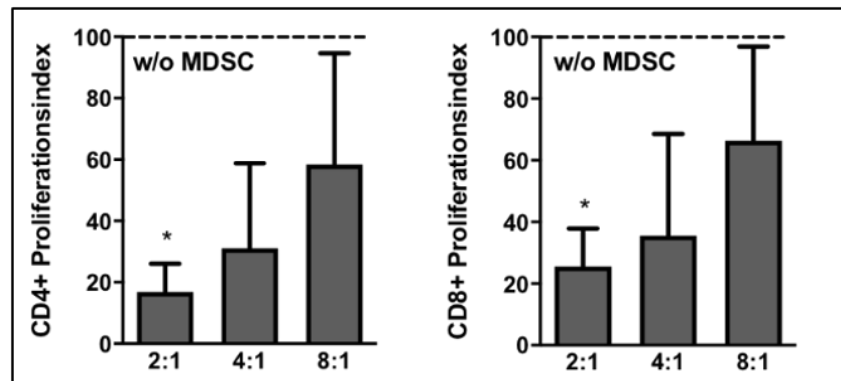
(2A)

Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Induktion von MDSC aus PBMC durch Muttermilch
 Muttermilch wurde von gesunden, stillenden Müttern gesammelt und die zellulären Bestandteile mittels Zentrifugation entfernt (Muttermilch-Überstand, MM-Ü). Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder, nicht schwangerer Erwachsener isoliert und für 6 Tage ohne oder mit Zugabe von Muttermilch in unterschiedlichen Konzentrationen kultiviert. Es wurde dann der prozentuale Anteil von MDSC an allen Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Punkte-Balken-Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von MDSC an allen PBMC mit Zugabe von 6,25%-, 12,5% - und 25 %igem MM-Ü. Jeder einzelne Punkt stellt den Messwert eines unabhängigen Versuches dar, der Balken zeigt den Mittelwert der Werte. n = 10-17.

4.1.2 Muttermilch induzierte MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von Muttermilch-Überstand zu einer quantitativen Induktion von MDSC aus PBMC führt, sollte im Weiteren überprüft werden, ob die durch Muttermilch induzierten MDSC hemmende Eigenschaften besitzen. Hierzu wurden nach sechstägiger Inkubation CD33⁺-Zellen mittels MACS aus der Kultur angereichert und in verschiedenen Verhältnissen zu frisch isolierten CFSE-markierten und mit OKT3 und IL-2 stimulierten PBMC desselben Spenders gegeben, der zuvor die Zellen für die MDSC-Induktion gespendet hatte. Nach viertägiger Kultur wurde dann die T-Zell-Proliferation durchflusszytometrisch ermittelt. Der Proliferationsindex wurde als

Quotient aus T-Zell-Proliferation unter Zugabe von MDSC und T-Zell-Proliferation ohne Zugabe von MDSC bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von induzierten MDSC die T-Zell-Proliferation von CD4⁺-T-Zellen konzentrationsabhängig auf 36 % (8:1), 27 % (4:1) und 9 % (2:1) der Proliferation ohne Zugabe von MDSC hemmte (n = 3-6, p < 0,05, Abbildung 3A).



(3A)

Abbildung 3: Durch Muttermilch induzierte MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation

Muttermilch wurde von gesunden, stillenden Müttern gesammelt und die zellulären Bestandteile mittels Zentrifugation entfernt (Muttermilch-Überstand, MM-Ü). Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder, nicht schwangerer Erwachsener isoliert und für 6 Tage ohne oder mit Zugabe von 25 %iger Muttermilch in Kulturmedium kultiviert. Es wurden dann die CD33⁺-Zellen mittels MACS angereichert und in den Verhältnissen 2:1, 4:1 und 6:1 (PBMC:MDSC) zu CFSE-gefärbten und IL-2/OKT3-stimulierten PBMC gegeben. Nach 96-stündiger Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Messung der T-Zell-Proliferation und der Abnahme der CFSE-Intensität. Die Proliferation von T-Zellen ohne induzierte MDSC wurde auf 100 % gesetzt. Es wurde dann der Proliferationsindex als Quotient aus Proliferation mit MDSC und Proliferation ohne MDSC errechnet. n = 3-6, * p < 0,05, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

4.1.3 Denaturierung und Kochen beeinflussen die MDSC-induzierende Wirkung von Muttermilch nicht

Um genauer zu untersuchen, welche Bestandteile der Muttermilch die Induktion von MDSC bewirken könnten, wurde der Überstand für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad denaturiert bzw. für 10 Minuten bei 100 °C gekocht, um die Proteinstrukturen zu zerstören. Für die Versuche wurde 12,5 %iger Überstand verwendet. Hier zeigte sich, dass weder das Erhitzen auf 56 °C (1,8fache Induktion vs. 1,9fache Induktion, Abbildung 4A), noch das Kochen bei 100 °C

(1,6fache Induktion vs. 1,7fache Induktion, Abbildung 4B) die induzierende Wirkung des Muttermilch-Überstandes aufheben konnten (beides n = 8, ns = nicht signifikant).

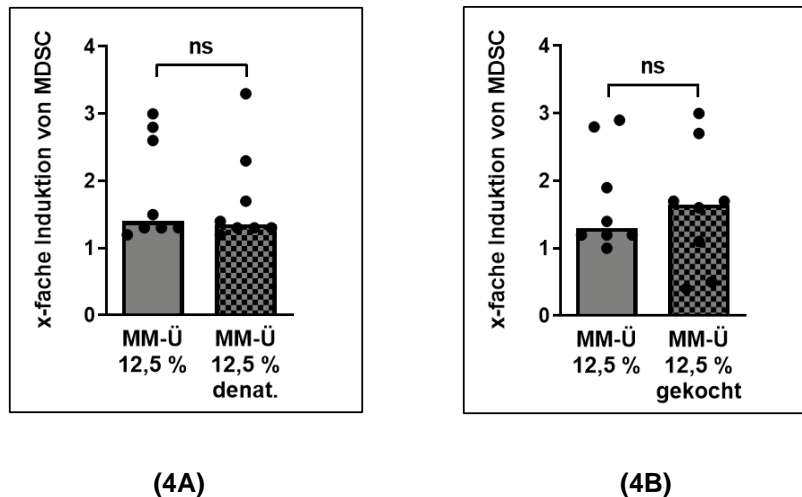


Abbildung 4: Vergleich der MDSC-induzierenden Wirkung von unbehandeltem Überstand mit denaturiertem und gekochtem Überstand

Muttermilch wurde von gesunden, stillenden Müttern gesammelt und die zellulären Bestandteile mittels Zentrifugation entfernt (Muttermilch-Überstand, MM-Ü). Der Überstand wurde entweder für 30 Minuten bei 56 °C oder für 10 Minuten bei 100 °C erhitzt, um die Proteinstrukturen zu zerstören. Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder, nicht schwangerer Erwachsener isoliert und für 6 Tage mit Zugabe von unbehandelter, denaturierter oder gekochter Muttermilch (Konzentration 12,5 %) kultiviert. Es wurde dann der prozentuale Anteil von CD33⁺-MDSC an allen Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (4A+B) Die Punkte-Balken-Diagramme zeigen den prozentualen Anteil von MDSC an allen PBMC bei Zugabe von unbehandeltem 12,5 %igem MM-Ü im Vergleich zu (4A) denaturiertem (denat.) 12,5 %igem MM-Ü oder (4B) gekochtem 12,5 %igem MM-Ü. Jeder einzelne Punkt stellt den Messwert eines unabhängigen Versuches dar, der Balken zeigt den Mittelwert der Werte. n = 8, ns = nicht signifikant, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

4.2 Longitudinale Quantifikation von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener

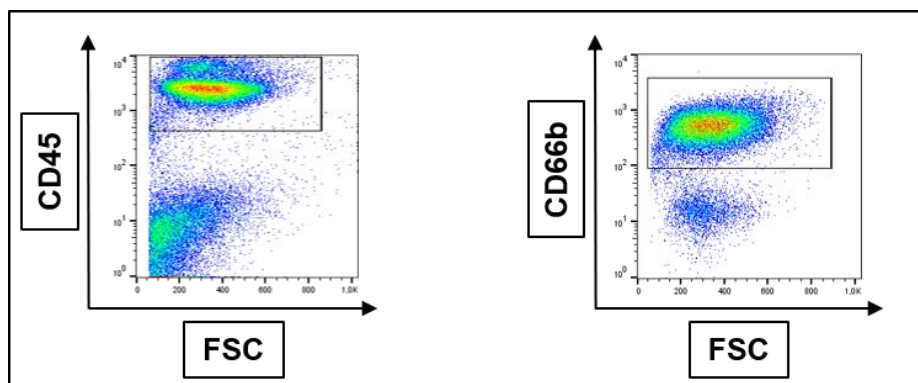
Bisher war lediglich bekannt, dass Muttermilch reifer Neugeborener einen hohen Anteil GR-MDSC enthält. Unbekannt war jedoch, wie sich der Anteil von GR-MDSC an allen Leukozyten in der Muttermilch frühgeborener Kinder verhält und ob es einen Zusammenhang von GR-MDSC-Zahlen in der Muttermilch und mütterlichen oder kindlichen Faktoren gibt. Daher wurde im Rahmen dieser

Studie der Anteil von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener über die ersten 35 Lebenstage durchflusszytometrisch ermittelt und mit verschiedenen Parametern korreliert. Die Ergebnisse sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

4.2.1 Der Anteil von GR-MDSC an allen Leukozyten in der Muttermilch nimmt mit zunehmendem Gestationsalter zu

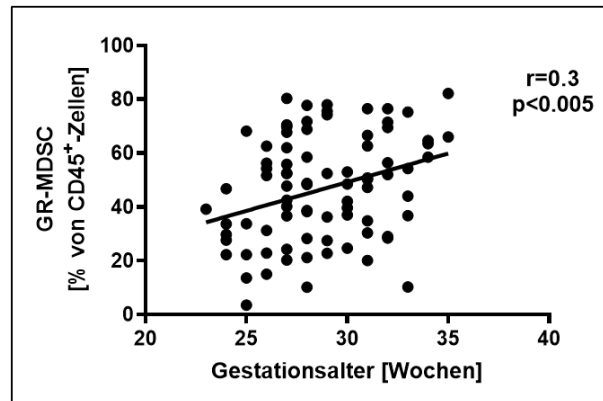
86 Mütter von 105 Frühgeborenen wurden in die Studie eingeschlossen. 34 Mütter wurden vor 28+0 SSW entbunden, weitere 34 Mütter zwischen 28+0 und 31+6 SSW und 18 Frauen nach 32+0 SSW. Tabelle 3 stellt die kindlichen und Tabelle 4 die mütterlichen Charakteristika der Studienkohorte dar.

Zuerst wurde der Anteil an GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener in Abhängigkeit vom Gestationsalter (GA) analysiert. Dafür wurden die prozentualen Anteile der GR-MDSC an allen Leukozyten in der Muttermilch jeder teilnehmenden Mutter über die ersten 5 Lebenswochen des Neugeborenen hinweg ermittelt und der Mittelwert errechnet. Abbildung 5A verbildlicht die Gatingstrategie für GR-MDSC in der Muttermilch.



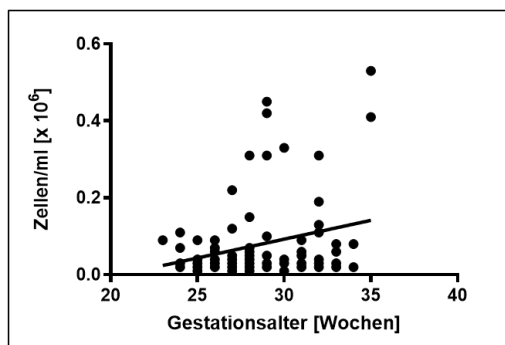
(5A)

Anhand eines Regressionsmodells konnte gezeigt werden, dass die Mittelwerte der GR-MDSC Zahlen positiv mit dem Gestationsalter bei Geburt korrelieren ($n = 86$, $p < 0,005$, $r = 0,3$, Abbildung 5B).

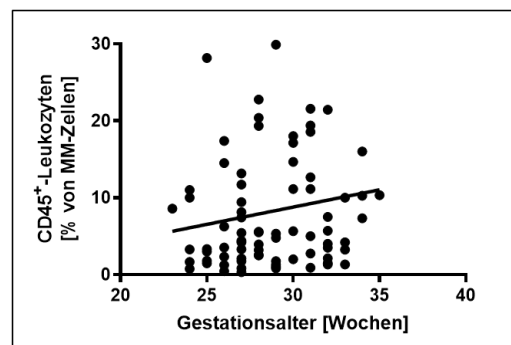


(5B)

Der absolute Zellanteil (Abbildung 5C) und der prozentuale Anteil (Abbildung 5D) von CD45⁺-Leukozyten in der Muttermilch korrelierte hingegen nicht mit dem Gestationsalter.

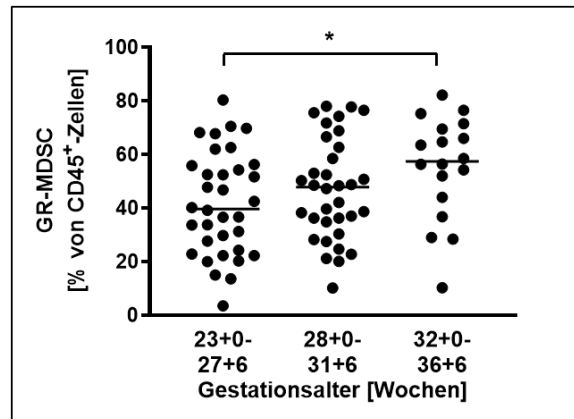


(5C)



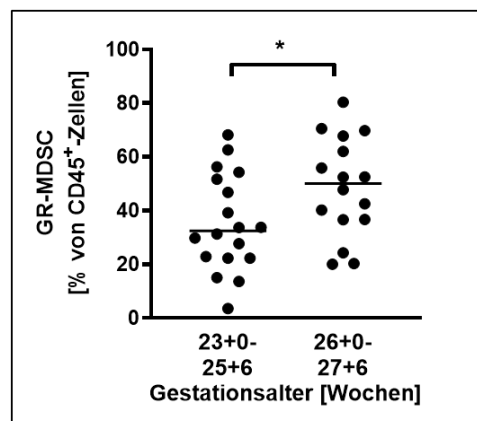
(5D)

Abhängig vom Gestationsalter der Frühgeborenen, wurden die Mütter ferner in 3 Gruppen eingeteilt (Gruppe 1: <28+0 SSW, Gruppe 2: 28+0 – 31+6 SSW, Gruppe 3: >32+0 SSW). Dabei zeigte sich, dass der GR-MDSC-Anteil in Gruppe 1 am geringsten war (Median 39,7 %, n = 34). In Gruppe 2 (Median 47,9 %, n = 34, nicht signifikant im Vergleich mit Gruppe 1) und Gruppe 3 (Median 57,5 %, n = 18, p < 0,05 im Vergleich zu Gruppe 1) nahm der Anteil von GR-MDSC zu (Abbildung 5E).



(5E)

Aufgrund des hohen Risikos für lebensgefährliche Komplikationen während der Neonatalperiode bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <28+0 SSW, wurde die Gruppe der vor der 28+0 SSW Geborenen in 2 weitere Gruppen (<26+0 SSW und 26+0 – 27+6 SSW) unterteilt. Hier fiel auf, dass der Anteil von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener <26+0 SSW signifikant niedriger war (Median 32,5 %, n = 18) als in der Muttermilch derer, die zwischen der 26+0 – 27+6 SSW geboren wurden (Median 50,1 %, n = 16, p < 0,05, Abbildung 5F).

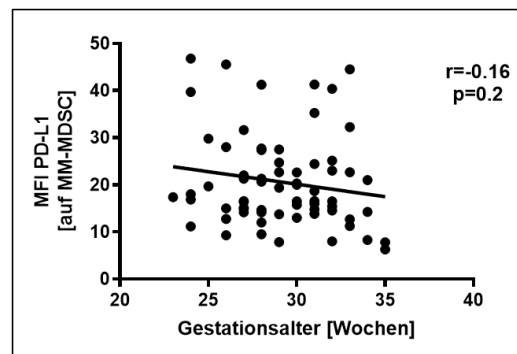


(5F)

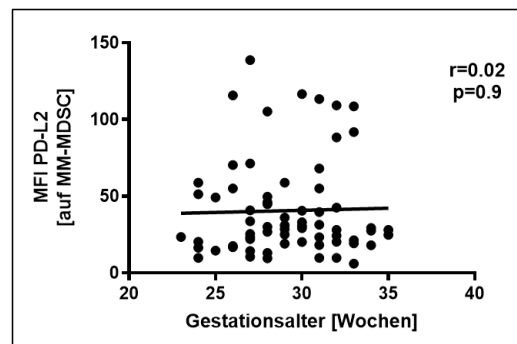
Weiter wurde die Expression der Aktivierungsmarker CXCR4, PD-L1 und PD-L2 auf GR-MDSC aus der Muttermilch analysiert. Hier konnte keine Korrelation mit dem Gestationsalter festgestellt werden (Abbildung 5G-J).



(5G)



(5H)



(5J)

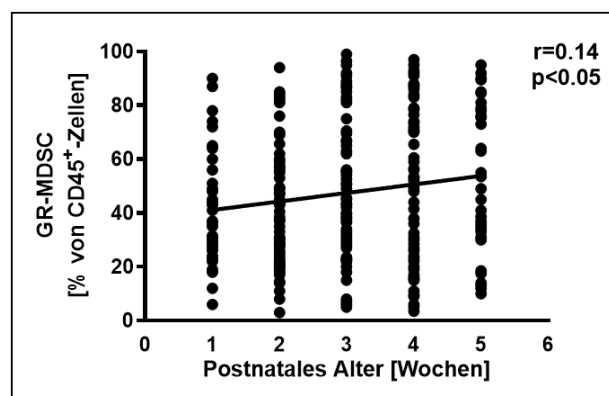
Abbildung 5: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Milchzellen wurden aus der Muttermilch gesunder, stillender Mütter Frühgeborener während der ersten 5 Lebenswochen der Neugeborenen isoliert. Es wurden die prozentualen Anteile von GR-MDSC an allen CD45⁺-Leukozyten in der Muttermilch (MM-MDSC) und die Expression der Aktivierungsmarker CXCR4, PD-L1 und PD-L2 auf MM-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Mittelwerte der Anteile von MM-MDSC und die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der Aktivierungsmarker wurden über die ersten 5 Lebenswochen hinweg ermittelt. (5A) Repräsentative Density Plots zeigen den Anteil CD45⁺- und CD66⁺-MDSC an allen Muttermilch-Leukozyten. (5B) Das Punktediagramm zeigt den prozentualen Anteil von GR-MDSC an allen CD45⁺-Milchleukozyten in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Das logistische Regressionsmodell stellt die Korrelation zwischen den prozentualen MM-MDSC-Anteilen und dem Gestationsalter

dar. $n = 86$, *** $p < 0,005$; Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient. (5C+D) Die logistischen Regressionsmodelle stellen den absoluten und prozentualen Zellanteil von CD45⁺-Leukozyten in der Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter dar. $n = 86$, ns = nicht signifikant, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient. (5E) Das Punktediagramm zeigt den prozentualen Anteil von GR-MDSC an allen CD45⁺-Leukozyten in der Muttermilch von Müttern Frühgeborener, die mit einem Gestationsalter $<28+0$ SSW, zwischen $28+0$ und $31+6$ SSW oder $>32+0$ geboren wurden. $n = 18-34$, * $p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Test. (5F) Das Punktediagramm zeigt den prozentualen Anteil von MM-MDSC von Müttern Frühgeborener, die entweder $<26+0$ SSW oder zwischen $26+0$ und $27+6$ SSW entbunden wurden. $n = 34$, * $p < 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. (5G-J) Die Punktediagramme veranschaulichen die Expression von (5G) CXCR4, (5H) PD-L1 und (5J) PD-L2 auf MM-MDSC abhängig vom Gestationsalter. $n = 86$, ns = nicht signifikant, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient.

4.2.2 Der Anteil von MM-MDSC an allen Leukozyten in der Muttermilch steigt mit zunehmendem postnatalen Alter

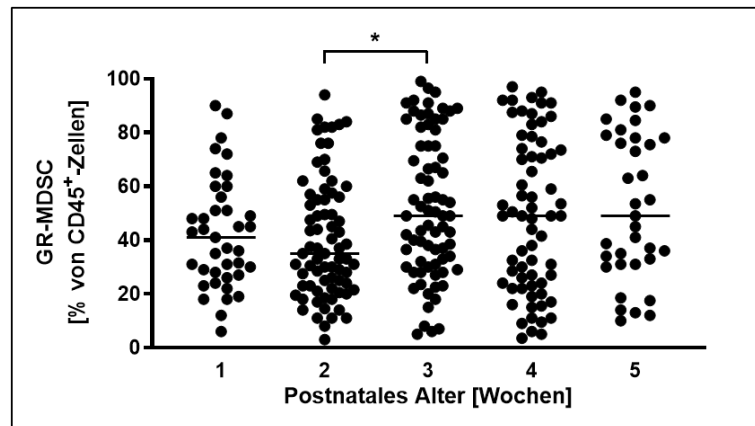
Weiter wurde der prozentuale Anteil von GR-MDSC in der Muttermilch abhängig vom postnatalen Alter untersucht. 39 von 86 Müttern spendeten bereits in der ersten Lebenswoche der Frühgeborenen Muttermilch. Von jeweils 74 Müttern waren Muttermilchproben in der 2. und 3. Lebenswoche verfügbar, von 66 Müttern in der 4. und von 35 Müttern in der 5. Lebenswoche. Die Korrelationsanalyse zeigte, dass das postnatale Alter geringfügig, aber signifikant mit den analysierten MM-MDSC-Zahlen korrelierte ($n = 288$, $r = 0,14$, $p < 0,05$, Abbildung 6A).



(6A)

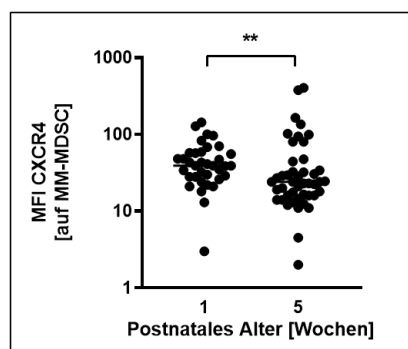
Die gesonderte Analyse der einzelnen postnatalen Lebenswochen ergab, dass es eine Zunahme der MM-MDSC zwischen Woche 2 (Median 35,0 %, $n = 74$)

und Woche 3 (Median 49,0 %, $n = 74$, $p < 0,05$) gab, wobei die Gesamtmenge der Leukozyten in der Muttermilch im Laufe der ersten 5 Wochen der Stillperiode gleich blieben (Abbildung 6B).

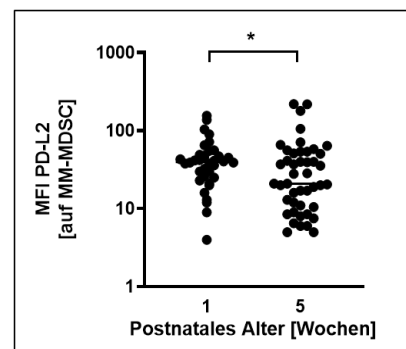


(6B)

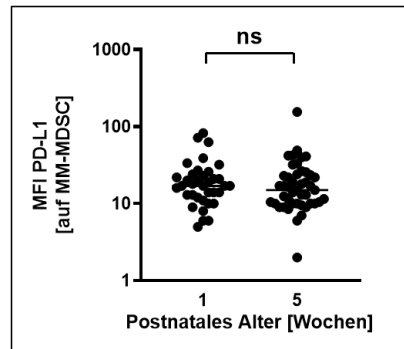
Bei dem Vergleich der auf den MM-MDSC exprimierten Aktivitätsmarkern CXCR4, PD-L1 and PD-L2 zwischen Woche 1 und Woche 5 fiel eine reduzierte Expression von CXCR4 (Abbildung 6C, Median MFI 39,0 in Woche 1 und 24,0 in Woche 5, $n = 36-45$, $p < 0,005$) und PD-L2 (Abbildung 6D, Median MFI 39,8 in Woche 1 und 21,0 in Woche 5, $n = 36-45$, $p < 0,05$) in Woche 5 auf. Die Expression von PD-L1 blieb unverändert (Abbildung 6E).



(6C)



(6D)



(6E)

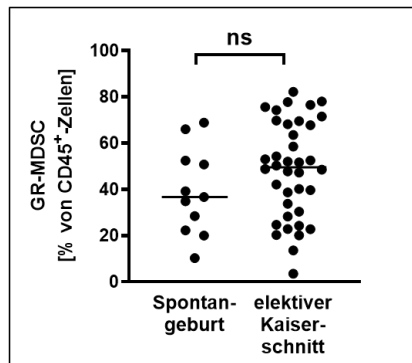
Abbildung 6: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch von Frühgeborenen in Abhängigkeit vom postnatalen Alter

Milchzellen wurden aus der Muttermilch gesunder, stillender Mütter Frühgeborener während der ersten 5 Lebenswochen der Neugeborenen isoliert. Es wurden die prozentualen Anteile von GR-MDSC an allen CD45⁺-Leukozyten in der Muttermilch und die Expression der Aktivierungsmarker CXCR4, PD-L1 und PD-L2 auf MM-MDSC durchflusszytometrisch bestimmt. Die Mittelwerte der Anteile von MM-MDSC und die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der Expression der Aktivierungsmarker auf MM-MDSC wurden über die ersten 5 Lebenswochen hinweg ermittelt. (6A) Das Punktediagramm verbildlicht den prozentualen Anteil von GR-MDSC an allen CD45⁺-Milchleukozyten in Abhängigkeit vom postnatalen Alter. Die Regressionsgerade visualisiert die Korrelation zwischen den prozentualen MM-MDSC-Anteilen und dem postnatalen Alter. $n = 288$, $* p < 0,05$, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient. (6B) Das Punktediagramm zeigt den prozentualen Anteil von GR-MDSC in der Muttermilch von Müttern Frühgeborener während der ersten 5 postnatalen Lebenswochen. $n = 35-74$, $* p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Test. (6C-E) Die Punktediagramme veranschaulichen die Expression von (6C) CXCR4, (6D) PD-L2 und (6E) PD-L1 auf MM-MDSC in den der ersten und fünften Lebenswoche. $n = 36-45$, $* p < 0,05$, $** p < 0,005$, ns = nicht signifikant, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

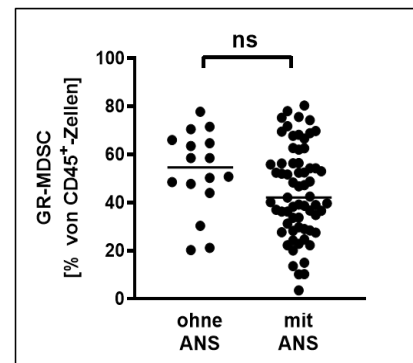
4.2.3 Einfluss mütterlicher Faktoren auf den Anteil an GR-MDSC in der Muttermilch

Um zu untersuchen, ob GR-MDSC-Zahlen in der Muttermilch durch mütterliche Faktoren beeinflusst werden, wurde der Anteil von GR-MDSC an allen Leukozyten vergleichend bei Müttern nach Spontangeburt oder Kaiserschnittgeburt, mit oder ohne antenataler Steroidgabe und mit oder ohne pränataler Tokolyse analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Anteil an GR-MDSC bei Müttern mit Kaiserschnitt/Sektio im Vergleich zu Müttern mit Spontangeburt tendenziell erhöht war (Median 49,5 % vs. 36,7 %, $n = 11-38$, Abbildung 7A). Mütter, welche antepartal Steroide zur Lungenreifeinduktion erhalten hatten, wiesen tendenziell niedrigere MM-MDSC-Spiegel auf als Mütter ohne antepartale Steroidtherapie

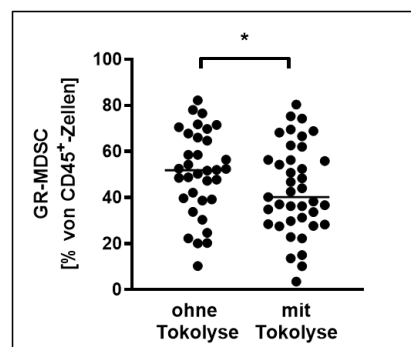
(Median 42,1 % vs. 54,6 %, n = 16-65, Abbildung 7B). Bei beiden Vergleichen waren die Unterschiede nicht signifikant. Interessanterweise hatten Frauen, die Tokolyse erhalten hatten, signifikant niedrigere MM-MDSC-Zahlen als Frauen ohne tokolytische Therapie (Median 40,2 % vs. 51,8 %, n = 34-39, p < 0,05, Abbildung 7C).



(7A)



(7B)



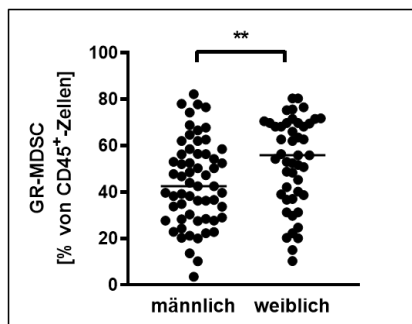
(7C)

Abbildung 7: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener (mütterliche Charakteristika)

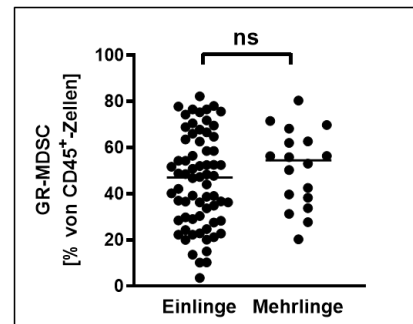
Milchzellen wurden aus der Muttermilch gesunder, stillender Mütter Frühgeborener während der ersten 5 Lebenswochen der Neugeborenen isoliert. Es wurden die prozentualen Anteile von GR-MDSC an allen CD45⁺-Leukozyten in der Muttermilch durchflusszytometrisch bestimmt. Der Mittelwert der MM-MDSC Zahlen wurde errechnet. (7A-C) Die Punktediagramme verbildlichen jeweils die Expression von GR-MDSC in der Muttermilch von Frauen (7A) mit Spontangeburt und Kaiserschnitt/Sektio, (7B) von Frauen mit und ohne antenataler Steroid-Gabe und (7C) von Frauen mit und ohne vorgeburtlicher Tokolyse. n = 11-65, * p < 0,05, ns = nicht signifikant, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

4.2.4 Einfluss kindlicher Faktoren auf den Anteil von GR-MDSC in der Muttermilch

Zuletzt wurde geprüft, ob kindliche Eigenschaften das Vorkommen von MDSC in der Muttermilch beeinflussen. Hierbei zeigte sich, dass signifikant höhere GR-MDSC-Werte in der Muttermilch von Müttern weiblicher Frühgeborener vorlagen, als in der Milch von Müttern männlicher Frühgeborener (Median 55,9 % vs. 42,5 %, $n = 47-59$, $p < 0,005$, Abbildung 8A). Multiparität hingegen hatte keinen Einfluss auf die MM-MDSC-Zahlen (Median bei Multiparität 54,4 % vs. Median nach Ein-Kind-Schwangerschaften 47,4 %, $n = 18-68$, Abbildung 8B).



(8A)



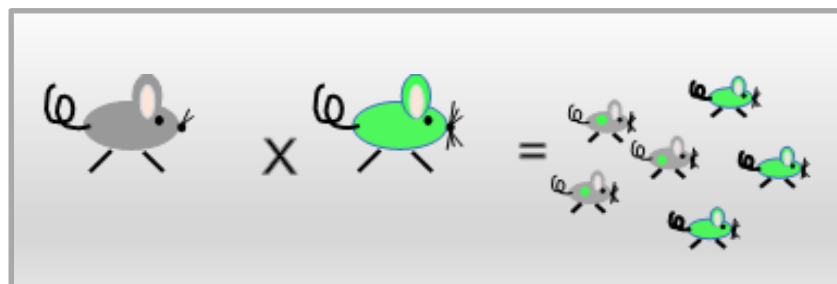
(8B)

Abbildung 8: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener (kindliche Charakteristika)

Milchzellen wurden aus der Muttermilch gesunder, stillender Mütter Frühgeborener während der ersten 5 Lebenswochen der Neugeborenen isoliert. Es wurden die prozentualen Anteile der GR-MDSC an allen CD45+-Leukozyten in der Muttermilch durchflusszytometrisch bestimmt. Der Mittelwert der MM-MDSC Zahlen wurde errechnet. (8A-B) Die Punktediagramme visualisieren die Expression von GR-MDSC in der Muttermilch von Müttern (8A) weiblicher und männlicher Frühgeborener, sowie bei (8B) Einlings- und Mehrlingsgeburten. $n = 18-68$, ** $p < 0,005$, ns = nicht signifikant, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

4.3 In-vivo-Fütterungsmodell

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte *in-vitro* bereits gezeigt werden, dass MDSC resistent gegenüber pH-Änderungen und enzymatischem Verdau sind (Referenz). Darauf aufbauend sollte nun die Frage untersucht werden, ob MDSC aus der Muttermilch auch systemisch aufgenommen werden und somit die Immunantwort des Neugeborenen potenziell beeinflussen können. Hierzu wurde ein *in-vivo*-Fütterungsmodell angewandt, in dem weibliche Mäuse, die in myeloiden Zellen das grün fluoreszierende Protein GFP exprimieren, mit männlichen Wildtyp-Mäusen verpaart wurden. Dadurch wurde erreicht, dass ungefähr die Hälfte der Jungtiere GFP in myeloiden Zellen exprimierten (GFP⁺) und die andere Hälfte nicht (GFP⁻). Die GFP⁻-Jungtiere wurden anschließend auf die Existenz von GFP⁺-Zellen (welche nur von der Mutter stammen können) in den verschiedenen Organen untersucht. Abbildung 9 zeigt schematisch das Verpaarungsmodell:



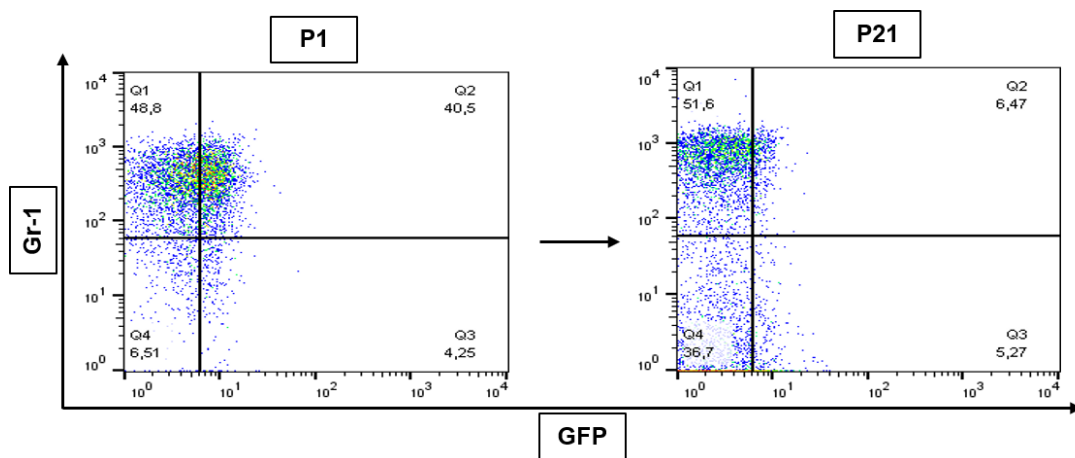
(9A)

Abbildung 9: GFP-Verpaarungsmodell der Maus

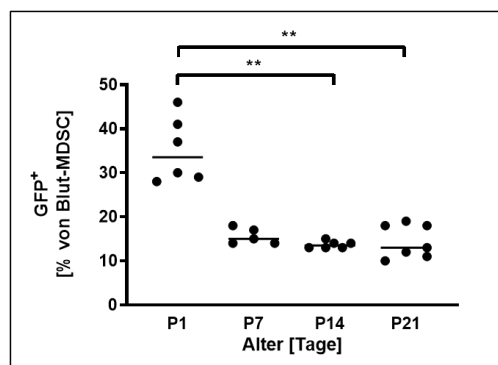
Weibliche transgene Mäuse, welche bei hemizygotem Vorliegen der genetischen Veränderung das green fluorescent protein in Granulozyten und granulozytären/monozytären Vorläuferzellen exprimieren (hier GFP⁺-Mäuse, B6.Cg-Tg(S100A8-cre, -EGFP)1llw/J), wurden mit männlichen Wildtyp-Mäusen (hier GFP⁻-Mäuse, C57BL/6J) verpaart. Die neugeborenen Mäuse wurden nach 1 (P1), 7 (P7), 14 (P14) und 21 (P21) Tagen getötet und die Organe Leber, Milz und Lunge, sowie das Blut entnommen. Die Jungtiere, die selbst kein GFP exprimierten, aber durch ein GFP⁺ Muttertier gesäugt wurden, wurden auf das Vorhandensein von GFP⁺-MDSC in den jeweiligen Organen und im Blut durchflusszytometrisch analysiert. Diese GFP⁺-MDSC stammen von der Mutter.

4.3.1 MDSC aus der Muttermilch gelangen in die Systemzirkulation der neugeborenen Mäuse

Es zeigte sich, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten (Lebenstag 1, 7, 14 und 21) GFP⁺-MDSC im Blut, in der Milz und in der Leber der GFP⁻-Jungtiere zu finden waren. Im Blut lag der Anteil GFP⁺-MDSC an allen MDSC an P1 bei 35,2 % und sank dann auf 15,6 % (P7), 13,7 % (P14) und 14,4 % (P21) ab (n = 5-7, p < 0,01, Abbildung 10B).

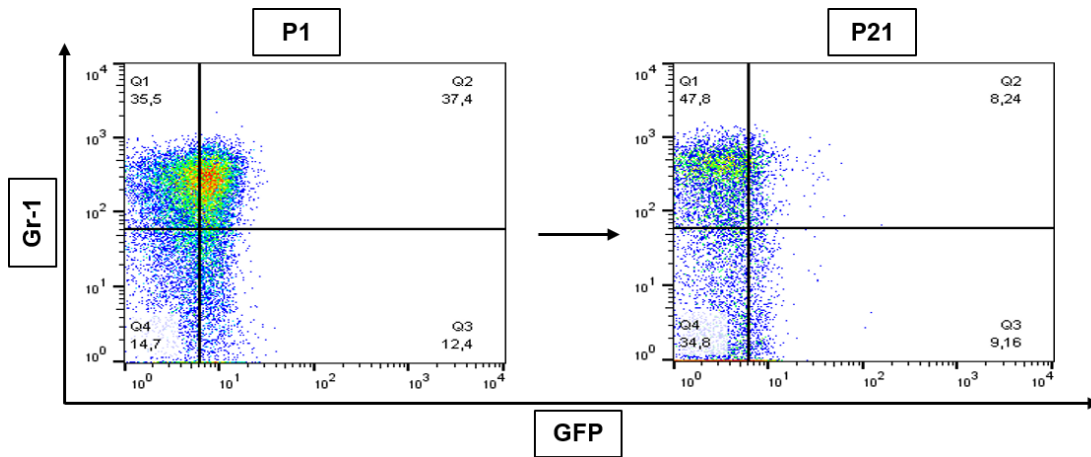


(10A)

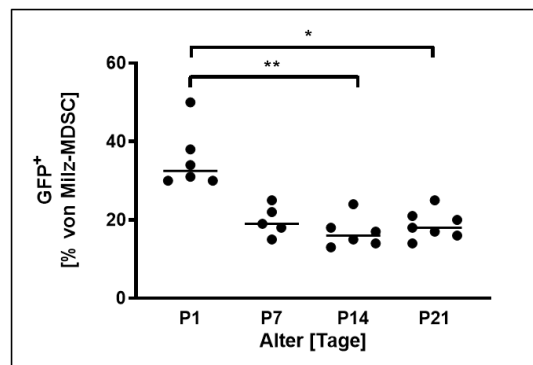


(10B)

In der Milz lag der Anteil GFP⁺-MDSC an allen MDSC an P1 bei 35,5 % und sank dann auf 19,8 % (P7), 16,8 % (P14) und 18,7 % (P21) ab (n = 5-7, p < 0,05, p < 0,01, Abbildung 10D).

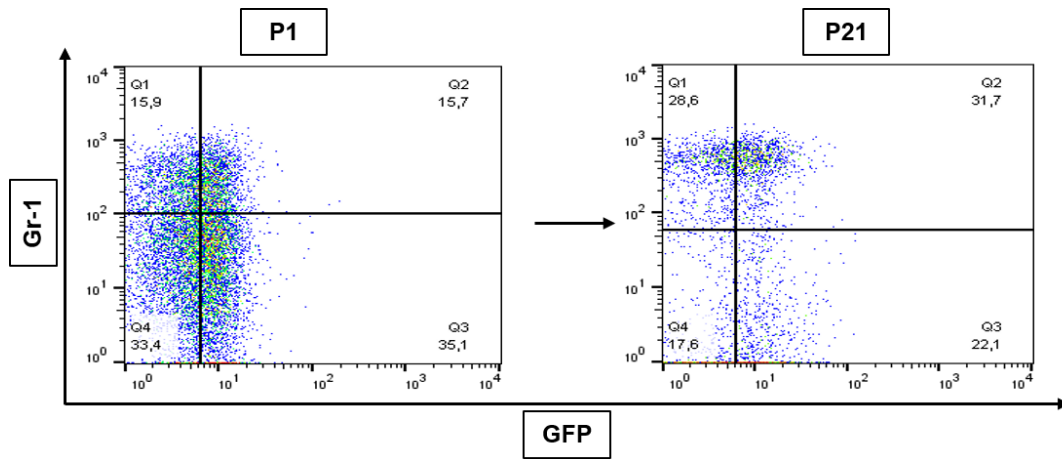


(10C)

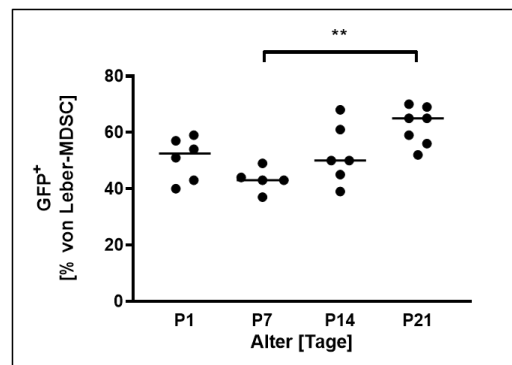


(10D)

In der Leber lag der Anteil GFP⁺-MDSC an allen MDSC an P1 mit 50,7 % am höchsten. Er sank dann leicht auf 43,2 % (P7), um dann wieder auf 52,2 % (P14) und 62,3 % an P21 anzusteigen (n = 5-7, p < 0,01, Abbildung 10F).

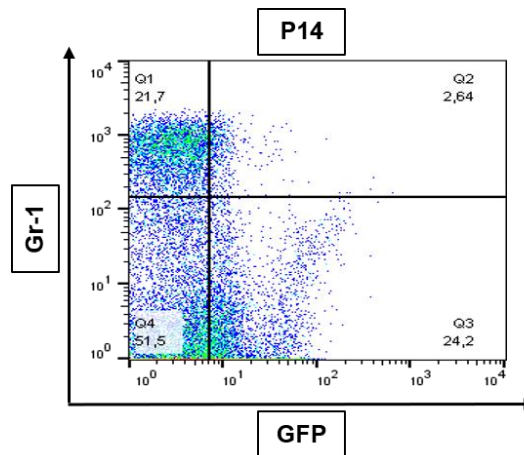


(10E)



(10F)

Auch in der Lunge der Jungtiere waren GFP⁺-MDSC zu finden. Hier wurde allerdings nur der Zeitpunkt P14 untersucht, so dass nur ein Beispielplot abgebildet wird (Abbildung 10G).



(10G)

Abbildung 10: Anteil der GFP⁺-Zellen in Blut, Milz, Leber und Lunge der Jungtiere abhängig vom postnatalen Alter

GFP⁺-Muttertiere wurden mit GFP⁻-Männchen verpaart. Die GFP⁻-Jungtiere wurden am 1. (P1), 7. (P7), 14. (P14) und 21. (P21) Lebenstag getötet und Blut, Milz, Leber und Lunge wurden durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von GFP⁺-Zellen untersucht. (10A) Repräsentative Density Plots zeigen den Anteil GFP⁺-Zellen an allen MDSC im Blut von Jungtieren an P1 (links) und P21 (rechts). (10B) Das Punktediagramm zeigt den Anteil GFP⁺-Zellen im Blut der GFP⁻-Jungtiere an P1, P7, P14 und P21. Der Strich zeigt den Median der Werte. (10C) Repräsentative Density Plots zeigen den Anteil GFP⁺-Zellen an allen MDSC in der Milz von Jungtieren an P1 (links) und P21 (rechts). (10D) Das Punktediagramm zeigt den Anteil GFP⁺-Zellen in der Milz der GFP⁻-Jungtiere an P1, P7, P14 und P21. Der Strich zeigt den Median der Werte. (10E) Repräsentative Density Plots zeigen den Anteil GFP⁺-Zellen an allen MDSC in der Leber von Jungtieren an P1 (links) und P21 (rechts). (10F) Das Punktediagramm zeigt den Anteil GFP⁺-Zellen im Blut der GFP⁻-Jungtiere an P1, P7, P14 und P21. Der Strich zeigt den Median der Werte. (10G) Der repräsentative Density Plot zeigt den Anteil GFP⁺-Zellen an allen MDSC in der Lunge von Jungtieren an P14. n = 5-7, * p < 0,05, ** p < 0,01, Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Multiple Comparison Test.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von GR-MDSC in der Muttermilch genauer zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf folgenden 4 Forschungsfragen:

- 1) Werden MDSC durch Bestandteile der Muttermilch induziert?
- 2) Wie verhalten sich die Zahlen von GR-MDSC in der Muttermilch frühgeborener Kinder?
- 3) Gibt es eine Korrelation zwischen klinischen Eigenschaften von Mutter und Kind und MDSC-Zahlen in der Muttermilch?
- 4) Können MDSC aus der Muttermilch systemisch aufgenommen werden und damit die Immunantwort des Neugeborenen modulieren?

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass (1) MDSC durch azelluläre Bestandteile der Muttermilch induziert werden, dass (2) die MDSC-Zahlen in der Muttermilch frühgeborener Kinder sowohl mit dem Gestationsalter als auch mit dem postnatalen Alter korrelieren und (3) von mütterlichen und kindlichen Faktoren beeinflusst werden. Überdies konnte in vivo gezeigt werden, dass (4) MDSC aus der Muttermilch in die Systemzirkulation des Neugeborenen gelangen. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Induktion von GR-MDSC durch Muttermilch

Eine Akkumulation von MDSC unter pathologischen Bedingungen konnte bereits vor Jahrzehnten im Rahmen von Tumorerkrankungen beschrieben werden (Young et al., 1987, Youn et al., 2008, Brandau et al., 2011, Wu et al., 2014b). In den folgenden Jahren wurde gezeigt, dass es unter anderen inflammatorischen Bedingungen wie Autoimmunerkrankungen und Traumata, ebenfalls zu einer Expansion von MDSC kommt (Cuenca et al., 2011, Crook and Liu, 2014, Boros et al., 2016, Mira et al., 2017, Li et al., 2018). Ferner konnte eine MDSC-Expansion im Rahmen verschiedenster Infektionserkrankungen nachgewiesen werden (De Santo et al., 2008, Vollbrecht et al., 2012, Zhu et al., 2012, Goh et

al., 2013, Kong et al., 2014, Pallett et al., 2015, Goh et al., 2016, O'Connor et al., 2017). Im Rahmen einer Adipositas scheint es ebenfalls zu einer Induktion von MDSC zu kommen, wodurch das Risiko für die Entstehung von Tumorerkrankungen erhöht wird (Okwan-Duodu et al., 2013, Ostrand-Rosenberg, 2018, Turbitt et al., 2019). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass MDSC auch unter physiologischen Bedingungen während der Schwangerschaft sowohl im mütterlichen als auch im fetalen und neonatalen Organismus vorkommen und akkumulieren (Kostlin et al., 2014, Kostlin et al., 2016, Schwarz et al., 2018, Kostlin et al., 2018). Diese unterschiedlichen Rahmenbedingungen, unter denen es zu einer MDSC-Akkumulation kommt, sind Grund für die Annahme, dass es verschiedene ursächliche Mechanismen gibt, die zu einer Induktion von MDSC führen. Mehrere lösliche Faktoren scheinen an der myeloiden Zellexpansion beteiligt und für die Plastizität von myeloischen Vorläuferzellen verantwortlich zu sein (Mandrizzato et al., 2009).

Condamine et al. entwickelten ein Zwei-Phasen-Modell (Condamine and Gabrilovich, 2011, Condamine et al., 2015) der Induktion von MDSC: Sie postulierten, dass es zunächst zu einer Expansion unreifer myeloider Vorläuferzellen kommt – auch Notfall-Myelopoese genannt –, die durch Wachstumsfaktoren aus der Tumorumgebung oder aus chronischen Entzündungsherden getriggert wird (Mantovani et al., 2008, Gabrilovich et al., 2012). Zu diesen Wachstumsfaktoren zählen beispielsweise der Monozytenkolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) (Franklin et al., 2014, Sica et al., 2019). In der 2. Phase kommt es – durch proinflammatorische Zytokine, Prostaglandine und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) – zur Aktivierung der unreifen Zellen, was dann zur Entstehung von MDSC führt (Condamine and Gabrilovich, 2011, Bleve et al., 2020). Spezifische in die Induktion von MDSC involvierte Faktoren sind IL-6 (Chen et al., 2014), HGF, TLR2 getriggerte Tumor-Exosomen und IL-11 (Condamine et al., 2015).

Einen weiteren Mechanismus der MDSC-Induktion beschreiben Lechner et al. anhand eines *in-vitro*-Modells: Sie kultivierten PBMC gesunder Spender für eine Woche zusammen mit verschiedenen Kombinationen aus immunmodulatorischen Zytokinen wie GM-CSF, IL1- β , IL-6, VEGF, transformierendem Wachstumsfaktor β (TGF- β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Sinha et al., 2007) oder Tumorzelllinien und konnten anschließend zeigen, dass in der Kultur ein hoher Anteil CD33⁺-Zellen mit suppressiven Eigenschaften zu finden war (Lechner et al., 2010, Lechner et al., 2011).

Mit demselben Versuchsansatz konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I-Molekül HLA-G, welches während der Schwangerschaft von Trophoblastzellen exprimiert wird, sowie die Co-Kultur von PBMC mit Trophoblastzellen, ebenfalls MDSC induzieren (Kostlin et al., 2016, Kostlin et al., 2017).

Rodriguez et al. untersuchten einen anderen Ansatz und stellten die Hypothese auf, dass MDSC ein Subtyp hochaktiver polymorphkerniger Leukozyten (PMN) sein könnten (Rodriguez et al., 2009).

In Bezug auf die Mechanismen, die zur Akkumulation von MDSC in der Muttermilch führen, untersuchte unsere Arbeitsgruppe in einem vorangegangenen Projekt, ob die Laktationshormone Prolaktin und Oxytocin MDSC aus PBMC induzieren können. Hierbei konnten allerdings keine induzierenden Effekte nachgewiesen werden (Köstlin et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit wird nun gezeigt, dass die Zugabe von zellfreiem Muttermilch-Überstand zu PBMC eine Induktion von MDSC bewirkte. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass Prozesse wie Denaturierung (Erhitzen bei 56 °C für 30 Minuten) oder Kochen (bei 100 °C für 10 Minuten), welche die Proteinstrukturen der Muttermilchbestandteile zerstören, diesen Effekt nicht beeinflussten, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es keine Proteinbestandteile sind, die zur MDSC-Induktion durch Muttermilch führen. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass Fettsäuren die Funktionen von Immunzellen beeinflussen können (Vats et al., 2006, Cubillos-Ruiz et al., 2015,

Huang et al., 2014, Condamine et al., 2016, Al-Khami et al., 2017a). Auch MDSC scheinen in der Lage zu sein, die Aufnahme und Oxidation von Fettsäuren zu steigern und somit eigene immununterdrückende Eigenschaften zu maximieren (Hossain et al., 2015, Al-Khami et al., 2016). So konnte gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende MDSC bevorzugt Fettsäure- β -Oxidation als primäre Energiequelle nutzen (Hossain et al., 2015). Al-Khami et al. zeigten, dass tumorinfiltrierende MDSC ihre Lipidaufnahme erhöhen und eine metabolische und funktionelle Umprogrammierung zu immunsuppressiven Zellen durchmachen und dass diese metabolische Umwandlung mit einer simultanen Aktivierung von immunaktiver Arginase 1 und induzierbarer NO-Synthase (iNOS) einhergeht (Hossain et al., 2015, Al-Khami et al., 2016). Weiterhin wurde gezeigt, dass vom Tumor stammende Zytokine (G-CSF und GM-CSF) die Expression von Lipidtransportrezeptoren verstärken und daraus eine gesteigerte Fettsäuren-Akkumulation in den MDSC resultiert (Al-Khami et al., 2017b). Es wird angenommen, dass dadurch nicht nur der oxidative Metabolismus angetrieben, sondern auch immunsuppressive Mechanismen aktiviert werden. In dem Zusammenhang untersuchten Veglia et al. die spezifische Rolle des Fettsäuretransportproteins 2 (FATP2) und stellten fest, dass sowohl murine als auch humane GR-MDSC die Expression von FATP2 hochregulieren konnten und dass ein Fehlen von FATP2 die suppressive Aktivität von MDSC aufhebt (Veglia et al., 2019).

Muttermilch enthält beträchtliche Mengen an Lipiden, die zu ca. 98 % aus Triglyceriden bestehen. Die Lipidkonzentrationen in der Muttermilch variieren dabei stark. In der Milch befindliche Fettsäuren werden entweder aus Fettgewebespeichern mobilisiert, direkt aus diätetischen Lipiden absorbiert oder endogen synthetisiert (Del Prado et al., 2001). Die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Muttermilch wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen neben der mütterlichen Ernährung (Innis, 2007, Ballard and Morrow, 2013), auch der genetische Hintergrund (Xie and Innis, 2008) und der Laktationszeitpunkt (Moltó-Puigmartí et al., 2011). Außerdem wurde bereits in verschiedenen Studien die Auswirkung der Schwangerschaftsdauer diskutiert

(Bitman et al., 1983, Bokor et al., 2007) (Genzel-Boroviczény et al., 1997, Granot et al., 2016, Nilsson et al., 2018).

In Zusammenschau kann daher vermutet werden, dass Fettsäuren für das erhöhte Vorkommen von MDSC in der Muttermilch verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen hierzu sind in der Arbeitsgruppe geplant. Die variierenden Fettsäure-Konzentrationen in der MM könnten eine Erklärung für die veränderten MDSC-Zahlen in Abhängigkeit von Gestations- und postnatalem Alter sein.

Neben Fettsäuren enthält Muttermilch u. a. das immunmodulatorisch wirkende Lactoferrin. He et al. zeigten, dass die suppressiven Fähigkeiten von MDSC durch Lactoferrin in Abhängigkeit von PGE2 und S100A8/A9 getriggert werden (He et al., 2018). S100A9/A8-Proteine sind bereits aus anderen Arbeiten im Zusammenhang mit der Regulation der MDSC-Expansion bekannt (Cheng et al., 2008, Sinha et al., 2008, Heinemann et al., 2017). He et al. zeigten überdies, dass gestillte Neonaten höhere MDSC-Spiegel hatten als Formula-ernährte (ohne Lactoferrin) Neugeborene (He et al., 2018). Liu et al. zeigten weiter, dass die Anwesenheit von MDSC und ihre Funktionalität bei Neugeborenen mit dem Vorhandensein von Lactoferrin im Serum assoziiert war und dass *in-vitro* die Behandlung von Neugeborenen-Neutrophilen mit Lactoferrin zu einer Induktion suppressiver Eigenschaften über den LRP2-Rezeptor und den Transkriptionsfaktors NF- κ B führte (Liu et al., 2019). Eine Korrelation von Lactoferrin mit MDSC-Zahlen in der Muttermilch wurde in unserer Studie nicht durchgeführt und könnte Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Als methodische Limitation ist zu nennen, dass in Anlehnung an zuvor beschriebene Versuchsprotokolle zur Quantifizierung und Isolierung von MDSC in den Induktionsversuchen der myeloische Oberflächenmarker CD33 verwendet wurde (Lechner et al., 2010, Lechner et al., 2011, Rieber et al., 2013a). Die Verwendung von CD66b als Marker für GR-MDSC war in diesen Versuchen nicht möglich, da CD66b nach längerer Kultur von der Oberfläche „gshedded“ wird (Kostlin et al., 2017). Eine Unterscheidung zwischen GR-MDSC und MO-MDSC war daher nicht möglich (Kostlin et al., 2017).

5.2 Quantifikation von MM-MDSC in den ersten 35 Lebenstagen

Bereits Ebrahim et al. bezeichneten Muttermilch als immunkompetentes Nahrungsmittel, das durch seine reiche Nährstoffzusammensetzung eine wichtige Rolle für den immunologischen Schutz des Neugeborenen spielt (Ebrahim, 1995). Auch andere Arbeitsgruppen postulierten im Vorfeld diese immunmodulatorischen Fähigkeiten und den Transfer von Immunzellen über die Muttermilch (Hanson et al., 2003, Hassiotou et al., 2013b). Muttermilch enthält verschiedene immunologisch wirksame Substanzen wie Immunglobuline, Zytokine, Lactoferrin und Lysozym (Hassiotou et al., 2013a, Hassiotou et al., 2013b), Nitrate, L-Arginin, Präbiotika, PAF-A und Wachstumsfaktoren (VEGF und HGF) (Kaingade et al., 2016), sowie Stammzellen und Leukozyten.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein großer Prozentsatz aller Leukozyten in der Muttermilch reifer Neugeborener GR-MDSC sind (Kostlin et al., 2018). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass MM-MDSC Einfluss auf die intestinale Immunregulation des Neonaten haben.

Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass auch die Muttermilch Frühgeborener GR-MDSC enthält und dass deren Anteil an den Leukozyten mit steigendem Gestationsalter zunimmt (Köstlin-Gille et al., 2020). Dies steht im Kontrast zu vorangegangenen eigenen Arbeiten über GR-MDSC, in denen wir während der Schwangerschaft, sowie im Nabelschnurblut Frühgeborener keine durch das Gestationsalter bedingten Unterschiede feststellen konnten (Kostlin et al., 2014, Schwarz et al., 2018).

Andere Studien, welche Leukozyten-Subpopulationen in der Muttermilch Früh- und Reifgeborener quantifizierten, lieferten bezüglich einer Korrelation mit dem Gestationsalter inkonstante Ergebnisse. Rodriguez et al. beispielsweise untersuchten Kolostrum und konnten keinen signifikanten Unterschied in den Makrophagen-Konzentrationen bei Früh- und Reifgeborenen feststellen (Rodriguez et al., 1989), während Dawarkadas et al. und Jain et al. erhöhte Leukozytenkonzentrationen im Kolostrum Frühgeborener beschrieben (Dawarkadas et al., 1991, Jain et al., 1991). Goldmann et al. quantifizierten Leukozyten in der Muttermilch Früh- und Reifgeborener über die ersten 12

Lebenswochen hinweg und fanden initial verringerte Konzentrationen von Neutrophilen bei Frühgeborenen, die im Laufe der ersten 12 Lebenswochen über die Zellzahlen der Muttermilch Reifgeborener anstiegen (Goldman et al., 1982). Da in der vorliegenden Arbeit die prozentualen Anteile von GR-MDSC an der Gesamtleukozytenzahl und keine Konzentrationen untersucht wurden, kann an dieser Stelle kein direkter Vergleich zu den o.g. Arbeiten gezogen werden. Unseren Ergebnissen entsprechend, fanden Trend et al., dass die Gesamtleukozytenzahlen in der Muttermilch von Kindern unterschiedlicher Gestationsalter konstant blieben. Außerdem zeigten auch sie eine positive Korrelation zwischen granulozytären Zellen und dem Gestationsalter in Übergangsmilch (P8-12) (Trend et al., 2015). Maschmann et al. postulierten wie wir, dass neutrophile Zellen den größten Anteil der Leukozyten in der Muttermilch ausmachen, allerdings ohne Korrelation mit dem Gestationsalter (Maschmann et al., 2015).

Hinsichtlich der Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch ist folgende Limitation der Studie zu nennen: aufgrund hoher Zellverluste erfolgte die Quantifizierung von GR-MDSC ohne vorherige Dichtegradientenzentrifugation. Da GR-MDSC und reife Granulozyten nur anhand ihrer jeweiligen Dichte voneinander abgegrenzt werden können (Brandau et al., 2011) und es abgesehen davon derzeit noch keine spezifischen Marker zur Diskriminierung der beiden Leukozyten-Subtypen gibt (Gabrilovich, 2017), ist es möglich, dass ein Teil der hier als GR-MDSC bezeichneten Zellen reife Granulozyten sind. Wir verwendeten den granulozytären Marker CD66b zur Charakterisierung von MM-MDSC, wobei CD66b auch auf Neutrophilen exprimiert wird. In einer unserer vorangegangenen Studien (Kostlin et al., 2018) und mit vereinzelt Proben aus der hier präsentierten Studie, konnten wir jedoch zeigen, dass alle CD66b⁺-Zellen der Muttermilch in der Fraktion der mononukleären Zellen sedimentierten und dass CD66b⁺-Zellen aus der Muttermilch ausgeprägte T-Zell-suppressive Aktivität besaßen und sich damit funktionell eindeutig von reifen Granulozyten unterscheiden, so dass wir davon ausgehen, dass auch die in dieser Studie gemessenen CD66b⁺-Zellen GR-MDSC sind.

Es zeigten sich besonders niedrige Zahlen an GR-MDSC in der Muttermilch von Frühgeborenen <26+0 Schwangerschaftswochen, dem Patientenkollektiv mit dem höchsten Risiko für Infektionen und nekrotisierende Enterokolitis. Aufgrund der kleinen Studienpopulation und Unterschieden in der Behandlung (z. B. Antibiotikatherapie, Probiotikagabe), sowie Ernährung (z. B. MM-Pasteurisierung zur Vermeidung der Übertragung von Zytomegalieviren) der Säuglinge war es nicht möglich, die MM-MDSC-Zahlen mit neonatalen Komplikationen zu korrelieren. Um herauszufinden, ob hier ein Zusammenhang besteht, werden weitere, größere Studien notwendig sein. Neben dem Anteil von GR-MDSC an den Gesamt-Leukozyten bestimmten wir in der vorliegenden Arbeit auch die Expression von bereits beschriebenen Aktivierungsmarkern auf GR-MDSC, dem Chemokinrezeptor CXCR4 und den co-inhibitorischen Molekülen PD-L1 und PD-L2 (Köstlin-Gille et al., 2020). Hier zeigte sich, dass sich die Expression von keinem der untersuchten Aktivierungsmarker in Abhängigkeit vom Gestationsalter änderte, so dass wir annehmen, dass keine funktionellen Unterschiede bestehen.

Hinsichtlich des Verlaufs der GR-MDSC-Zahlen in der Muttermilch in den ersten Lebenswochen konnten wir zeigen, dass es mit zunehmendem Alter zu einem prozentualen Anstieg von GR-MDSC bei gleichbleibender Leukozytenzahl kam (Köstlin-Gille et al., 2020). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu eigenen Vorarbeiten zu GR-MDSC während der Schwangerschaft und im peripheren Blut Frühgeborener, die zeigten, dass es im peripheren Blut Schwangerer zu einer Akkumulation von GR-MDSC kommt, dass die GR-MDSC-Zahlen aber unmittelbar nach Entbindung auf das Niveau Nicht-Schwangerer abfallen (Kostlin et al., 2014). Entsprechend beschrieben Hassiotou et al., dass während im Kolostrum hohe Leukozytenzahlen nachweisbar waren, diese in der reifen Muttermilch deutlich abfielen (Hassiotou et al., 2013a). Bei Frühgeborenen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die GR-MDSC-Zahlen im peripheren Blut während der ersten 28 Lebensstage erhöht waren und dann auf das Niveau Erwachsener abfielen (Schwarz et al., 2018). Ähnlich den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zeigten Trend et al., dass es zu einem Anstieg der granulozytären Zellen in der Muttermilch während der ersten postnatalen

Lebenswochen kommt, wobei die Arbeitsgruppe vor allem eine Zunahme beim Wandel von Kolostrum zu reifer Milch feststellte (Trend et al., 2015). Die während der ersten Lebenswochen zunehmenden GR-MDSC-Zahlen in der Muttermilch könnten darauf hindeuten, dass GR-MDSC als immunmodulatorische Zellen spezifisch im Darm benötigt werden, um dort möglicherweise die Immunantwort im Rahmen der Etablierung des intestinalen Mikrobioms zu regulieren. Die Expression der Oberflächenmarker CXCR4 und PD-L2 auf MM-MDSC nahm mit steigendem postnatalem Alter ab (Köstlin-Gille et al., 2020). Dies könnte auf eine abnehmende funktionelle Aktivität hindeuten. Frühere Arbeiten unserer Forschungsgruppe bestätigen allerdings, dass auch MM-MDSC, die 6 Wochen nach Geburt isoliert wurden, noch starke hemmende Fähigkeiten besitzen (Köstlin et al., 2018).

Hinsichtlich mütterlicher Einflussfaktoren auf die MDSC-Zahlen in der Muttermilch zeigte sich, dass sowohl der Geburtsmodus als auch eine antepartale Steroidtherapie zur Lungenreifeinduktion keinen Einfluss auf den Anteil von MM-MDSC an den Muttermilch-Leukozyten hatte (Köstlin-Gille et al., 2020). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorherigen Arbeiten unserer Gruppe, die zeigten, dass im Nabelschnurblut von spontan geborenen Frühgeborenen deutlich höhere MDSC-Zahlen vorlagen als bei per Kaiserschnitt entbundenen Kindern (Schwarz et al., 2018). Von Glukokortikoiden ist bekannt, dass diese eine Neutrophilie auslösen können, indem sie die Reifung der Neutrophilen im Knochenmark und ihre Mobilisierung aus diesem anregen. Außerdem verringern sie die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe einzuwandern (Ronchetti et al., 2018) – beides Effekte, die die tendenziell niedrigeren MDSC-Zahlen in der Muttermilch von Müttern mit präpartaler Steroidtherapie erklären könnten.

Dagegen zeigten sich bei Frauen, die vorgeburtlich eine Tokolyse erhalten hatten, signifikant niedrigere GR-MDSC Zahlen in der Muttermilch als bei Müttern ohne Tokolyse (Köstlin-Gille et al., 2020). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es unter der Geburt zu einer Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder IL-8 kommt, die eine sogenannte „Notfall-Myelopoese“ auslösen und die mütterlichen Speicherpools für myeloische Vorläuferzellen im Knochenmark

entleeren (Cuenca et al., 2011), was dann zu einer verminderten Kapazität zur Nachbildung von MDSC für die Muttermilch führen könnte. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass vorzeitige Wehen mit einem Abfall des Sexualhormons Progesteron, welches wiederum MDSC induziert, einhergehen (Pan et al., 2016, Verma et al., 2019). Zur Behandlung von vorzeitiger Wehentätigkeit wurden die meisten Teilnehmerinnen unserer Studienkohorte intravenös mit Magnesiumsulfat therapiert. Mehta et al. zeigten, dass die intrapartale Gabe von wehenhemmendem Magnesiumsulfat die Chemotaxis und die Motilität von Neutrophilen bei Frühgeborenen verminderte (Mehta and Petrova, 2006). Auch dies könnte eine Ursache für die verminderte Rekrutierung von MDSC in die Muttermilch sein.

Generell muss hier erwähnt werden, dass aufgrund des deskriptiven Designs lediglich gemutmaßt werden kann, wie es zu den beobachteten Unterschieden in den prozentualen Anteilen von MM-MDSC zwischen den untersuchten Gruppen kommen könnte. Weitere mechanistische Studien sind nötig, um herauszufinden inwiefern die mütterliche Therapie Einfluss auf die GR-MDSC-Akkumulation und -Funktion in der Muttermilch ausübt.

Das Geschlecht des Neugeborenen ist ein wichtiger prognostischer Faktor im Falle einer Frühgeburt (Naeye et al., 1971, Stevenson et al., 2000): Männliche Frühgeborene sind anfälliger für postnatale Komplikationen wie das Atemnotsyndrom und haben ein schlechteres neurologisches Outcome als weibliche Frühgeborene (Galante et al., 2018). Die Ursache für diese Tendenz ist zwar unklar, es wird allerdings vermutet, dass u. a. frühkindliche Ernährungsreize eine Rolle spielen könnten (Galante et al., 2018). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich die Nährstoffzusammensetzung von Muttermilch in Abhängigkeit des Geschlechts des Kindes unterscheidet. So wurde beschrieben, dass in der Muttermilch weiblicher Neugeborener der Fettgehalt und in der Milch männlicher Neugeborener der Salzgehalt erhöht ist (Hosseini et al., 2020). Auch die Konzentrationen von Oligosacchariden (K et al., 2019) und freien Aminosäuren (Baldeón et al., 2019) unterscheiden sich geschlechtsspezifisch. Nach unserer Kenntnis gibt es bis dato keine Studien, die den Anteil von Immunzellen und/oder Immunmediatoren in der Muttermilch in

Abhängigkeit vom Geschlecht des Säuglings untersucht haben. In der durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass Mütter von weiblichen Neugeborenen signifikant mehr GR-MDSC in der Muttermilch hatten als Mütter männlicher Neonaten (Köstlin-Gille et al., 2020). Bis heute ist die funktionelle Rolle von MM-MDSC und deren Einfluss auf das langfristige Outcome der Kinder unzureichend verstanden. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass MM-MDSC *in vitro* in der Lage sind, die T-Zell-Proliferation zu hemmen und die TLR4-Expression auf Monozyten zu reduzieren (Kostlin et al., 2018). Wir vermuten, dass MM-MDSC die intestinale Immunreifung und die Etablierung des Mikrobioms positiv beeinflussen. Damit könnten die erhöhten MM-MDSC-Spiegel weiblicher Säuglinge mitverantwortlich für deren besseren klinischen Verlauf sein. Der für diese Unterschiede zugrundeliegende Mechanismus ist bisher unverstanden. Hassiotou et al. konnten zeigen, dass kindliche Entzündungsvorgänge (z.B. im Rahmen einer Infektion) die Leukozytenantwort in der Muttermilch stimulieren können (Riskin et al., 2012, Hassiotou et al., 2013b). Die Arbeitsgruppe diskutierte, dass es durch den Rückfluss von Muttermilch während des Stillvorganges zur mütterlichen Brust zu einem Rücktransport von kindlichem Speichel zusammen mit Mikroorganismen kommen könnte, wodurch dann eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst wird (Hassiotou et al., 2013b). An diese Hypothese anknüpfend, könnte man vermuten, dass auch weibliche Sexualhormone übertragen werden, die auf diese Weise GR-MDSC rekrutieren.

Zusammenfassend wird hier gezeigt, dass die Konzentrationen von GR-MDSC in der Muttermilch in Abhängigkeit vom Gestationsalter und der postnatalen Lebenswoche variieren und durch mütterliche und kindliche Faktoren beeinflusst werden. Weitere Studien werden notwendig sein, um die genaue Rolle von MM-MDSC für die Immunregulation während der Neugeborenenperiode zu verstehen. Möglicherweise könnte die gezielte Therapie mit MM-MDSC – insbesondere bei Frühgeborenen mit hohem Risiko für entzündliche Erkrankungen – eine Strategie zur Verbesserung des neonatalen Outcomes sein.

Ein limitierender Faktor der durchgeführten Longitudinalstudie war die geringe Fallzahl, so dass keine Korrelation mit klinischen Parametern möglich war. Eine weitere Limitation ist, dass nicht alle Proben sofort nach dem Abpumpen verarbeitet werden konnten. Längere Lagerungszeiten können prozentuale Anteile der MDSC-Population in der Milch verändern. Daher wurde für die Quantifizierung ein zeitliches Fenster von maximal 6 Stunden nach Abpumpen der Muttermilch festgelegt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die Zahlen von MDSC aus dem Blut über diesen Zeitraum stabil blieben (Kostlin et al., 2014). Außerdem wurden die Muttermilchproben zu verschiedenen Tageszeitpunkten entnommen, was ebenfalls Unterschiede in den Zellzahlen verursachen könnte. Um zu vermeiden, dass Zellzahl-Unterschiede durch Entnahme der Muttermilch aus unterschiedlichen Laktationsphasen bedingt sind, wurde darauf geachtet, dass zunächst die gesamte Milch abgepumpt und dann ein Teil davon für die durchflusszytometrische Analyse verwendet wurde. Zuletzt soll darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den Proben für diese Studie um organisches Material handelte und dass es dabei immer zu interindividuellen Unterschieden kommen kann. Diese Variabilität kann für Abweichungen bei der Auswertung der Ergebnisse sorgen.

5.3 *In-vivo*-Modell: MDSC aus der Muttermilch in der Systemzirkulation des Neugeborenen

Zuletzt konnten wir in einem Mausmodell zeigen, dass mütterliche MDSC während der gesamten Säugezeit in den Organen der Jungtiere nachweisbar waren. *In vitro* konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in einer vorangegangenen Arbeit zeigen, dass GR-MDSC nicht nur pH-Änderungen, sondern auch eine Inkubation mit Verdauungsenzymen überleben (Kostlin et al., 2018). Mithilfe der vorliegenden Studie konnten wir nun erstmals zeigen, dass sich mütterliche GR-MDSC systemisch im Kreislauf des Neugeborenen nachweisen lassen. In Blut und Milz war der prozentuale Anteil von mütterlichen MDSC an allen MDSC unmittelbar nach der Geburt am höchsten und sank dann auf ein konstantes

Niveau ab, während es in der Leber nach initialem Abfall zu einem erneuten Anstieg kam.

Für die Versuche verwendeten wir weibliche transgene Mäuse, welche bei hemizygotem Vorliegen der genetischen Veränderung GFP in neutrophilen Zellen (und damit auch in MDSC) exprimieren (hier GFP⁺-Mäuse, B6.Cg-Tg(S100A8-cre, -EGFP)1llw/J) und mit männlichen Wildtyp-Mäusen (hier GFP⁻-Mäuse, C57BL/6J) verpaart wurden. So war es möglich, die aus den neonatalen Organen quantifizierten GFP⁺-Zellen als von der Mutter stammende MDSC zu identifizieren. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten bereits fest, dass Leukozyten über die Muttermilch von der Mutter auf das Neugeborene transferiert werden (Jain et al., 1989). Weitere Studien ergaben, dass sich CD8⁺-T-Zellen aus der Muttermilch in den Peyer'schen Plaques des gestillten Neugeborenen wiederfinden und so die spezifische Immunantwort des Neonaten unterstützen könnten (Cabinian et al., 2016). Auch wurde der Transfer von mütterlichen Stammzellen in den neonatalen Organismus beschrieben (Hassiotou et al., 2013a, Hassiotou et al., 2014, Bode et al., 2014).

Neben der Muttermilch als Quelle für die in unserer Studie im kindlichen Organismus nachgewiesenen MDSC käme auch eine pränatale Übertragung über die Plazenta in Betracht. Zhou et al. konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass mütterliche Leukozyten sowohl während der Schwangerschaft diaplazentar als auch durch Fütterung post partum in den Organismus des Neonaten gelangen. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass diaplazentar übertragene Leukozyten überwiegend in den Thymus einwanderten, während sich Zellen aus der Muttermilch vor allem in der Leber wiederfanden (Zhou et al., 2000). Fetale Tiere wurden in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Während Zhou et al. beschrieben, dass ab P9 keine Muttermilch-Leukozyten mehr in der Leber nachweisbar waren, beobachteten wir sogar einen relativen Anstieg von Muttermilch-MDSC in der Leber von P7 bis P21. Dabei ist anzumerken, dass der prozentuale Anteil von MDSC an allen Leber-Leukozyten nach der Geburt kontinuierlich sinkt (eigene bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe), während der Anteil derer, die aus der Muttermilch stammen, zunimmt. Die Leber durchläuft während der ersten Lebenswochen eine Transformation von einem

blutbildenden Organ hin zu einem Organ der metabolischen Regulation und Immunsystemkontrolle. Es konnte in den letzten Jahren vielfach beschrieben werden, dass es wechselseitige Einflüsse zwischen Immunzellen in der Leber und im Darm, sowie dem intestinalen Mikrobiom gibt (Darm-Leber-Achse). Van Best et al. zeigten, dass insbesondere Gallensäuren, die in Hepatozyten produziert werden, potente Trigger des intestinalen Immunreifungsprozesses waren und postnatal wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmflora hatten (van Best et al., 2020). Welche Rolle MDSC aus der Muttermilch hier spielen, wird Inhalt weiterer Studien unserer Arbeitsgruppe sein.

5.4 Mögliche Bedeutung von GR-MDSC in der Muttermilch und Ausblick

Die Bedeutung von MDSC in der Muttermilch für das Neugeborene bleibt bisher unklar. Für systemische MDSC konnte gezeigt werden, dass niedrige MDSC-Zahlen bei Geburt für eine NEK prädestinieren (Liu et al., 2019). Bei adulten Mäusen zeigten Delano et al., dass es im Rahmen einer Sepsis zu einer Akkumulation von MDSC in der Milz kommt (Delano et al., 2007). Weitere Studien – ebenfalls an adulten Tieren – zeigten im Rahmen einer Sepsis protektive Effekte von MDSC auf den Krankheitsverlauf und das Outcome (Brudecki et al., 2012, Derive et al., 2012). Unsere Gruppe zeigte, dass es im Rahmen neonataler Infektionen ebenfalls zu einer erneuten Expansion von MDSC kommt. Daten aus Tiermodellen zur funktionellen Rolle von MDSC während einer Neugeborenen-Sepsis gibt es bisher nicht.

He et al. beschrieben eine Akkumulation von MDSC in neugeborenen Mäusen um P4 herum und assoziierten dies mit der Etablierung des intestinalen Mikrobioms. Die Arbeitsgruppe beschrieb, dass es im Rahmen einer experimentell induzierten NEK an P1 (an dem laut den Autoren weniger MDSC vorhanden waren) zu einer deutlich schwerwiegenderen Entzündungsreaktion kam als an P4 (wenn mehr MDSC vorhanden sind). Ein zusätzlicher Transfer von MDSC wirkte sich günstig auf den Verlauf der NEK aus. Außerdem zeigten He et al., dass MDSC potente antibakterielle Eigenschaften besitzen (He et al., 2018).

Liu et al. bestätigten diese Ergebnisse, indem auch sie einen positiven Effekt auf die Behandlung von NEK-erkrankten Versuchstieren durch Lactoferrin-induzierte MDSC zeigten.

Aufgrund dieser Daten und unserer eigenen Ergebnisse vermuten wir, dass der Transfer von MDSC über die Muttermilch das Neugeborene vor einer überschießenden Inflammationsreaktion im Rahmen der Etablierung des intestinalen Mikrobioms schützt.

Zukünftig könnten folgende Fragestellungen in diesem Zusammenhang untersucht werden:

- 1) Können additiv mit der Neugeborenen-Nahrung verabreichte MDSC eine Entzündungsreaktion des neonatalen Organismus eindämmen?
- 2) Bieten induzierte MDSC denselben Schutz für den kindlichen Organismus wie MM-MDSC?
- 3) Welche Mechanismen sind für den Schutz des Neonaten durch MM-MDSC verantwortlich?
- 4) Welche Langzeitfolgen entstehen durch eine postpartale Zellsubstitution für das Frühgeborene?

Möglicherweise könnte die Supplementierung von Säuglingsnahrung mit MDSC ein neuer Präventions- bzw. Therapieansatz für entzündliche Erkrankungen bei Frühgeborenen sein.

6 Zusammenfassung

Das neonatale Immunsystem steht nach der Geburt vor einer besonderen Herausforderung. Während der Fötus intrauterin durch das mütterliche Immunsystem weitestgehend geschützt ist, muss sich das Neugeborene nach der Geburt selbst vor möglichen Krankheitserregern schützen und gleichzeitig kommensale Keime des Mikrobioms tolerieren. Dies führt dazu, dass Neugeborene und insbesondere Frühgeborene besonders anfällig für Infektionen sind. Sowohl bei der Neugeborenen-Sepsis als auch bei der NEK konnte gezeigt werden, dass bei den Betroffenen vor der Erkrankung ein verändertes intestinales Mikrobiom bestand. Einer der wichtigsten Einflussfaktoren für das Mikrobiom, sowie für die intestinale Immunantwort – insbesondere beim Neugeborenen – ist die Ernährung. MDSC sind myeloide Zellen mit suppressiver Funktion, die in der Muttermilch in relevanten Mengen vorkommen.

Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es, die Rolle von MDSC aus der Muttermilch in Bezug auf die Immunantwort des Neugeborenen näher zu charakterisieren. Es sollte untersucht werden, ob Bestandteile der Muttermilch MDSC induzieren können. Weiter sollte analysiert werden, wie sich die MDSC-Zahlen in der Muttermilch Frühgeborener in Abhängigkeit von Gestations- und postnatalem Alter über die ersten 5 Lebenswochen hinweg verhalten und ob es Zusammenhänge zwischen mütterlichen oder kindlichen Parametern und MDSC-Zahlen in der Muttermilch gibt. Zuletzt sollte in einem Tiermodell untersucht werden, ob MDSC aus der Muttermilch in die Systemzirkulation neugeborener Mäuse gelangen können.

Hierfür wurden, neben einer klinischen Longitudinalstudie, verschiedene *in-vitro*-Ansätze und ein *in-vivo*-Modell etabliert und durchgeführt.

Unsere Untersuchungen ergaben, dass zellfreier Muttermilch-Überstand konzentrationsabhängig zu einer Induktion von MDSC aus PBMC führte und dass diese induzierten MDSC T-Zell-suppressive Eigenschaften besaßen. In einer Longitudinalstudie, bei der MM-MDSC über die ersten 5 Lebenswochen des

Neugeborenen hinweg quantifiziert wurden, zeigte sich, dass diese mit steigendem Gestationsalter und postnatalen Lebenswochen zunehmen. Überdies ließ sich ein Zusammenhang zwischen bestimmten Faktoren wie kindlichem Geschlecht und pränataler Tokolyse-Therapie und den MDSC-Zahlen in der Muttermilch herstellen. Zuletzt konnte anhand eines *in-vivo*-Modells erstmals gezeigt werden, dass MDSC die Darmpassage überstehen und in den Organismus des Neugeborenen aufgenommen werden.

Diese Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass MDSC aus der Muttermilch eine entscheidende Rolle für die Immunität des Neugeborenen während der ersten Lebenswochen spielen. Aufbauend auf den Ergebnissen könnten insbesondere bei Frühgeborenen neue präventive oder therapeutische Ansätze zur Behandlung von inflammatorischen Erkrankungen entwickelt werden.

7 Literaturverzeichnis

- ACCARDO, P. J. & HOON, A. H., JR. 2008. The challenge of cerebral palsy classification: the ELGAN study. *J Pediatr*, 153, 451-2.
- AL-KHAMI, A. A., RODRIGUEZ, P. C. & OCHOA, A. C. 2016. Metabolic reprogramming of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer. *Oncoimmunology*, 5, e1200771.
- AL-KHAMI, A. A., RODRIGUEZ, P. C. & OCHOA, A. C. 2017a. Energy metabolic pathways control the fate and function of myeloid immune cells. *J Leukoc Biol*, 102, 369-380.
- AL-KHAMI, A. A., ZHENG, L., DEL VALLE, L., HOSSAIN, F., WYCZECZOWSKA, D., ZABALETA, J., SANCHEZ, M. D., DEAN, M. J., RODRIGUEZ, P. C. & OCHOA, A. C. 2017b. Exogenous lipid uptake induces metabolic and functional reprogramming of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 6, e1344804.
- ALMAND, B., CLARK, J. I., NIKITINA, E., VAN BEYNEN, J., ENGLISH, N. R., KNIGHT, S. C., CARBONE, D. P. & GABRILOVICH, D. I. 2001. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*, 166, 678-89.
- ARENDE, M. 2008. Communicating human biomonitoring results to ensure policy coherence with public health recommendations: analysing breastmilk whilst protecting, promoting and supporting breastfeeding. *Environ Health*, 7 Suppl 1, S6.
- AZAD, M. B., KONYA, T., MAUGHAN, H., GUTTMAN, D. S., FIELD, C. J., SEARS, M. R., BECKER, A. B., SCOTT, J. A. & KOZYRSKY, A. L. 2013. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 9, 15.
- BACKHED, F., ROSWALL, J., PENG, Y., FENG, Q., JIA, H., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., LI, Y., XIA, Y., XIE, H., ZHONG, H., KHAN, M. T., ZHANG, J., LI, J., XIAO, L., AL-AAMA, J., ZHANG, D., LEE, Y. S., KOTOWSKA, D., COLDING, C., TREMAROLI, V., YIN, Y., BERGMAN, S., XU, X., MADSEN, L., KRISTIANSEN, K., DAHLGREN, J. & WANG, J. 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*, 17, 690-703.
- BALDEÓN, M. E., ZERTUCHE, F., FLORES, N. & FORNASINI, M. 2019. Free Amino Acid Content in Human Milk is Associated with Infant Gender and Weight Gain during the First Four Months of Lactation. *Nutrients*, 11.
- BALLARD, O. & MORROW, A. L. 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*, 60, 49-74.
- BFARM 2021. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). ICD-10-GM Version 2021. Kapitel XVI, Bestimmte Zustände, die ihren Ursprung in der Perinatalperiode haben (P00-P96). [Zugriff: 12.06.21]
- BITMAN, J., WOOD, L., HAMOSH, M., HAMOSH, P. & MEHTA, N. R. 1983. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Am J Clin Nutr*, 38, 300-12.

- BLACK, R. E., COUSENS, S., JOHNSON, H. L., LAWN, J. E., RUDAN, I., BASSANI, D. G., JHA, P., CAMPBELL, H., WALKER, C. F., CIBULSKIS, R., EISELE, T., LIU, L. & MATHERS, C. 2010. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, 375, 1969-87.
- BLEVE, A., DURANTE, B., SICA, A. & CONSONNI, F. M. 2020. Lipid Metabolism and Cancer Immunotherapy: Immunosuppressive Myeloid Cells at the Crossroad. *Int J Mol Sci*, 21.
- BODE, L., MCGUIRE, M., RODRIGUEZ, J. M., GEDDES, D. T., HASSIOTOU, F., HARTMANN, P. E. & MCGUIRE, M. K. 2014. It's alive: microbes and cells in human milk and their potential benefits to mother and infant. *Adv Nutr*, 5, 571-3.
- BOKOR, S., KOLETZKO, B. & DECSI, T. 2007. Systematic review of fatty acid composition of human milk from mothers of preterm compared to full-term infants. *Ann Nutr Metab*, 51, 550-6.
- BOROS, P., OCHANDO, J. & ZEHER, M. 2016. Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Hum Immunol*, 77, 631-636.
- BOSE, C., LAUGHON, M., ALLRED, E. N., VAN MARTER, L. J., O'SHEA, T. M., EHRENKRANZ, R. A., FICHOROVA, R. & LEVITON, A. 2011. Blood protein concentrations in the first two postnatal weeks that predict bronchopulmonary dysplasia among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatr Res*, 69, 347-53.
- BOYUM, A. 1977. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. *Lymphology*, 10, 71-6.
- BÖYUM, A. 1968a. 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*, 97, 77-89.
- BÖYUM, A. 1968b. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 7.
- BRANDAU, S., TRELAKIS, S., BRUDEREK, K., SCHMALTZ, D., STELLER, G., ELIAN, M., SUTTMANN, H., SCHENCK, M., WELLING, J., ZABEL, P. & LANG, S. 2011. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *J Leukoc Biol*, 89, 311-7.
- BRUDECKI, L., FERGUSON, D. A., MCCALL, C. E. & EL GAZZAR, M. 2012. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect Immun*, 80, 2026-34.
- CABINIAN, A., SINSIMER, D., TANG, M., ZUMBA, O., MEHTA, H., TOMA, A., SANT'ANGELO, D., LAOUAR, Y. & LAOUAR, A. 2016. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS One*, 11, e0156762.
- CARL, M. A., NDAO, I. M., SPRINGMAN, A. C., MANNING, S. D., JOHNSON, J. R., JOHNSTON, B. D., BURNHAM, C. A., WEINSTOCK, E. S., WEINSTOCK, G. M., WYLIE, T. N., MITREVA, M., ABUBUCKER, S., ZHOU, Y., STEVENS, H. J., HALL-MOORE, C., JULIAN, S., SHAIKH, N.,

- WARNER, B. B. & TARR, P. I. 2014. Sepsis from the gut: the enteric habitat of bacteria that cause late-onset neonatal bloodstream infections. *Clin Infect Dis*, 58, 1211-8.
- CAVDAR, G., PAPICH, T. & RYAN, E. P. 2019. Microbiome, Breastfeeding and Public Health Policy in the United States: The Case for Dietary Fiber. *Nutr Metab Insights*, 12, 1178638819869597.
- CHEN, M. F., KUAN, F. C., YEN, T. C., LU, M. S., LIN, P. Y., CHUNG, Y. H., CHEN, W. C. & LEE, K. D. 2014. IL-6-stimulated CD11b⁺ CD14⁺ HLA-DR⁻ myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget*, 5, 8716-28.
- CHENG, P., CORZO, C. A., LUETTEKE, N., YU, B., NAGARAJ, S., BUI, M. M., ORTIZ, M., NACKEN, W., SORG, C., VOGL, T., ROTH, J. & GABRILOVICH, D. I. 2008. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*, 205, 2235-49.
- CONDAMINE, T., DOMINGUEZ, G. A., YOUN, J. I., KOSSENKOV, A. V., MONY, S., ALICEA-TORRES, K., TCYGANOV, E., HASHIMOTO, A., NEFEDOVA, Y., LIN, C., PARTLOVA, S., GARFALL, A., VOGL, D. T., XU, X., KNIGHT, S. C., MALIETZIS, G., LEE, G. H., ERUSLANOV, E., ALBELDA, S. M., WANG, X., MEHTA, J. L., BEWTRA, M., RUSTGI, A., HOCKSTEIN, N., WITT, R., MASTERS, G., NAM, B., SMIRNOV, D., SEPULVEDA, M. A. & GABRILOVICH, D. I. 2016. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*, 1.
- CONDAMINE, T. & GABRILOVICH, D. I. 2011. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol*, 32, 19-25.
- CONDAMINE, T., MASTIO, J. & GABRILOVICH, D. I. 2015. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol*, 98, 913-22.
- CORPELEIJN, W. E., DE WAARD, M., CHRISTMANN, V., VAN GOUDOEVER, J. B., JANSEN-VAN DER WEIDE, M. C., KOOL, E. M., KOPER, J. F., KOUWENHOVEN, S. M., LAFEVER, H. N., MANK, E., VAN TOLEDO, L., VERMEULEN, M. J., VAN VLIET, I. & VAN ZOEREN-GROBBEN, D. 2016. Effect of Donor Milk on Severe Infections and Mortality in Very Low-Birth-Weight Infants: The Early Nutrition Study Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr*, 170, 654-61.
- COSTELLO, E. K., LAUBER, C. L., HAMADY, M., FIERER, N., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694-7.
- CROOK, K. R. & LIU, P. 2014. Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease. *World J Immunol*, 4, 26-33.
- CUBILLOS-RUIZ, J. R., SILBERMAN, P. C., RUTKOWSKI, M. R., CHOPRA, S., PERALES-PUCHALT, A., SONG, M., ZHANG, S., BETTIGOLE, S. E., GUPTA, D., HOLCOMB, K., ELLENSON, L. H., CAPUTO, T., LEE, A. H., CONEJO-GARCIA, J. R. & GLIMCHER, L. H. 2015. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell*, 161, 1527-38.

- CUENCA, A. G., DELANO, M. J., KELLY-SCUMPIA, K. M., MORENO, C., SCUMPIA, P. O., LAFACE, D. M., HEYWORTH, P. G., EFRON, P. A. & MOLDAWER, L. L. 2011. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med*, 17, 281-92.
- DAWARKADAS, A. M., SAHA, K. & MATHUR, N. B. 1991. A comparative study of cells and anti-microbial proteins in colostrum of mothers delivering pre- and full-term babies. *J Trop Pediatr*, 37, 214-9.
- DE SANTO, C., SALIO, M., MASRI, S. H., LEE, L. Y., DONG, T., SPEAK, A. O., PORUBSKY, S., BOOTH, S., VEERAPEN, N., BESRA, G. S., GRÖNE, H. J., PLATT, F. M., ZAMBON, M. & CERUNDOLO, V. 2008. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest*, 118, 4036-48.
- DEL PRADO, M., VILLALPANDO, S., ELIZONDO, A., RODRÍGUEZ, M., DEMMELMAIR, H. & KOLETZKO, B. 2001. Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. *Am J Clin Nutr*, 74, 242-7.
- DELANO, M. J., SCUMPIA, P. O., WEINSTEIN, J. S., COCO, D., NAGARAJ, S., KELLY-SCUMPIA, K. M., O'MALLEY, K. A., WYNN, J. L., ANTONENKO, S., AL-QURAN, S. Z., SWAN, R., CHUNG, C. S., ATKINSON, M. A., RAMPHAL, R., GABRILOVICH, D. I., REEVES, W. H., AYALA, A., PHILLIPS, J., LAFACE, D., HEYWORTH, P. G., CLARE-SALZLER, M. & MOLDAWER, L. L. 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*, 204, 1463-74.
- DERIVE, M., BOUAZZA, Y., ALAUZET, C. & GIBOT, S. 2012. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive Care Med*, 38, 1040-9.
- DOWLING, D. J. & LEVY, O. 2014. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol*, 35, 299-310.
- EBRAHIM, G. J. 1995. Breastmilk immunology. *J Trop Pediatr*, 41, 2-4.
- ELAHI, S., ERTELT, J. M., KINDER, J. M., JIANG, T. T., ZHANG, X., XIN, L., CHATURVEDI, V., STRONG, B. S., QUALLS, J. E., STEINBRECHER, K. A., KALFA, T. A., SHAABAN, A. F. & WAY, S. S. 2013. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*, 504, 158-62.
- FRANKLIN, R. A., LIAO, W., SARKAR, A., KIM, M. V., BIVONA, M. R., LIU, K., PAMER, E. G. & LI, M. O. 2014. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*, 344, 921-5.
- FRICK, J. S. & AUTENRIETH, I. B. 2013. The gut microflora and its variety of roles in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 358, 273-89.
- FULCHER, D. & WONG, S. 1999. Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol Cell Biol*, 77, 559-64.
- FULDE, M. & HORNEF, M. W. 2014. Maturation of the enteric mucosal innate immune system during the postnatal period. *Immunol Rev*, 260, 21-34.
- GABRILOVICH, D. I. 2017. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*, 5, 3-8.

- GABRILOVICH, D. I. & NAGARAJ, S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9, 162-74.
- GABRILOVICH, D. I., OSTRAND-ROSENBERG, S. & BRONTE, V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 12, 253-68.
- GALANTE, L., MILAN, A. M., REYNOLDS, C. M., CAMERON-SMITH, D., VICKERS, M. H. & PUNDIR, S. 2018. Sex-Specific Human Milk Composition: The Role of Infant Sex in Determining Early Life Nutrition. *Nutrients*, 10.
- GALINDO-SEVILLA, N., REYES-ARROYO, F. & MANCILLA-RAMIREZ, J. 2019. The role of complement in preterm birth and prematurity. *J Perinat Med*.
- GENZEL-BOROVICZÉNY, O., WAHLE, J. & KOLETZKO, B. 1997. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *Eur J Pediatr*, 156, 142-7.
- GOH, C., NARAYANAN, S. & HAHN, Y. S. 2013. Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunol Rev*, 255, 210-21.
- GOH, C. C., ROGGERSON, K. M., LEE, H. C., GOLDEN-MASON, L., ROSEN, H. R. & HAHN, Y. S. 2016. Hepatitis C Virus-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress NK Cell IFN- γ Production by Altering Cellular Metabolism via Arginase-1. *J Immunol*, 196, 2283-92.
- GOLDMAN, A. S., GARZA, C., NICHOLS, B., JOHNSON, C. A., SMITH, E. O. & GOLDBLUM, R. M. 1982. Effects of prematurity on the immunologic system in human milk. *J Pediatr*, 101, 901-5.
- GONIA, S., TUEPKER, M., HEISEL, T., AUTRAN, C., BODE, L. & GALE, C. A. 2015. Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells. *J Nutr*, 145, 1992-8.
- GOOD, M., SODHI, C. P. & HACKAM, D. J. 2014. Evidence-based feeding strategies before and after the development of necrotizing enterocolitis. *Expert Rev Clin Immunol*, 10, 875-84.
- GRANOT, E., ISHAY-GIGI, K., MALAACH, L. & FLIDEL-RIMON, O. 2016. Is there a difference in breast milk fatty acid composition of mothers of preterm and term infants? *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29, 832-5.
- GRETEN, T. F., MANNS, M. P. & KORANGY, F. 2011. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol*, 11, 802-7.
- HANSON, L. A., KOROTKOVA, M., LUNDIN, S., HÅVERSEN, L., SILFVERDAL, S. A., MATTSBY-BALTZER, I., STRANDVIK, B. & TELEMO, E. 2003. The transfer of immunity from mother to child. *Ann N Y Acad Sci*, 987, 199-206.
- HARRISON, M. S. & GOLDENBERG, R. L. 2016. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*, 21, 74-9.
- HARSCH, I. A. & KONTUREK, P. C. 2018. The Role of Gut Microbiota in Obesity and Type 2 and Type 1 Diabetes Mellitus: New Insights into "Old" Diseases. *Med Sci (Basel)*, 6.
- HASSIOTOU, F., GEDDES, D. T. & HARTMANN, P. E. 2013a. Cells in human milk: state of the science. *J Hum Lact*, 29, 171-82.

- HASSIOTOU, F., HEATH, B., OCAL, O., FILGUEIRA, L., GEDDES, D., HARTMANN, P. & WILKIE, T. 2014. Breastmilk stem cell transfer from mother to neonatal organs (216.4). *The FASEB Journal*, 28, 216.4.
- HASSIOTOU, F., HEPWORTH, A. R., METZGER, P., TAT LAI, C., TRENGOVE, N., HARTMANN, P. E. & FILGUEIRA, L. 2013b. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clin Transl Immunology*, 2, e3.
- HE, J., HUANG, M., WANG, D., ZHANG, Z. & LI, G. 2014. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review. *J Pharm Biomed Anal*, 101, 84-101.
- HE, Y. M., LI, X., PEREGO, M., NEFEDOVA, Y., KOSSENKOV, A. V., JENSEN, E. A., KAGAN, V., LIU, Y. F., FU, S. Y., YE, Q. J., ZHOU, Y. H., WEI, L., GABRILOVICH, D. I. & ZHOU, J. 2018. Transitory presence of myeloid-derived suppressor cells in neonates is critical for control of inflammation. *Nat Med*, 24, 224-231.
- HEIKKILA, M. P. & SARIS, P. E. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol*, 95, 471-8.
- HEINEMANN, A. S., PIRR, S., FEHLHABER, B., MELLINGER, L., BURGMANN, J., BUSSE, M., GINZEL, M., FRIESENHAGEN, J., VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M., ULAS, T., VON KAISENBERG, C. S., ROTH, J., VOGL, T. & VIEMANN, D. 2017. In neonates S100A8/S100A9 alarmins prevent the expansion of a specific inflammatory monocyte population promoting septic shock. *Faseb j*, 31, 1153-1164.
- HOFSTÄDTER, K. 2016. Myeloide Suppressorzellen an der humanen fetomaternalen Grenzschicht und ihre Bedeutung für die immunologische Toleranz zwischen Mutter und Fetus. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen*.
- HOLLISTER, E. B., RIEHLE, K., LUNA, R. A., WEIDLER, E. M., RUBIO-GONZALES, M., MISTRETTA, T. A., RAZA, S., DODDAPANENI, H. V., METCALF, G. A., MUZNY, D. M., GIBBS, R. A., PETROSINO, J. F., SHULMAN, R. J. & VERSALOVIC, J. 2015. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, 3, 36.
- HOSSAIN, F., AL-KHAMI, A. A., WYCZECZOWSKA, D., HERNANDEZ, C., ZHENG, L., REISS, K., VALLE, L. D., TRILLO-TINOCO, J., MAJ, T., ZOU, W., RODRIGUEZ, P. C. & OCHOA, A. C. 2015. Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res*, 3, 1236-47.
- HOSSEINI, M., VALIZADEH, E., HOSSEINI, N., KHATIBSHAHIDI, S. & RAEISI, S. 2020. The Role of Infant Sex on Human Milk Composition. *Breastfeed Med*, 15, 341-346.
- HUANG, S. C., EVERTS, B., IVANOVA, Y., O'SULLIVAN, D., NASCIMENTO, M., SMITH, A. M., BEATTY, W., LOVE-GREGORY, L., LAM, W. Y., O'NEILL, C. M., YAN, C., DU, H., ABUMRAD, N. A., URBAN, J. F., JR., ARTYOMOV, M. N., PEARCE, E. L. & PEARCE, E. J. 2014. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol*, 15, 846-55.

- INNIS, S. M. 2007. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc*, 66, 397-404.
- JAIN, L., VIDYASAGAR, D., XANTHOU, M., GHAI, V., SHIMADA, S. & BLEND, M. 1989. In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. *Arch Dis Child*, 64, 930-3.
- JAIN, N., MATHUR, N. B., SHARMA, V. K. & DWARKADAS, A. M. 1991. Cellular composition including lymphocyte subsets in preterm and full term human colostrum and milk. *Acta Paediatr Scand*, 80, 395-9.
- K, M. T., M, B. D. M., AC, F. V. A., MIRANDA, A. & T, B. M. 2019. Maternal and Infant Factors Associated with Human Milk Oligosaccharides Concentrations According to Secretor and Lewis Phenotypes. *Nutrients*, 11.
- KAINGADE, P. M., SOMASUNDARAM, I., NIKAM, A. B., SARANG, S. A. & PATEL, J. S. 2016. Assessment of Growth Factors Secreted by Human Breastmilk Mesenchymal Stem Cells. *Breastfeed Med*, 11, 26-31.
- KOEHN, B. H. & BLAZAR, B. R. 2017. Role of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Leukoc Biol*, 102, 335-341.
- KOENIG, J. E., SPOR, A., SCALFONE, N., FRICKER, A. D., STOMBAUGH, J., KNIGHT, R., ANGENENT, L. T. & LEY, R. E. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4578-85.
- KONG, X., SUN, R., CHEN, Y., WEI, H. & TIAN, Z. 2014. $\gamma\delta$ T cells drive myeloid-derived suppressor cell-mediated CD8⁺ T cell exhaustion in hepatitis B virus-induced immunotolerance. *J Immunol*, 193, 1645-53.
- KORPELA, K., BLAKSTAD, E. W., MOLTU, S. J., STROMMEN, K., NAKSTAD, B., RONNESTAD, A. E., BRAEKKE, K., IVERSEN, P. O., DREVON, C. A. & DE VOS, W. 2018. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep*, 8, 2453.
- KOSTLIN-GILLE, N., DIETZ, S., SCHWARZ, J., SPRING, B., PAULUSCHKE-FROHLICH, J., POETS, C. F. & GILLE, C. 2019. HIF-1 α -Deficiency in Myeloid Cells Leads to a Disturbed Accumulation of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) During Pregnancy and to an Increased Abortion Rate in Mice. *Front Immunol*, 10, 161.
- KÖSTLIN-GILLE, N., FLAIG, L. A., GINZEL, M., ARAND, J., POETS, C. F. & GILLE, C. 2020. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Milk (BM-MDSC) Correlate with Gestational Age and Postnatal Age and Are Influenced by Infant's Sex. *Nutrients*, 12.
- KOSTLIN, N., HOFSTADTER, K., OSTERMEIR, A. L., SPRING, B., LEIBER, A., HAEN, S., ABELE, H., BAUER, P., POLLHEIMER, J., HARTL, D., POETS, C. F. & GILLE, C. 2016. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype. *J Immunol*, 196, 1132-45.
- KOSTLIN, N., KUGEL, H., SPRING, B., LEIBER, A., MARME, A., HENES, M., RIEBER, N., HARTL, D., POETS, C. F. & GILLE, C. 2014. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur J Immunol*, 44, 2582-91.

- KOSTLIN, N., OSTERMEIR, A. L., SPRING, B., SCHWARZ, J., MARME, A., WALTER, C. B., POETS, C. F. & GILLE, C. 2017. HLA-G promotes myeloid-derived suppressor cell accumulation and suppressive activity during human pregnancy through engagement of the receptor ILT4. *Eur J Immunol*, 47, 374-384.
- KOSTLIN, N., SCHOETENSACK, C., SCHWARZ, J., SPRING, B., MARME, A., GOELZ, R., BRODBECK, G., POETS, C. F. & GILLE, C. 2018. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells (GR-MDSC) in Breast Milk (BM); GR-MDSC Accumulate in Human BM and Modulate T-Cell and Monocyte Function. *Front Immunol*, 9, 1098.
- KUGEL, H. 2018. Untersuchungen zur Expression von Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) in der humanen Schwangerschaft und ihre Bedeutung für die materno-fetale Toleranz. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen*.
- LECHNER, M. G., LIEBERTZ, D. J. & EPSTEIN, A. L. 2010. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*, 185, 2273-84.
- LECHNER, M. G., MEGIEL, C., RUSSELL, S. M., BINGHAM, B., ARGER, N., WOO, T. & EPSTEIN, A. L. 2011. Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med*, 9, 90.
- LEVY, O. 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*, 7, 379-90.
- LI, M., ZHU, D., WANG, T., XIA, X., TIAN, J. & WANG, S. 2018. Roles of Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations in Autoimmune Arthritis. *Front Immunol*, 9, 2849.
- LIN, A. E., AUTRAN, C. A., SZYSZKA, A., ESCAJADILLO, T., HUANG, M., GODULA, K., PRUDDEN, A. R., BOONS, G. J., LEWIS, A. L., DORAN, K. S., NIZET, V. & BODE, L. 2017. Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B Streptococcus. *J Biol Chem*, 292, 11243-11249.
- LIU, Y., PEREGO, M., XIAO, Q., HE, Y., FU, S., HE, J., LIU, W., LI, X., TANG, Y., LI, X., YUAN, W., ZHOU, W., WU, F., JIA, C., CUI, Q., WORTHEN, G. S., JENSEN, E. A., GABRILOVICH, D. I. & ZHOU, J. 2019. Lactoferrin-induced myeloid-derived suppressor cell therapy attenuates pathologic inflammatory conditions in newborn mice. *J Clin Invest*, 129, 4261-4275.
- LYONS, A. B. 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*, 243, 147-54.
- LYONS, A. B. & PARISH, C. R. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 171, 131-7.
- MANDRUZZATO, S., SOLITO, S., FALISI, E., FRANCESCATO, S., CHIARION-SILENI, V., MOCELLIN, S., ZANON, A., ROSSI, C. R., NITTI, D., BRONTE, V. & ZANOVELLO, P. 2009. IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol*, 182, 6562-8.
- MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. & BALKWILL, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-44.

- MARTIN, R., MAKINO, H., CETINYUREK YAVUZ, A., BEN-AMOR, K., ROELOFS, M., ISHIKAWA, E., KUBOTA, H., SWINKELS, S., SAKAI, T., OISHI, K., KUSHIRO, A. & KNOL, J. 2016. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One*, 11, e0158498.
- MASCHMANN, J., GOELZ, R., WITZEL, S., STRITTMATTER, U., STEINMASSL, M., JAHN, G. & HAMPRECHT, K. 2015. Characterization of human breast milk leukocytes and their potential role in cytomegalovirus transmission to newborns. *Neonatology*, 107, 213-9.
- MASI, A. C. & STEWART, C. J. 2019. The role of the preterm intestinal microbiome in sepsis and necrotising enterocolitis. *Early Hum Dev*, 104854.
- MAYNARD, C. L., ELSON, C. O., HATTON, R. D. & WEAVER, C. T. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489, 231-41.
- MEHTA, R. & PETROVA, A. 2006. Intrapartum magnesium sulfate exposure attenuates neutrophil function in preterm neonates. *Biol Neonate*, 89, 99-103.
- MIRA, J. C., BRAKENRIDGE, S. C., MOLDAWER, L. L. & MOORE, F. A. 2017. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Crit Care Clin*, 33, 245-258.
- MOLES, J. P., TUAILLON, E., KANKASA, C., BEDIN, A. S., NAGOT, N., MARCHANT, A., MCDERMID, J. M. & VAN DE PERRE, P. 2018. Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr Allergy Immunol*, 29, 133-143.
- MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C., CASTELLOTE, A. I., CARBONELL-ESTRANY, X. & LÓPEZ-SABATER, M. C. 2011. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin Nutr*, 30, 116-23.
- NAEYE, R. L., BURT, L. S., WRIGHT, D. L., BLANC, W. A. & TATTER, D. 1971. Neonatal mortality, the male disadvantage. *Pediatrics*, 48, 902-6.
- NAGARAJ, S., YOUN, J. I. & GABRILOVICH, D. I. 2013. Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells. *J Immunol*, 191, 17-23.
- NILSSON, A. K., LÖFQVIST, C., NAJM, S., HELLGREN, G., SÄVMAN, K., ANDERSSON, M. X., SMITH, L. E. H. & HELLSTRÖM, A. 2018. Long-chain polyunsaturated fatty acids decline rapidly in milk from mothers delivering extremely preterm indicating the need for supplementation. *Acta Paediatr*, 107, 1020-1027.
- NINO, D. F., SODHI, C. P. & HACKAM, D. J. 2016. Necrotizing enterocolitis: new insights into pathogenesis and mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13, 590-600.
- O'CONNOR, M. A., RASTAD, J. L. & GREEN, W. R. 2017. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Viral Infection. *Viral Immunol*, 30, 82-97.
- OCHOA, A. C., ZEA, A. H., HERNANDEZ, C. & RODRIGUEZ, P. C. 2007. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13, 721s-726s.

- OKWAN-DUODU, D., UMPIERREZ, G. E., BRAWLEY, O. W. & DIAZ, R. 2013. Obesity-driven inflammation and cancer risk: role of myeloid derived suppressor cells and alternately activated macrophages. *Am J Cancer Res*, 3, 21-33.
- OSTRAND-ROSENBERG, S. 2018. Myeloid derived-suppressor cells: their role in cancer and obesity. *Curr Opin Immunol*, 51, 68-75.
- PALLETT, L. J., GILL, U. S., QUAGLIA, A., SINCLAIR, L. V., JOVER-COBOS, M., SCHURICH, A., SINGH, K. P., THOMAS, N., DAS, A., CHEN, A., FUSAI, G., BERTOLETTI, A., CANTRELL, D. A., KENNEDY, P. T., DAVIES, N. A., HANIFFA, M. & MAINI, M. K. 2015. Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat Med*, 21, 591-600.
- PAN, T., LIU, Y., ZHONG, L. M., SHI, M. H., DUAN, X. B., WU, K., YANG, Q., LIU, C., WEI, J. Y., MA, X. R., SHI, K., ZHANG, H. & ZHOU, J. 2016. Myeloid-derived suppressor cells are essential for maintaining fetomaternal immunotolerance via STAT3 signaling in mice. *J Leukoc Biol*, 100, 499-511.
- PATEL, A. L., MUTLU, E. A., SUN, Y., KOENIG, L., GREEN, S., JAKUBOWICZ, A., MRYAN, J., ENGEN, P., FOGG, L., CHEN, A. L., POMBAR, X., MEIER, P. P. & KESHAVARZIAN, A. 2016. Longitudinal Survey of Microbiota in Hospitalized Preterm Very-Low-Birth-Weight Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62, 292-303.
- PATEL, R. M. 2016. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol*, 33, 318-28.
- PATEL, R. M. & DENNING, P. W. 2015. Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*, 78, 232-8.
- PENDERS, J., THIJS, C., VINK, C., STELMA, F. F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P. A. & STOBBERINGH, E. E. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118, 511-21.
- QU, P., WANG, L. Z. & LIN, P. C. 2016. Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Cancer Lett*, 380, 253-6.
- QUIGLEY, M., EMBLETON, N. D. & MCGUIRE, W. 2019. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 7, CD002971.
- RIEBER, N., BRAND, A., HECTOR, A., GRAEPLER-MAINKA, U., OST, M., SCHÄFER, I., WECKER, I., NERI, D., WIRTH, A., MAYS, L., ZUNDEL, S., FUCHS, J., HANDGRETINGER, R., STERN, M., HOGARDT, M., DÖRING, G., RIETHMÜLLER, J., KORMANN, M. & HARTL, D. 2013a. Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *J Immunol*, 190, 1276-84.
- RIEBER, N., GILLE, C., KOSTLIN, N., SCHAFER, I., SPRING, B., OST, M., SPIELES, H., KUGEL, H. A., PFEIFFER, M., HEININGER, V., ALKHALED, M., HECTOR, A., MAYS, L., KORMANN, M., ZUNDEL, S., FUCHS, J., HANDGRETINGER, R., POETS, C. F. & HARTL, D. 2013b.

- Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clin Exp Immunol*, 174, 45-52.
- RINGEL-KULKA, T., CHENG, J., RINGEL, Y., SALOJARVI, J., CARROLL, I., PALVA, A., DE VOS, W. M. & SATOKARI, R. 2013. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. *PLoS One*, 8, e64315.
- RISKIN, A., ALMOG, M., PERI, R., HALASZ, K., SRUGO, I. & KESSEL, A. 2012. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*, 71, 220-5.
- ROCHA, G., PROENCA, E., QUINTAS, C., RODRIGUES, T. & GUIMARAES, H. 2006. [Chorioamnionitis and neonatal morbidity]. *Acta Med Port*, 19, 207-12.
- RODRIGUEZ, C., SUBIZA, J. L., MATEOS, P., CASADO DE FRIAS, E., MORO, M. & DE LA CONCHA, E. G. 1989. Comparative functional study of colostrum macrophages from mothers delivering preterm and at term. *Acta Paediatr Scand*, 78, 337-41.
- RODRIGUEZ, P. C., ERNSTOFF, M. S., HERNANDEZ, C., ATKINS, M., ZABALETA, J., SIERRA, R. & OCHOA, A. C. 2009. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*, 69, 1553-60.
- RONCHETTI, S., RICCI, E., MIGLIORATI, G., GENTILI, M. & RICCARDI, C. 2018. How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. *Int J Mol Sci*, 19.
- SCHANLER, R. J., LAU, C., HURST, N. M. & SMITH, E. O. 2005. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics*, 116, 400-6.
- SCHECKENBACH, V. 2017. Granulozytäre Myeloide Suppressorzellen bei Neugeborenen. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen*.
- SCHWARZ, J. 2020. Erhöhte Expression von Bcl-2 führt zu verlängertem Überleben von myeloiden Suppressorzellen nach Phagozytose von Escherichia coli. *Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen*.
- SCHWARZ, J., SCHECKENBACH, V., KUGEL, H., SPRING, B., PAGEL, J., HARTEL, C., PAULUSCHKE-FROHLICH, J., PETER, A., POETS, C. F., GILLE, C. & KOSTLIN, N. 2018. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period. *Clin Exp Immunol*, 191, 328-337.
- SHAW, A. G., SIM, K., RANDELL, P., COX, M. J., MCCLURE, Z. E., LI, M. S., DONALDSON, H., LANGFORD, P. R., COOKSON, W. O., MOFFATT, M. F. & KROLL, J. S. 2015. Late-Onset Bloodstream Infection and Perturbed Maturation of the Gastrointestinal Microbiota in Premature Infants. *PLoS One*, 10, e0132923.
- SHULHAN, J., DICKEN, B., HARTLING, L. & LARSEN, B. M. 2017. Current Knowledge of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants and the Impact of Different Types of Enteral Nutrition Products. *Adv Nutr*, 8, 80-91.
- SICA, A., GUARNERI, V. & GENNARI, A. 2019. Myelopoiesis, metabolism and therapy: a crucial crossroads in cancer progression. *Cell Stress*, 3, 284-294.

- SIGGERS, R. H., SIGGERS, J., THYMAN, T., BOYE, M. & SANGILD, P. T. 2011. Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *J Nutr Biochem*, 22, 511-21.
- SINHA, P., CLEMENTS, V. K., FULTON, A. M. & OSTRAND-ROSENBERG, S. 2007. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 67, 4507-13.
- SINHA, P., OKORO, C., FOELL, D., FREEZE, H. H., OSTRAND-ROSENBERG, S. & SRIKRISHNA, G. 2008. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 181, 4666-75.
- SOLITO, S., MARIGO, I., PINTON, L., DAMUZZO, V., MANDRUZZATO, S. & BRONTE, V. 2014. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*, 1319, 47-65.
- STEVENSON, D. K., VERTER, J., FANAROFF, A. A., OH, W., EHRENKRANZ, R. A., SHANKARAN, S., DONOVAN, E. F., WRIGHT, L. L., LEMONS, J. A., TYSON, J. E., KORONES, S. B., BAUER, C. R., STOLL, B. J. & PAPILE, L. A. 2000. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 83, F182-5.
- STICHTENOTH, G., DEMMERT, M., BOHNHORST, B., STEIN, A., EHLERS, S., HEITMANN, F., RIEGER-FACKELDEY, E., OLBERTZ, D., ROLL, C., EMEIS, M., MOGEL, M., SCHIFFMANN, H., WIEG, C., WINTGENS, J., HERTING, E., GOPEL, W. & HARTEL, C. 2012. Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klin Padiatr*, 224, 276-81.
- STOLL, B. J., HANSEN, N., FANAROFF, A. A., WRIGHT, L. L., CARLO, W. A., EHRENKRANZ, R. A., LEMONS, J. A., DONOVAN, E. F., STARK, A. R., TYSON, J. E., OH, W., BAUER, C. R., KORONES, S. B., SHANKARAN, S., LAPTOOK, A. R., STEVENSON, D. K., PAPILE, L. A. & POOLE, W. K. 2004a. To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. *Pediatrics*, 113, 1181-6.
- STOLL, B. J., HANSEN, N. I., ADAMS-CHAPMAN, I., FANAROFF, A. A., HINTZ, S. R., VOHR, B. & HIGGINS, R. D. 2004b. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *Jama*, 292, 2357-65.
- STOLL, B. J., HANSEN, N. I., BELL, E. F., WALSH, M. C., CARLO, W. A., SHANKARAN, S., LAPTOOK, A. R., SANCHEZ, P. J., VAN MEURS, K. P., WYCKOFF, M., DAS, A., HALE, E. C., BALL, M. B., NEWMAN, N. S., SCHIBLER, K., POINDEXTER, B. B., KENNEDY, K. A., COTTEN, C. M., WATTERBERG, K. L., D'ANGIO, C. T., DEMAURO, S. B., TRUOG, W. E., DEVASKAR, U. & HIGGINS, R. D. 2015. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Jama*, 314, 1039-51.
- TAFT, D. H., AMBALAVANAN, N., SCHIBLER, K. R., YU, Z., NEWBURG, D. S., DESHMUKH, H., WARD, D. V. & MORROW, A. L. 2015. Center Variation in Intestinal Microbiota Prior to Late-Onset Sepsis in Preterm Infants. *PLoS One*, 10, e0130604.

- TALMADGE, J. E. & GABRILOVICH, D. I. 2013. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*, 13, 739-52.
- TREND, S., DE JONG, E., LLOYD, M. L., KOK, C. H., RICHMOND, P., DOHERTY, D. A., SIMMER, K., KAKULAS, F., STRUNK, T. & CURRIE, A. 2015. Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLoS One*, 10, e0135580.
- TURBITT, W. J., COLLINS, S. D., MENG, H. & ROGERS, C. J. 2019. Increased Adiposity Enhances the Accumulation of MDSCs in the Tumor Microenvironment and Adipose Tissue of Pancreatic Tumor-Bearing Mice and in Immune Organs of Tumor-Free Hosts. *Nutrients*, 11.
- VALENTI, R., HUBER, V., IERO, M., FILIPAZZI, P., PARMIANI, G. & RIVOLTINI, L. 2007. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res*, 67, 2912-5.
- VAN BEST, N., ROLLE-KAMPCZYK, U., SCHAAP, F. G., BASIC, M., OLDE DAMINK, S. W. M., BLEICH, A., SAVELKOUL, P. H. M., VON BERGEN, M., PENDERS, J. & HORNEF, M. W. 2020. Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation. *Nat Commun*, 11, 3692.
- VATS, D., MUKUNDAN, L., ODEGAARD, J. I., ZHANG, L., SMITH, K. L., MOREL, C. R., WAGNER, R. A., GREAVES, D. R., MURRAY, P. J. & CHAWLA, A. 2006. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*, 4, 13-24.
- VEGLIA, F., TYURIN, V. A., BLASI, M., DE LEO, A., KOSSENKOV, A. V., DONTIREDDY, L., TO, T. K. J., SCHUG, Z., BASU, S., WANG, F., RICCIOTTI, E., DIRUSSO, C., MURPHY, M. E., VONDERHEIDE, R. H., LIEBERMAN, P. M., MULLIGAN, C., NAM, B., HOCKSTEIN, N., MASTERS, G., GUARINO, M., LIN, C., NEFEDOVA, Y., BLACK, P., KAGAN, V. E. & GABRILOVICH, D. I. 2019. Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature*, 569, 73-78.
- VERMA, P., VERMA, R., NAIR, R. R., BUDHWAR, S., KHANNA, A., AGRAWAL, N. R., SINHA, R., BIRENDRA, R., RAJENDER, S. & SINGH, K. 2019. Altered crosstalk of estradiol and progesterone with Myeloid-derived suppressor cells and Th1/Th2 cytokines in early miscarriage is associated with early breakdown of maternal-fetal tolerance. *Am J Reprod Immunol*, 81, e13081.
- VOLLBRECHT, T., STIRNER, R., TUFMAN, A., ROIDER, J., HUBER, R. M., BOGNER, J. R., LECHNER, A., BOURQUIN, C. & DRAENERT, R. 2012. Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *Aids*, 26, F31-7.
- WALDRON, T. J., QUATROMONI, J. G., KARAKASHEVA, T. A., SINGHAL, S. & RUSTGI, A. K. 2013. Myeloid derived suppressor cells: Targets for therapy. *Oncoimmunology*, 2, e24117.
- WARNING, J. C., MCCRACKEN, S. A. & MORRIS, J. M. 2011. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction*, 141, 715-24.
- WU, R. Y., LI, B., KOIKE, Y., MAATTANEN, P., MIYAKE, H., CADETE, M., JOHNSON-HENRY, K. C., BOTTS, S. R., LEE, C., ABRAHAMSSON, T. R., LANDBERG, E., PIERRO, A. & SHERMAN, P. M. 2019. Human Milk

- Oligosaccharides Increase Mucin Expression in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Mol Nutr Food Res*, 63, e1800658.
- WU, T., ZHAO, Y. & ZHAO, Y. 2014a. The roles of myeloid-derived suppressor cells in transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*, 10, 1385-94.
- WU, W. C., SUN, H. W., CHEN, H. T., LIANG, J., YU, X. J., WU, C., WANG, Z. & ZHENG, L. 2014b. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells are myeloid-biased in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4221-6.
- XIE, L. & INNIS, S. M. 2008. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J Nutr*, 138, 2222-8.
- YATSUNENKO, T., REY, F. E., MANARY, M. J., TREHAN, I., DOMINGUEZ-BELLO, M. G., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., BALDASSANO, R. N., ANOKHIN, A. P., HEATH, A. C., WARNER, B., REEDER, J., KUCZYNSKI, J., CAPORASO, J. G., LOZUPONE, C. A., LAUBER, C., CLEMENTE, J. C., KNIGHTS, D., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222-7.
- YOUN, J. I., NAGARAJ, S., COLLAZO, M. & GABRILOVICH, D. I. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 181, 5791-802.
- YOUNG, M. R., NEWBY, M. & WEPSIC, H. T. 1987. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*, 47, 100-5.
- ZE, A. H., RODRIGUEZ, P. C., ATKINS, M. B., HERNANDEZ, C., SIGNORETTI, S., ZABALETA, J., MCDERMOTT, D., QUICENO, D., YOUMANS, A., O'NEILL, A., MIER, J. & OCHOA, A. C. 2005. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*, 65, 3044-8.
- ZHANG, H., GUAN, S., YANG, K., YE, J., YAN, K., PAN, Y., WU, Y., WANG, A. & SUN, B. 2015. [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*, 31, 1387-90, 1395.
- ZHANG, L., ZHANG, Z., ZHANG, H., WU, M. & WANG, Y. 2014. Myeloid-derived suppressor cells protect mouse models from autoimmune arthritis via controlling inflammatory response. *Inflammation*, 37, 670-7.
- ZHANG, W., LI, J., QI, G., TU, G., YANG, C. & XU, M. 2018. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J Transl Med*, 16, 19.
- ZHOU, L., YOSHIMURA, Y., HUANG, Y., SUZUKI, R., YOKOYAMA, M., OKABE, M. & SHIMAMURA, M. 2000. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology*, 101, 570-80.
- ZHU, J., HUANG, X. & YANG, Y. 2012. Myeloid-derived suppressor cells regulate natural killer cell response to adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol*, 86, 13689-96.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MDSC-Induktion durch Muttermilch-Überstand	21
Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Induktion von MDSC aus PBMC durch Muttermilch.....	22
Abbildung 3: Durch Muttermilch induzierte MDSC hemmen die T-Zell-Proliferation	23
Abbildung 4: Vergleich der MDSC-induzierenden Wirkung von unbehandeltem Überstand mit denaturiertem und gekochtem Überstand	24
Abbildung 5: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener in Abhängigkeit vom Gestationsalter	28
Abbildung 6: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch von Frühgeborenen in Abhängigkeit vom postnatalen Alter.....	31
Abbildung 7: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener (mütterliche Charakteristika).....	32
Abbildung 8: Quantifizierung von GR-MDSC in der Muttermilch Frühgeborener (kindliche Charakteristika)	33
Abbildung 9: GFP-Verpaarungsmodell der Maus	34
Abbildung 10: Anteil der GFP ⁺ -Zellen in Blut, Milz, Leber und Lunge der Jungtiere abhängig vom postnatalen Alter	38

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neugeborenen-Klassifikation nach Geburtsgewicht	1
Tabelle 2: Neugeborenen-Klassifikation nach Gestationsalter	1
Tabelle 3: Kindliche Charakteristika der Studienpopulation	8
Tabelle 4: Mütterliche Charakteristika der Studienpopulation	8
Tabelle 5: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse	17
Tabelle 6: Durchflusszytometrische Antikörperfärbung der Zellsuspensionen .	19

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde unter der Betreuung von Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille an der *Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung IV – Neonatologie* durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Natascha Köstlin-Gille (Doktormutter und Betreuerin).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille und Frau Dr. rer. nat. Bärbel Spring von mir eigenständig durchgeführt. Die Tierversuche wurden gemeinsam mit Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte gemeinsam mit Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille.

Ich versichere, das Manuskript selbständig unter Anleitung von Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Das Manuskript wurde von Frau Dr. med. Natascha Köstlin-Gille korrigiert.

Tübingen, den _____

Dr. med. Natascha Köstlin-Gille
(Doktormutter, habil. Betreuerin)

Lara Antonia Flaig
(Doktorandin)

11 Veröffentlichungen

Publizierte Artikel:

Köstlin-Gille, N., Flaig, L. A., Ginzel, M., Arand, J., Poets, C. F., Gille, Ch. 2020. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Milk (BM-MDSC) Correlate with Gestational Age and Postnatal Age and Are Influenced by Infant's Sex. *Nutrients*, 12.

Publizierte Abstracts:

Flaig, L. A., Dietz, S., Schwarz, J., Schoetensack, C., Spring, B., Gille, Ch., Poets, C. F., Köstlin-Gille, N. 2019. Von der Mutter zum Kind – die Rolle von myeloiden Suppressorzellen aus der Muttermilch für die Immunantwort Neugeborener. Forschungskolloquium 2019, Tübingen. (URL: https://www.medicin.uni-tuebingen.de/files/download/L6vOxqk92J43gQZ0EGnY5Nbo/Broschüre_Druckversion_2_schm.pdf) [Zugriff: 12.06.21].

Publizierte Poster:

Flaig, L. A., Schwarz, J., Dietz, S., Spring, B., Gille, Ch., Poets, C. F., Köstlin-Gille, N. 2019. Myeloide Suppressorzellen in der Muttermilch Frühgeborener. Forschungskolloquium 2019, Tübingen.

Flaig, L. A., Köstlin-Gille, N., Poets, C. F., Gille, Ch. 2020. Quantifizierung von MDSC in der Muttermilch von Frühgeborenen. GNPI, 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Mannheim.

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt und mir bei der Fertigstellung meiner Promotion geholfen haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt zunächst meiner Doktormutter Frau Dr. Natascha Köstlin-Gille, die mir das Thema meiner Promotion ermöglicht hat. Auch die hervorragende Betreuung, der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher, sowie persönlicher Ebene waren mir eine große Hilfe und haben mich stets motiviert.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Poets für die Annahme als Doktorandin.

Dem IZKF Promotionskolleg danke ich für die Aufnahme in das Förderungsprogramm, das Seminarangebot und die Möglichkeit zum regelmäßigen Austausch mit anderen Stipendiaten.

Ebenso möchte ich mich herzlich für die große Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bei allen Mitarbeitern des Neolabors bedanken. Insbesondere Bärbel Spring, Stefanie Dietz und Marco Ginzler gilt mein herzlicher Dank für die Einarbeitung ins Labor, die tatkräftige Mitarbeit an gemeinsamen Projekten und die mir entgegengebrachte Geduld. Weiterhin möchte ich mich bei dem Team des Immunzytologie-Labors und der Hautklinik für die Nutzung des FACS bedanken.

Ferner danke ich den Mitarbeitern der neonatologischen Intensiv- und Überwachungsstationen I, II und III, die mich bei der Sammlung von Muttermilch- und Stuhlproben unterstützt haben und immer Verständnis für die ein oder andere Unterbrechung des Stationsalltags hatten.

Den Eltern aller in die Studie eingeschlossenen Neugeborenen möchte ich für das große Interesse, die Teilnahme an der Longitudinalstudie und die zuverlässige Bereitstellung von Muttermilch meinen Dank aussprechen. Ohne die tatkräftige Mitarbeit wäre eine derartige Datenerhebung nicht möglich gewesen.

Auch meine Freunde tragen einen beträchtlichen Teil zu dieser Arbeit bei. Ich danke euch herzlichst für eure hilfreichen Anregungen, die fachlichen Diskussionen, das immer offene Ohr, den Zuspruch und das Korrekturlesen.

Der größte Dank ist meinen Eltern gewidmet, die mich jederzeit und in jeglicher Hinsicht unterstützen und mir dieses Studium nicht nur ermöglicht, sondern mich stets ermutigt und motiviert haben und mir während der Studien- und Promotionszeit mit viel Verständnis und Optimismus begegnet sind.