

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

**Hypoxie und HIF-1alpha in mononukleären Zellen  
und Monozyten als Einflussfaktoren für die  
Anfälligkeit einer neonatalen Sepsis**

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

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

**vorgelegt von  
Busch, Christiane geb. Schlegel**

**2026**

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Gille

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Köppen

Tag der Disputation: 21.05.2026

*Meiner Familie*

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>10</b>
5.1	Die neonatale Sepsis .....	10
5.2	Das neonatale Immunsystem.....	10
5.3	Hypoxie-induzierbarer-Faktor - 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) .....	11
5.4	Mononukleäre Zellen.....	14
5.5	Monozyten.....	14
5.6	Ziel der Arbeit.....	16
5.7	Konzeption der Versuche .....	18
<b>6</b>	<b>Material.....</b>	<b>19</b>
6.1	Patientenproben und Ethikvotum .....	19
6.2	Materialien biologischen Ursprungs .....	19
6.3	Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme.....	20
6.4	Verbrauchsmaterialien .....	24
6.5	Kulturmedien und Puffer .....	26
6.6	Antikörper.....	29
6.6.1	FACS Antikörper (human).....	29
6.6.2	MACS Beads.....	30
6.6.3	Western Blot Antikörper .....	30
6.7	Primer.....	31
6.8	Gase .....	32
6.9	Geräte .....	32
6.10	Software .....	35
<b>7</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>37</b>
7.1	Gewinnung mononukleärer Zellen .....	37

---

7.2	Bestimmung der Zellzahl.....	38
7.3	Anlage der Zellkulturen in Normoxie und Anoxie .....	38
7.4	Arbeiten mit Bakterien .....	39
7.5	Durchflusszytometrie.....	40
7.5.1	Magnetische Zellsortierung (MACS).....	41
7.5.2	Phänotyp-Färbung .....	42
7.5.3	Intrazellulär-Färbung.....	43
7.5.4	Effektor-Enzym-Färbung.....	43
7.6	Arbeiten mit Proteinen.....	44
7.6.1	Gewinnung der Proteinproben.....	44
7.6.2	Ermittlung der Proteinmenge mittels Bicinchoninsäure (BCA-Test).....	44
7.6.3	Western Blot.....	45
7.6.4	VEGF ELISA .....	49
7.7	Arbeiten mit DNA/RNA.....	50
7.7.1	Probengewinnung .....	50
7.7.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA.....	51
7.7.3	Primer Testung .....	52
7.7.4	Quantitative Real-Time PCR.....	53
7.7.5	Auswertung .....	53
7.8	Statistische Methoden .....	54
<b>8</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
8.1	Versuche mit Mononukleären Zellen.....	56
8.1.1	HIF-1 $\alpha$ -Protein akkumulierte unter Anoxie geringer in CBMC als in PBMC.....	56
8.1.2	HIF-1 $\alpha$ -Protein akkumulierte unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion weniger in CBMC als in PBMC .....	58
8.1.3	Die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression blieb in CBMC und in PBMC unter Anoxie unverändert....	58
8.1.4	Die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression war unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion in CBMC nicht erhöht im Gegensatz zu PBMC .....	59
8.1.5	Die PHDII-Proteinmenge war unter Anoxie sowie unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion in CBMC und in PBMC unverändert .....	60
8.1.6	PHDII-Genexpression war unter Anoxie höher als in Normoxie in CBMC wie in PBMC.....	61
8.1.7	In CBMC kam es unter Infektion mit <i>E.coli</i> zu einer geringeren Zunahme nicht-klassischer Monozyten verglichen mit PBMC.....	62
8.1.8	Funktionelle Auswirkungen von Anoxie und Infektion mit <i>E.coli</i> in CBMC und PBMC .....	65
8.1.9	Erhöhte VEGF-Produktion unter Anoxie in CBMC und PBMC, nicht jedoch unter Infektion mit <i>E.coli</i> .....	74
8.2	Versuche mit isolierten CD14+ Monozyten .....	75
8.2.1	HIF-1 $\alpha$ -Protein akkumulierte unter Anoxie, nicht unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion in CD14+ Monozyten, stärker in adulten als in neonatalen CD14+ Monozyten .....	76
8.2.2	PHDII-Proteinmenge war in CD14+ Monozyten kaum verändert durch Anoxie und Infektion mit <i>E.coli</i> .....	77
8.2.3	Funktionelle Auswirkungen von Anoxie und Infektion mit <i>E.coli</i> in CB und PB isolierten CD14+ Monozyten.....	78

---

8.2.4	Keine erhöhte VEGF-Produktion von CD14+ Monozyten unter Anoxie in CB und PB .....	83
<b>9</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
9.1	Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse .....	84
9.2	CBMC akkumulierten kaum HIF-1 $\alpha$ Protein unter Anoxie bei unverändertem HIF-1 $\alpha$ mRNA-Level.....	85
9.3	CBMC akkumulierten nicht vermehrt HIF-1 $\alpha$ unter <i>E.coli</i> -Infektion .....	87
9.4	PHDII-Proteinmengen blieben bei erhöhter Genexpression in Anoxie unverändert in CBMC wie in PBMC .....	89
9.5	Veränderte Monozyten-Subpopulationen unter Infektion mit <i>E.coli</i> führten zu einem proinflammatorischeren Setting in CBMC.....	90
9.6	CBMC regulierten unter Infektion mit <i>E.coli</i> CD80/CD86 weniger hoch als PBMC.....	92
9.7	CBMC regulierten unter Infektion mit <i>E.coli</i> PD-L2 nicht in gleichem Maße hoch wie PBMC, PD-L1 wurde nur minimal erhöht unter Infektion mit <i>E.coli</i> ...	95
9.8	Die Produktion von Interleukin-1 $\beta$ , -6 und -8 war in CBMC und PBMC vergleichbar.....	97
9.9	CBMC regulierten unter Infektion mit <i>E.coli</i> IDO nicht hoch .....	98
9.10	VEGF war in CBMC unter Anoxie nicht signifikant erhöht, unter Infektion mit <i>E.coli</i> weder in CBMC noch in PBMC .....	100
9.11	Schwierigkeiten der Standardisierung von Hypoxie/Anoxie .....	102
9.12	Limitationen der Ergebnisse .....	105
9.13	Schlussfolgerung und Ausblick .....	107
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>12</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>122</b>
<b>13</b>	<b>Veröffentlichung.....</b>	<b>123</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>124</b>

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Konzeption der Versuche .....	18
Abbildung 2	Isolation mononukleärer Zellen via Dichtegradientenzentrifugation nach Arne Bøyum .....	37
Abbildung 3	Beispielhafte Gating-Strategie auf CD80 für CD14-tragende Zellen .....	41
Abbildung 4	Pipettierschema zur Proteinmengenbestimmung mittels ELISA .....	45
Abbildung 5	Vorbereitung der Blotting-Halterung .....	47
Abbildung 6	HIF-1 $\alpha$ -Schmelzkurve einer Probe nach erfolgreicher quantitativer PCR .....	54
Abbildung 7	HIF-1 $\alpha$ -Menge in neonatalen mononukleären Zellen in Anoxie signifikant geringer als in adulten mononukleären Zellen .....	57
Abbildung 8	HIF-1 $\alpha$ -Menge nahm in neonatalen mononukleären Zellen unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion nicht zu im Gegensatz zu adulten mononukleären Zellen .....	58
Abbildung 9	Relative HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge nahm nach 22-stündiger Anoxie sowohl in neonatalen als auch in adulten mononukleären Zellen nicht zu .....	59
Abbildung 10	Relative HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge nahm unter Infektion mit <i>E.coli</i> in adulten mononukleären Zellen zu, kaum jedoch in neonatalen .....	60
Abbildung 11	PHDII-Proteinmenge veränderte sich in mononukleären Zellen unter Anoxie und unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion weder in CBMC noch in PBMC .....	61
Abbildung 12	Relative EGLN1-mRNA-Menge nahm unter Anoxie in adulten und neonatalen mononukleären Zellen zu .....	62
Abbildung 13	Gating-Strategie der Monozyten-Subpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16 .....	63
Abbildung 14	Prozentuale Anteile der drei Monozyten-Subpopulationen unter Normoxie und Anoxie sowie mit und ohne Infektion mit <i>E.coli</i> .....	64
Abbildung 15	MFI CD80 auf CBMC unter <i>E.coli</i> -Infektion geringer als auf PBMC .....	66
Abbildung 16	MFI CD86 auf CBMC in Normoxie und in Normoxie mit <i>E.coli</i> geringer als auf PBMC .....	67
Abbildung 17	MFI PD-L1 auf CBMC und PBMC vergleichbar .....	68
Abbildung 18	MFI PD-L2 auf CBMC geringer als auf PBMC .....	69
Abbildung 19	Vergleichbar hohe Interleukin-1 $\beta$ -Akkumulation in CBMC und PBMC unter Infektion mit <i>E.coli</i> .....	71
Abbildung 20	Vergleichbar hohe Interleukin-6-Akkumulation in CBMC und PBMC unter Infektion mit <i>E.coli</i> .....	72

---

Abbildung 21	Vergleichbar hohe Interleukin-8-Akkumulation in CBMC und PBMC unter Infektion mit <i>E.coli</i> .....	73
Abbildung 22	IDO unter Infektion mit <i>E.coli</i> in CBMC signifikant geringer exprimiert als in PBMC.....	74
Abbildung 23	VEGF-Akkumulation unter Anoxie verstärkt, nicht aber unter Infektion mit <i>E.coli</i> .....	75
Abbildung 24	HIF-1 $\alpha$ -Proteinmengen tendenziell geringer in neonatalen isolierten CD14+ Monozyten als in adulten, ohne Signifikanz, in Normoxie, Anoxie und Normoxie mit <i>E.coli</i> .....	76
Abbildung 25	PHDII-Proteinmenge veränderte sich auch in isolierten CD14+ Monozyten unter Anoxie und unter Normoxie mit <i>E.coli</i> -Infektion weder in CB noch in PB signifikant.....	77
Abbildung 26	MFI CD80 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB.....	79
Abbildung 27	MFI CD86 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB.....	80
Abbildung 28	MFI PD-L1 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB.....	81
Abbildung 29	MFI PD-L2 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB.....	82
Abbildung 30	VEGF-Akkumulation war unter Anoxie bei isolierten neonatalen und adulten CD14+ Monozyten nicht mehr verstärkt, auch nicht mit <i>E.coli</i> -Infektion.....	83

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Materialien biologischen Ursprungs.....	19
Tabelle 2	Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme .....	20
Tabelle 3	Materialien des allgemeinen Laborbedarfs .....	24
Tabelle 4	Kulturmedien und Puffer .....	26
Tabelle 5	FACS-Antikörper PE.....	29
Tabelle 6	FACS Antikörper PerCP .....	29
Tabelle 7	FACS Antikörper APC .....	30
Tabelle 8	MACS-MicroBeads .....	30
Tabelle 9	Western Blot Antikörper.....	30
Tabelle 10	qPCR Primer-Paare.....	31
Tabelle 11	Gase .....	32
Tabelle 12	Geräte .....	32
Tabelle 13	Mess- und Auswerte- Software .....	35
Tabelle 14	Statistik zu den Monozyten-Subpopulationen aus Abbildung 14 .....	64

## 4 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APC	Allophycocyanin
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> (=HIF-1 $\beta$ )
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CBMC	<i>Cord blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Antigene zur Differenzierung)
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CrP	C-reaktives Protein
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i> (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGLN1	<i>Egl nine homolog 1</i> (PHDII-Gen)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	<i>et alia</i> (lat.) (und andere)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Fetales Rinderserum)
FIH	<i>Factor Inhibiting HIF</i> (eine Asparaginy-Hydroxylase)

---

FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia inducible factor 1 alpha</i> (Hypoxie induzierbarer Faktor 1 alpha)
HPLC-H <sub>2</sub> O	<i>High performance liquid chromatography water</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRE	<i>Hypoxia-response element</i> (Hypoxiesensibler Bereich)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
LB	<i>Lennox-L-Broth Medium</i> (Nährmedium für Bakterienkultur)
LMIC	<i>low and middle income countries</i> (Länder mit niedrigem und mittlerem Einkommen)
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (magnetische Zellseparierung)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion, Verhältnis der Bakterienzahl zur Zielzellzahl)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i> (Zellkern-Faktor kappa B)
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	<i>No template control</i> (Kontroll-Probe ohne Template-DNA)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	<i>Optical density</i> (Optische Dichte)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (Erwachsener))
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)

---

PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A protein
PHD	Prolylhydroxylase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q RT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	<i>Rounds per minute</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (ein Kulturmedium)
SDS-Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20-fach konzentriert
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TTP	Tristetraprolin
Tween®	Polysorbat 20 bzw. Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TZR	T-Zell-Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VLBW	<i>Very Low Birth Weight Infants</i> (Frühgeborene mit sehr niedrigem Geburtsgewicht <1500g)

## 5 Einleitung

### 5.1 Die neonatale Sepsis

Nach wie vor ist die neonatale Sepsis ein Hauptgrund für neonatale Morbidität und Mortalität vorwiegend in *low and middle income countries* (LMIC)<sup>[1]</sup>, aber auch in Ländern der westlichen Welt<sup>[2, 3]</sup>. Besonders betroffen sind Frühgeborene (Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche), hierbei korreliert unter anderem das Gestationsalter und Geburtsgewicht umgekehrt proportional mit der Inzidenz neonataler Infektionen<sup>[3]</sup>. Eine uneinheitliche Definition der neonatalen Sepsis und ihrer Schweregrade erschwert die Zusammenfassung von Studienergebnissen und Therapieansätzen<sup>[4]</sup>.

Die Folgen der mit einer Sepsis einhergehenden Inflammation können verschiedene Organsysteme beeinträchtigen und Langzeitschäden hinterlassen<sup>[5-7]</sup>, im schlimmsten Falle auch tödlich enden<sup>[1, 8]</sup>.

Man unterscheidet zwischen einer Sepsis, die intrauterin erworben wurde und bis zu 72 Stunden nach Geburt beginnt, Early-Onset Sepsis (EOS), und einer erst nach der Geburt erworbenen Sepsis, der Late-Onset Sepsis (LOS), die meist mit Beginn nach dem 3. Lebenstag definiert wird. Häufigster Erreger der LOS sind Gruppe B Streptokokken (GBS) während EOS am häufigsten durch *Escherichia coli* (*E.coli*) hervorgerufen wird<sup>[3]</sup>. Während Gruppe B Streptokokken etwas häufiger in den Blutkulturen von Reifgeborenen nachgewiesen werden konnten, fanden sich Infektionen mit *E.coli* häufiger bei Frühgeborenen, besonders bei *Very Low Birth Weight Infants* (VLBW), und führten zudem zu längeren Krankenhausaufenthalten und höheren Mortalitätsraten<sup>[9-11]</sup>.

### 5.2 Das neonatale Immunsystem

Das Immunsystem des Fetus intrauterin bzw. von Frühgeborenen ist, anders als später im adulten Zustand, weniger in der Lage proinflammatorische Signale auszusenden (Zytokin-Produktion, T-Zell-Aktivierung etc.) und wirkt in Richtung einer Immunsuppression, was teilweise als „unreif“ bezeichnet wurde<sup>[12-14]</sup>. Die weitgehende Suppression der proinflammatorischen Immunantwort dient während der

Schwangerschaft der Gewährleistung der feto-maternalen Toleranz<sup>[15]</sup>, das heißt zur Prävention der Abstoßung des semiallogenen Organismus<sup>[16]</sup>. Postnatal in der Neugeborenenperiode wird die Kolonisation mit Kommensalen, die die Mikrobiom-Entwicklung unterstützt, durch die Suppression einer proinflammatorischen Antwort ermöglicht. Die immense Flut an Pathogenen und fremden Antigenen in den ersten Lebenstagen stellt das neonatale Immunsystem vor besondere Herausforderungen, was die Notwendigkeit einer andersartigen Immunantwort als beim Erwachsenen begründet. Dennoch ist das neonatale Immunsystem in der Lage auf entsprechende Stimuli mit einer proinflammatorischen Antwort zu reagieren<sup>[17]</sup>, zum Teil überschießend oder anhaltend, was die erheblichen Folgeschäden neonataler Infektionen mitbegründet<sup>[18-20]</sup>.

Die Erregerabwehr, die intrauterin nachrangig ist, da der mütterliche Organismus diese Aufgabe weitestgehend übernimmt, wird jedoch unmittelbar unter und nach der Geburt von Bedeutung, obwohl die Kolonisation ebenfalls in diese Phase fällt. Welche Mechanismen hierbei zu einer „Umprogrammierung“ der Immunreaktion beitragen, ist bislang ungeklärt. Ein möglicher Trigger stellt der plötzliche Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Blut dar, der intrauterin dauerhaft zwischen geschätzten 26-28 mmHg pO<sub>2</sub> im linken und 20-22 mmHg pO<sub>2</sub> im rechten Ventrikel liegt<sup>[21]</sup>, mit dem ersten eigenen Atemzug des Kindes dann rasch auf Werte von 70-80 mmHg pO<sub>2</sub> innerhalb der ersten 10 Lebensminuten ansteigt<sup>[22]</sup>.

### 5.3 Hypoxie-induzierbarer-Faktor - 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ )

Die Wahrnehmung („*sensing*“) des Sauerstoffangebots ist ein elementarer Prozess auf zellulärer Ebene. Eines der wichtigsten Systeme des „*oxygen sensings*“ ist der Transkriptionsfaktor „*hypoxia inducible factor*“ (HIF, Hypoxie-induzierbarer Faktor). Seine alpha- wie beta-Untereinheit wird auf niedrigem Niveau konstitutiv exprimiert<sup>[23]</sup>, wobei heute bekannt ist, dass sowohl die Transkription der beta-Untereinheit<sup>[24]</sup> als auch der alpha-Untereinheit sauerstoffabhängig variieren<sup>[25]</sup>.

In Normoxie wird die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit durch eisenabhängig sauerstoffsensible Prolylhydroxylasen (PHDs) an den Prolylresten Pro402 und Pro564<sup>[26, 27]</sup> hydroxyliert. Von-Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein (pVHL) ubiquitiniert das Protein daraufhin, was zum Abbau der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit im Proteasom führt<sup>[26, 28]</sup>. Somit

kann HIF-1 $\alpha$  nicht mit der  $\beta$ -Untereinheit dimerisieren und wird damit nicht funktionsfähig. In Hypoxie werden die sauerstoffsensiblen Prolylhydroxylasen inaktiv und die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit nicht mehr abgebaut. Reicht das Sauerstoffangebot einer Zelle ihren Anforderungen nicht aus, tritt also Hypoxie ein, kann die alpha-Untereinheit von HIF, die Helix-Loop-Helix Untereinheit eines Proteins, mit der  $\beta$ -Untereinheit heterodimerisieren<sup>[29]</sup> und mit weiteren modulierenden Co-Faktoren wie p300/CBP<sup>[30]</sup> als wichtiger Transkriptionsfaktor in allen Säugetierzellen<sup>[31]</sup> im Zellkern an Genen Einfluss nehmen, die im Promoter das „*Hypoxia-response element*“ (HRE) besitzen<sup>[32]</sup>.

Eine andere sauerstoffkonzentrationsabhängige Regulation erfolgt über das sogenannte „*Factor inhibiting HIF*“ (FIH), eine Asparaginy-Hydroxylase. Diese hydroxyliert HIF-1 $\alpha$  am Asparaginyrest Asn803 und unterbindet damit die Bindung von p300, einem Cofaktor des HIF-Transkriptionsfaktors, sodass die Transkriptionsaktivität beeinflusst wird<sup>[27, 33]</sup>.

Zudem gibt es weitere nicht sauerstoffkonzentrationsabhängige Regulationsmechanismen<sup>[34]</sup>. Unter Wachstumshormonen wird HIF-1 $\alpha$  stabilisiert<sup>[35]</sup>, unter geringer Glucose-Konzentration<sup>[36]</sup> sowie erhöhtem Lactat-/Pyruvat-Spiegel wird HIF-1 $\alpha$  in der Zelle akkumuliert<sup>[37]</sup>.

Die HIF-1 $\beta$  -Untereinheit (auch bekannt als *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT)) wird in gewissen Tumorzelllinien ebenfalls sauerstoffabhängig exprimiert und kann noch mit anderen als mit der alpha-Untereinheit dimerisieren.<sup>[24]</sup> Es ist zudem zu erwähnen, dass noch zwei weitere HIF-alpha-Untereinheiten bekannt sind, HIF-2 $\alpha$ , die der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit sehr ähnelt, sowie die am wenigsten bekannte und stärker differente HIF-3 $\alpha$ -Untereinheit<sup>[34]</sup>.

Als Transkriptionsfaktor hat der *Hypoxia-inducible factor* (HIF) eine zentrale Rolle in der Steuerung des Metabolismus, der Funktion und des Überlebens der Zelle, weshalb HIF über mehrere Wege gesteuert wird<sup>[34]</sup>. Wie wichtig HIF als Regulator in der Zelle ist, wird mitunter darin deutlich, dass die Untereinheiten von HIF quasi konstitutiv auch in Normoxie in geringem Maße exprimiert werden<sup>[23, 25]</sup>, die Zelle also einen hohen Energieaufwand in Kauf nimmt, obwohl in normoxischen Verhältnissen die  $\alpha$ -Untereinheit sofort wieder abgebaut wird, die Zelle aber so umgehend auf HIF-initiiierende Stimuli reagieren kann.

Zu den mannigfaltigen direkten und indirekten Zielgenen von HIF (schon 2005 über 100 bekannte direkte Zielgene<sup>[38]</sup>) gehören bislang bekanntermaßen Gene, die auf Hypoxie, physiologisch ausgelöst durch beispielsweise Anämie, reduzierte Sauerstoffkonzentration in der Höhe, Entwicklung, Wundheilung oder pathologisch durch Tumorwachstum<sup>[27]</sup>, reagieren, indem sie je nach Zellart unterschiedliche Anpassungen einleiten. Das sind unter anderem Gene, die die oxidative Phosphorylierung der Zellatmung in den Mitochondrien hemmen und die anaerobe Glykolyse im Zytoplasma fördern, zugleich für einen vermehrten Transport der anfallenden sauren Valenzen aus der Zelle sorgen, Erythropoietin zur Produktion von Erythrozyten produzieren oder *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) initiieren, um verbesserte Oxygenierungsverhältnisse durch vermehrte Vaskularisierung zu erreichen<sup>[31, 39]</sup>. Auch HIF-1 $\alpha$  selbst hat im Promoter ein HRE<sup>[40]</sup>, wird aber auch durch andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst wie beispielsweise NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*), der mit p50 und p65 im HIF-1 $\alpha$ -Promoter bindet<sup>[25]</sup> und die Transkription von HIF-1 $\alpha$  in Hypoxie (Hypoxie aktiviert über den PI3K-Signalweg NF- $\kappa$ B innerhalb von 30 Minuten<sup>[25]</sup>) und Inflammation fördert<sup>[41]</sup>, wohingegen HIF-1 $\alpha$  die NF- $\kappa$ B-Aktivität einschränken kann<sup>[42]</sup>.

Die Regulation von HIF scheint zellspezifisch zu differieren, so akkumulierten Zellen einer humanen Endothelzelllinie (HMEC-1) nach 3 Stunden am meisten HIF-1 $\alpha$ -Protein auf Hypoxie (1,5% O<sub>2</sub>) wohingegen die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Level zunächst gleichblieben und ab etwa 3 Stunden bis 24 Stunden anhaltender Hypoxie abnahmen<sup>[43]</sup>. Ratten-Retinazellen exprimierten ab 30 Minuten bis 3 Stunden Hypoxie (6-7% O<sub>2</sub>) zunehmend HIF-1 $\alpha$ -Protein ohne Änderung des HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Gehalts<sup>[44]</sup>. Glatte Muskelzellen der Pulmonalarterien im Hypoxie-Mausexperiment (10% O<sub>2</sub>) erhöhten jedoch nach 30 Minuten ihre HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Level, maximal dann nach 1 Stunde und waren nach 4 Stunden wieder auf Ausgangsniveau – HIF-1 $\alpha$  Protein war nach 30 Minuten erhöht und blieb es für bis zu 8 Stunden<sup>[25]</sup>. In Zellkultur konnte keine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge durch Hypoxie nachgewiesen werden<sup>[25]</sup>. Andere Zellen der Lunge erhöhten die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge nach 48 Stunden (1% O<sub>2</sub>, pulmonalarterielle Endothelzellen) oder gar erst nach 3 Wochen Hypoxie (10% O<sub>2</sub>, Ratten), was auf unterschiedliche Regulationsmechanismen von HIF kurz- und langfristig hindeutet <sup>[45]</sup>. Zum Teil wurde in humanen Monozyten keinerlei HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation auf 0,1% Hypoxie gesehen nach 1 Stunde bis zu 24 Stunden, sondern

lediglich auf Makrophagen, schon nach 1 Stunde 0,1% Hypoxie, die bis 16 Stunden zunahm und nach 24 Stunden nicht mehr detektierbar war<sup>[46]</sup>. Jedoch konnten Fangradt et al. nachweisen, dass humane Monozyten nach 2 Stunden <1% Sauerstoff HIF-1 $\alpha$  akkumulierten, allerdings nur im Zytosol, Makrophagen aber die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation im Zellkern zeigten<sup>[40]</sup>.

## 5.4 Mononukleäre Zellen

Unter mononukleären Zellen versteht man Immunzellen im zirkulierenden Blut, die einen einzelnen runden bis ovalen Zellkern besitzen. Dazu zählen Lymphozyten (T-Zellen (40-70%), B-Zellen (5-15%), NK-Zellen (5-10%)), Monozyten (10-30%) sowie auch Dendritische Zellen (1-2%)<sup>[47, 48]</sup>. Im Rahmen der standardisierten Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation kommt eine Verunreinigung mononukleärer Zellen durch wenige Granulozyten, vorwiegend basophiler Granulozyten(1-3%)<sup>[49]</sup>, hinzu, zudem eine geringe Anzahl an pluripotenten Stammzellen<sup>[50]</sup>. Der Anteil an Stammzellen liegt bei mononukleären Zellen aus der Nabelschnur Reifgeborener bei 0,1-0,4% und bei mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut Erwachsener bei 0,01-0,1%<sup>[51]</sup>.

Die Gesamt-Leukozytenzahl sowie auch die Anzahl CD14 positiver Monozyten ist in mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC, *cord blood mononuclear cells*) größer im Gegensatz zu mononukleären Zellen aus peripherem Blut Erwachsener (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*)<sup>[52]</sup>. Ein weiterer Unterschied von CBMC im Gegensatz zu PBMC ist der geringere Anteil an T-Lymphozyten (ca. 50% in CBMC und 70% in PBMC)<sup>[52, 53]</sup>.

## 5.5 Monozyten

Monozyten spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr und verknüpfen die angeborene mit der erworbenen Immunität durch Phagozytose und anschließende Antigenpräsentation mit nachfolgender Aktivierung des erworbenen Immunsystems wie der T-Zell-Aktivierung<sup>[54]</sup>.

Monozyten entwickeln sich aus den myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark, werden zu zirkulierenden Monozyten im Blutstrom für etwa 1 bis 3 Tage und

differenzieren nach Migration ins Gewebe zu Makrophagen und Dendritischen Zellen<sup>[55, 56]</sup>, mit denen sie zusammen zum Mononukleären Phagozyten System (MPS) zählen<sup>[57]</sup>. Heutzutage ist bekannt, dass ein Teil der Gewebsmakrophagen embryonalen Ursprungs ist<sup>[58]</sup>.

Die zirkulierenden Monozyten wiederum kommen auch gepoolt in lymphatischem Gewebe wie der Milzpulpa vor. Von dort können sie beispielsweise bei proinflammatorischen Reizen entsendet werden und die proinflammatorische Antwort verstärken. Andererseits sind Monozyten auch essentielle Bestandteile von antiinflammatorischen Signalen und können Resolution mit beispielsweise Wundheilung oder Narbenbildung einleiten<sup>[18]</sup>.

Anhand der unterschiedlichen funktionellen Ausrichtung werden drei Untergruppen von zirkulierenden Monozyten unterschieden. Die „klassischen Monozyten“, gekennzeichnet durch CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> Oberflächenmarker, die vorwiegend Pathogene erkennen, phagozytieren und Antigene präsentieren, Zytokine und Chemokine sezernieren (ca. 85% aller adulten Monozyten), die „intermediären Monozyten“, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, die ebenfalls Antigene präsentieren und Zytokine produzieren<sup>[59]</sup> (ca. 5% aller adulten Monozyten), und die „nicht-klassischen“, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>, die proapoptotisch sind, patrouillierende Funktion einnehmen und antiviral sowie auch antiinflammatorisch wirken (ca. 10% aller adulten Monozyten)<sup>[18, 57, 60]</sup>.

Monozyten stellen prozentual höhere Anteile der Leukozyten bei Neugeborenen und Frühgeborenen im Vergleich zu Erwachsenen, wobei bei Frühgeborenen weniger Monozyten nachgewiesen werden konnten als bei reifen Neugeborenen<sup>[52, 61]</sup>. Bei Frühgeborenen konnten hingegen mehr Dendritische Zellen als bei reifen Neugeborenen nachgewiesen werden<sup>[61]</sup>.

Die vielfältigen Aufgaben von Monozyten als wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems beginnen im Kontext von Infektionen mit dem Erkennen eines Pathogens durch *Pattern-Recognition-Receptors* (PRR, wie beispielsweise Toll-like Rezeptoren, TLR4 ist für die Erkennung von Lipopolysacchariden, LPS, bzw. *E.coli* relevant). Daraufhin wird der Erreger phagozytiert und im besten Falle im Phagolysosom verdaut. Teile des Erregers werden dann über MHC-II-Proteine präsentiert, z.B. an T-Zellen, um diese zu aktivieren. Hierbei ist nicht nur die Bindung

zwischen MHC-II/Antigen-Komplex und T-Zell-Rezeptor (TZR) entscheidend, sondern auch die Bindung von Co-Rezeptoren<sup>[18, 57]</sup>. CD80 und CD86 sind Co-Rezeptoren des TZR aus der B7-Familie und binden an CD28 auf T-Zellen mit dem Effekt einer Aktivierung oder an CTLA-4 (=CD152) mit dem Effekt der T-Zell-Hemmung. CD86 kommt auf Monozyten häufiger vor, CD80 bindet jedoch mit höherer Affinität und Avidität an CTLA-4 und wird anschließend via Transendozytose von der Zelloberfläche entfernt<sup>[62, 63]</sup>. PD-L1 ist ein weiterer Bindungspartner von CD80 und aller Wahrscheinlichkeit nach hauptsächlich in der cis-Bindung vorkommend, also auf derselben Zelle, indem statt einem CD80-Homodimer ein CD80/PD-L1-Heterodimer entsteht, der uneingeschränkt an CD28, schwächer aber an CTLA-4 binden kann<sup>[62]</sup>. Klassischerweise binden PD-L1 und auch PD-L2 jedoch an PD-1 und vermitteln ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung<sup>[64, 65]</sup>.

Ein aktivierter Monozyt kommuniziert auch über die Sekretion von Interleukinen, so werden beispielsweise proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) sezerniert<sup>[66]</sup>.

Monozyten sind imstande neben der Phagozytose direkt bakterizid zu wirken, indem sie zum Beispiel Radikale ausschütten, die die Zellwand der Bakterien angreift wie beispielsweise *reactive oxygen species* (ROS) oder *nitric oxygen* (NO)<sup>[57]</sup>, oder indem sie den Bakterien essenzielle Aminosäuren entziehen durch Enzyme wie Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), die die Aminosäure Tryptophan in bakterizide Kynurenin-Produkte umwandelt<sup>[67]</sup> oder durch Arginase-1, die die Aminosäure Arginase entzieht<sup>[68]</sup>.

Um die Entzündungsbeendigung zu unterstützen, sind Monozyten im weiteren Verlauf der Infektion imstande, antiinflammatorische Signale zu senden wie die Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-4 (IL-4) oder Stimulation von T<sub>reg</sub>-Zellen<sup>[69]</sup>.

## 5.6 Ziel der Arbeit

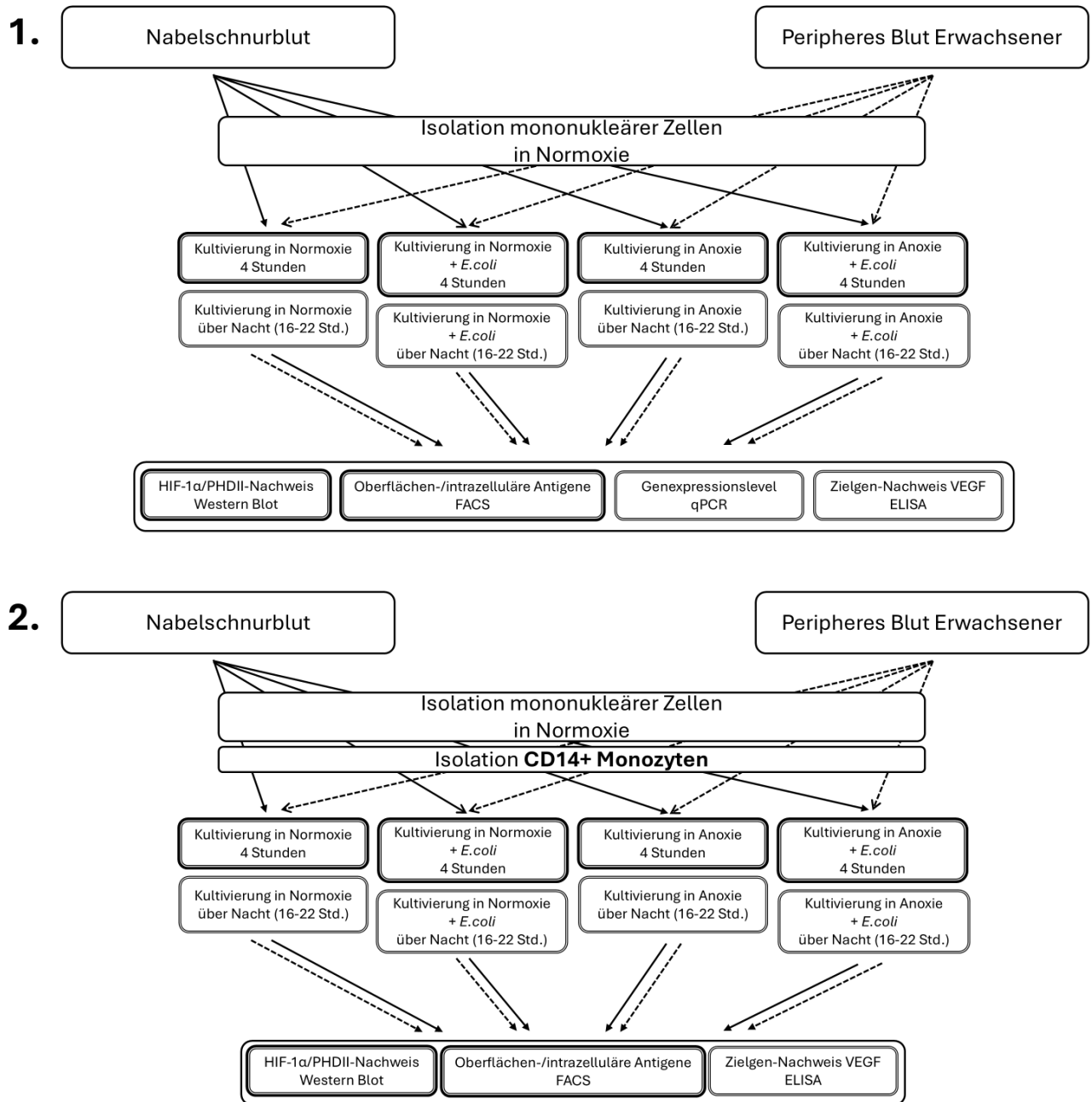
Mit dem ersten Atemzug des Neugeborenen steigt der Sauerstoffpartialdruck im Blut plötzlich und dauerhaft an. Von nun an muss das Immunsystem des Neugeborenen nicht mehr die feto-maternale Toleranz aufrechterhalten, sondern die Immunabwehr von Erregern bei gleichzeitiger Kolonisation durch Kommensale gewährleisten. Wie diese Adaptation des Immunsystems vollzogen wird, konnte bis heute noch nicht

umfassend geklärt werden. Wir vermuten, dass dieser plötzliche Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes nach Geburt eine zentrale Rolle spielt bei dieser essenziellen Anpassung des neonatalen Immunsystems.

In dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen überprüft:

- 1) Mononukleäre Zellen von Neugeborenen sind unter Hypoxie und/oder Infektion mit *E.coli* nicht in der Lage HIF-1 $\alpha$  in gleichem Maße zu aktivieren wie mononukleäre Zellen Erwachsener.
- 2) Die geringere Aktivierbarkeit von HIF-1 $\alpha$  ist bei neonatalen Monozyten unter Bedingungen von Hypoxie und/oder Infektion mit *E.coli* besonders ausgeprägt.
- 3) Die fehlende Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  in mononukleären Zellen ist auf mRNA-Ebene auf Prolylhydroxylasen zurückzuführen, die zu vermehrtem Abbau von HIF-1 $\alpha$  führen.
- 4) Die verminderte Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  hat funktionelle Folgen in neonatalen Monozyten auf Ebene der Zytokin-Produktion und Akkumulation von Effektorenzymen.
- 5) Die verminderte HIF-Aktivierung neonataler mononukleärer Zellen hat Einfluss auf Zielgene von HIF, beispielhaft auf VEGF.

## 5.7 Konzeption der Versuche



**Abbildung 1 Konzeption der Versuche**

(1.) In einem ersten Versuchsabschnitt wurden sämtliche Versuche an mononukleären Zellen durchgeführt. (2.) In einem zweiten Versuchsabschnitt wurden aus den mononukleären Zellen CD14-tragende Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung (negativ) isoliert.

## 6 Material

Sofern kein Land vermerkt ist, befindet sich der Hauptsitz der Firma in Deutschland.

### 6.1 Patientenproben und Ethikvotum

Das verwendete Nabelschnurblut nach Sectio caesarea wurde nach vorhergehender Aufklärung durch die GynäkologInnen des Universitätsfrauenklinikums Tübingen und nach Einverständnis der Mütter aus dem plazentanahen Nabelschnuranteil gewonnen. Hierzu wurde bei geklemmter Nabelschnur eine Nabelschnurarterie in Nähe der Plazenta punktiert und das Blut mit einer 50ml-Spritze abgezogen, die mit 2 ml Heparin die Blutgerinnung verhinderte (100 I.U./ml).

Die Ethikkommission der Universität Tübingen hat mit dem **Ethikvotum „Allgemeine Nabelschnurblutnutzung“ Nr. 248/2005A** einer anonymen Verwendung ohne Erfassung weiterer Daten von Nabelschnurblut dem hiesigen Forschungsvorhaben zugestimmt.

Das verwendete Vollblut gesunder Erwachsener stammt von freiwilligen Spendern; die Entnahme erfolgte im Labor für Neonatale Immunologie durch Venenpunktion und anonym.

Die weitere Aufbereitung und Zellgewinnung erfolgte direkt im Anschluss an die Gewinnung der Blutproben.

### 6.2 Materialien biologischen Ursprungs

Tabelle 1 Materialien biologischen Ursprungs

<i>Escherichia coli</i> K1strain DH5 $\alpha$ – nicht fluoreszierend	Stammsammlung des Labors für Neonatale Immunologie
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom GmbH, Berlin

Gentamycin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Humanes Serum Albumin (HSA)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Penicillin-Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin

### 6.3 Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme

Tabelle 2 Chemikalien, Reagenzien und Kitsysteme

2-Mercaptoethanol, ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
5x Reaction Buffer for Reverse Transcription	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Amersham ECL™ Prime Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Illinois, Vereinigte Staaten von Amerika
Ampuwa® Spüllösung 1000ml Plastipur®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
AnaeroGen 2.5l-Beutel	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
autoMACS® Running Buffer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail (protease inhibitor cocktail)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
D-PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DuoSet Ancillary Reagent Kit 2	Research And Diagnostic Systems, Inc., Minnesota, Vereinigte Staaten von Amerika
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol absolute p.A.	AppliChem GmbH, Darmstadt
FACSFlow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Glycerol, ≥99.0%	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Glycine ReagentPlus®, ≥99% (HPLC)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®, 0,2ml-Ampullen	Ratiopharm GmbH, Ulm
HEPES buffer solution (1M)	Biochrom GmbH, Berlin

Human VEGF DuoSet ELISA	Research And Diagnostic Systems, Inc., Minnesota, Vereinigte Staaten von Amerika
Isopropanol 70%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach
Kochsalzlösung 0,9% Glasfl. Fresenius	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
LB-Medium (Lennox L Broth Base)	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Methanol, ≥99.9%	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ), 20%ig	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
NucleoSpin RNA Kit	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika (26616)

Pierce BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika (23228)
Pierce BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika (1859078)
PMSF (Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride) Protease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Revert Aid H Minus Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
ROTI®Fair 10 % SDS (sodium dodecyl sulfate)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkulturmedium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure (HCl) 36,5-38%	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
TEMED ≥99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS Pufferan® ≥99.9%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Triton X 100	American Diagnostica Inc., Stamford, Connecticut, Vereinigte Staaten von Amerika
Trypanblau (C.I. 23850)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

## 6.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Materialien des allgemeinen Laborbedarfs

Einmalhandschuhe  S, M Peha-soft nitrile	Hartmann-Gruppe, Heidenheim an der Brenz
Eppendorf Reaktionsgefäße  0,5ml, 1,5ml und 2ml Safe-Lock Tubes  Eppendorf PCR Tubes, 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg  Eppendorf AG, Hamburg
Glaspipetten  Pasteur capillary pipettes, long size 230mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg
Kanülen  Safety-Multifly®-Kanülen  Microlance 3, 0,9x40mm	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht  Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Küvetten  UVette® 220-1600nm, 50-2000µl Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96-well, white	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
LightCycler® 480 Sealing Foil	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön
Objektträger, 76x26mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Pipettenspitzen Spitzen, 10µl, farblos Spitzen, 200µl, gelb Spitzen, 1000µl, blau Gel-Pipettenspitzen, 1-200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
RNase free H <sub>2</sub> O	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
Rundboden-Polystyrolröhrchen 5 ml („FACS“ Röhrchen)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Spitzbodenröhrchen 15, 50 ml, Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzen	

10, 20, 30ml Spritze Injekt®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Stabpipetten 5, 10, 25 ml Stripette®	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
Whatman Filterpapier	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellkulturplatten	
6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
12 Well Cell Culture Plate	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
24 Well Cell Culture Plate	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
48 Well Cell Culture Plate	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
96 Well Cell Culture Plate, flat bottom (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96 Well Cell Culture Plate, round bottom (Cellstar®)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

## 6.5 Kulturmedien und Puffer

Tabelle 4 Kulturmedien und Puffer

<b>Medium/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Verwendung</b>
BCA-Reagenz	Reagenz B mit Reagenz A 1:50 verdünnen, 190µl pro Well	Western Blot, Bestimmung der Proteinmenge

Blotting-Buffer (Lagerung bei 4°C)	6g Tris Base (Endkonzentration 25mM) 28,8g Glycin 400ml Methanol mit Aqua dest. auf 2l auffüllen	Western Blot, Transferpuffer
FACS-Puffer	FACS-Flow 0,1 % NaN <sub>3</sub>	Waschen nach (FACS)- Antikörper-Inkubation
5-fach Ladepuffer	1,25 ml Tris Base pH6,8 4ml 10% SDS 2ml Glycerol 1,75ml Aqua dest. 1mg Bromphenolblau pro 90µl Ladepuffer 10µl Mercaptoethanol zugeben	Western Blot, Probenpuffer für Gelelektrophorese
10-fach Laufpuffer	30g Tris Base 144g Glycin 10g SDS mit Aqua dest. auf 1l auffüllen	Western Blot, Puffer für Gelelektrophorese Wet- Blot
LB-Medium	5 g LB Broth Base 250 ml Ampuwa	Bakterienkultur
Lyse-Puffer	2,61ml Aqua dest. 150µl Tris/HCl pH 7,4 60µl 5M NaCl 30µl 10% Triton X 100 120µl PIC	Western Blot, Lysieren der Zellen für die Probengewinnung

	30µl PMSF (Achtung: nur ungefähr 30min stabil)	
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA bzw. HSA 2 mM EDTA	Laufpuffer für MACS-Gerät
Magermilchlösung 5%	2,5g Magermilchpulver in 50 ml 0,1% TBST-Puffer lösen	Western Blot, Blocken der PVDF Membran
RPMI-Medium	RPMI-Medium Zellkultur 10 % FBS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin	Zellkulturmedium
Sammelgel	2,93 ml Ampuwa 495 µl Acrylamid 225 µl 1M Tris/HCL pH 6,8 16,3 µl APS 3,8 µl TEMED	Western Blot, für Gelelektrophorese
0,1% TBST-Puffer	25ml 20-fach TBST-Puffer mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen	Western Blot, Waschpuffer für PVDF Membran
20-fach TBST-Puffer	100ml 1M Tris/base ph 7,4 150ml 5M NaCl 20ml 0,5M EDTA 10ml Tween 20 (2%ig) mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen	Western Blot, Konzentrat für Herstellung des Waschpuffers

Trenngel (10%)	4 ml Ampuwa 3,3 ml Acrylamid 2,5 ml 1,5M Tris/HCL pH 8,8 100 ul 10% SDS 50 µl APS 5 µl TEMED	Western Blot, für Gelelektrophorese
----------------	---	--

## 6.6 Antikörper

### 6.6.1 FACS Antikörper (human)

Phycoerythrin-konjugierte (PE)-Antikörper

Tabelle 5 FACS-Antikörper PE

<b><i>Antikörper gegen</i></b>	<b><i>Klon</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>	<b><i>Bestellnr.</i></b>
PD-L2 (CD273)	24F.10C12	BioLegend	329605
CD16	3G8	BD	556619
CD80	L307.4	BD	340294
IL-1 $\beta$	AS10 (RUO(GMP))	BD	340516
IL-6	MQ2-6A3 (RUO)	BDp (Pharmingen)	554697
IL-8	G265-8 (RUO)	BDp (Pharmingen)	554720
IDO	700838	R&D Systems	IC8026P

Peridinin Chlorophyll Protein Complex-konjugierte (PerCP)-Antikörper

Tabelle 6 FACS Antikörper PerCP

<b><i>Antikörper gegen</i></b>	<b><i>Klon</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>	<b><i>Bestellnr.</i></b>
CD14	Tük4	Miltenyi Biotec	130-094-969

CD86	2331 (FUN-1)	BD	561129
------	--------------	----	--------

### Allophycocyanin-konjugierte (APC)-Antikörper

Tabelle 7 FACS Antikörper APC

<b>Antikörper gegen</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnr.</b>
CD14	MφP9	BD	345787
PD-L1(CD274)	29E.2A3	BioLegend	329707

### 6.6.2 MACS Beads

Tabelle 8 MACS-MicroBeads

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnr.</b>
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096-537
Classical Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-117-337

### 6.6.3 Western Blot Antikörper

Tabelle 9 Western Blot Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnr.</b>
Actin (I-19)-R (rabbit-anti-human)	Santa Cruz Biotechnology, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika (sc-1616-R)	Sc-1616-R
HRP (goat-anti-mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika (sc-2005)	Sc-2005

HRP (goat-anti-rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika (sc-2004)	Sc-2004
HIF-1 alpha (mouse-anti-human)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika (610959)	610959
PHD2 (rabbit-anti-human)	Novus Biologicals, Colorado, Vereinigte Staaten von Amerika (NB 100-137)	NB 100-137
Recomb.mouse IgG protein+HRP	Santa Cruz Biotechnology, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika (sc-516102)	Sc-516102

## 6.7 Primer

Tabelle 10 qPCR Primer-Paare

PrimePCR™ SYBR® Green Assay: EGLN1, human	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika  Unique Assay ID: qHsaCEP0058182
PrimePCR™ SYBR® Green Assay: HIF1A, human	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika  Unique Assay ID: qHsaCEP0050075
PrimePCR™ SYBR® Green Assay: RPL37, human	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika  Unique Assay ID: qHsaCEP0052538

## 6.8 Gase

Tabelle 11 Gase

Kohlenstoffdioxid (CO <sub>2</sub> )	Westfalen AG, Münster
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Westfalen AG, Münster

## 6.9 Geräte

Tabelle 12 Geräte

Anaerob-Behälter  BBL GasPak® jar  Anaerocult® Behälter	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika  Merck KGaA, Darmstadt
autoMACS® 003 (Magnetic cell separation)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
ELISA-Reader  Sunrise™ Absorbance Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
FACS Calibur Flow Cytometer	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
Inkubatoren  Jeweils 5% CO <sub>2</sub> , 37°C, wasserdampfgesättigt	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau  Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlgeräte  Ultra Low Freezer Telstar U570 -86°C	Azbil Telstar Technologies S.L.U., Terrassa, Spanien

Kühlschrank Bosch „economic“	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Laborwaage	waagenwelt Stefan Rusche, Toppenstedt
Lichtmikroskop Olympus IM	Olympus K.K., Shinjuku, Japan
Netzgerät Power Supply Consort E831	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Photometer BioPhotometer NanoDrop 2000/2000c	Eppendorf AG, Hamburg Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipetten 2µl-, 10µl-, 20µl-, 100µl-, 200µl-, 1000µl- Pipette	Gilson Inc., Middleton, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipettierhilfen Pipettierhilfe accu-jet® pro Transferpette®-8 20-200µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Schüttel- und Mischgeräte Duomax 1030 Titramax 1000 Reamix 2789	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach Hämacont, Gesellschaft für med. Meßtechnik mbH, Bad Homburg
Sterilbank	

HeraSafe	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler T100 Thermal Cycler LightCycler® 480 Instrument II	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Thermoschüttler TS basic Thermomixer compact	CellMedia GmbH&Co. KG, Elsteraue Eppendorf AG, Hamburg
Western Blot Spacer plates 1,5mm, Glasplatten, Kämmе, Halterungen, Behälter, Gel- Halterung, Elektroden-Einheit, Schwämme	Alle: Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Western Blot Imaging Odyssey® Fc Imaging System	Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika
Zellzählgerät Sysmex XP-300	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
Zentrifugen Megafuge 1.0 R Zentrifuge Rotanta 460 RS und 46 RS	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Multifuge X3R	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Fresco 17	Heraeus Instruments, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Minizentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

## 6.10 Software

Tabelle 13 Mess- und Auswerte- Software

CellQuestPro (2011)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, Vereinigte Staaten von Amerika
EndNote 20	Clarivate Analytics, Philadelphia, Vereinigte Staaten von Amerika
FlowJo v10	FlowJo, Ashland, Oregon, Vereinigte Staaten von Amerika
GraphPad Prism 9	Graph Pad Software Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
ImageJ	National Institutes of Health
LI-COR® Acquisition Software/ Image Studio Lite Version 5.2	Li-Cor Biosciences Inc., Lincoln, Vereinigte Staaten von Amerika
LightCycler®480 Software release 1.5.1	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Magellan 6	Stüber Systems GmbH, Berlin

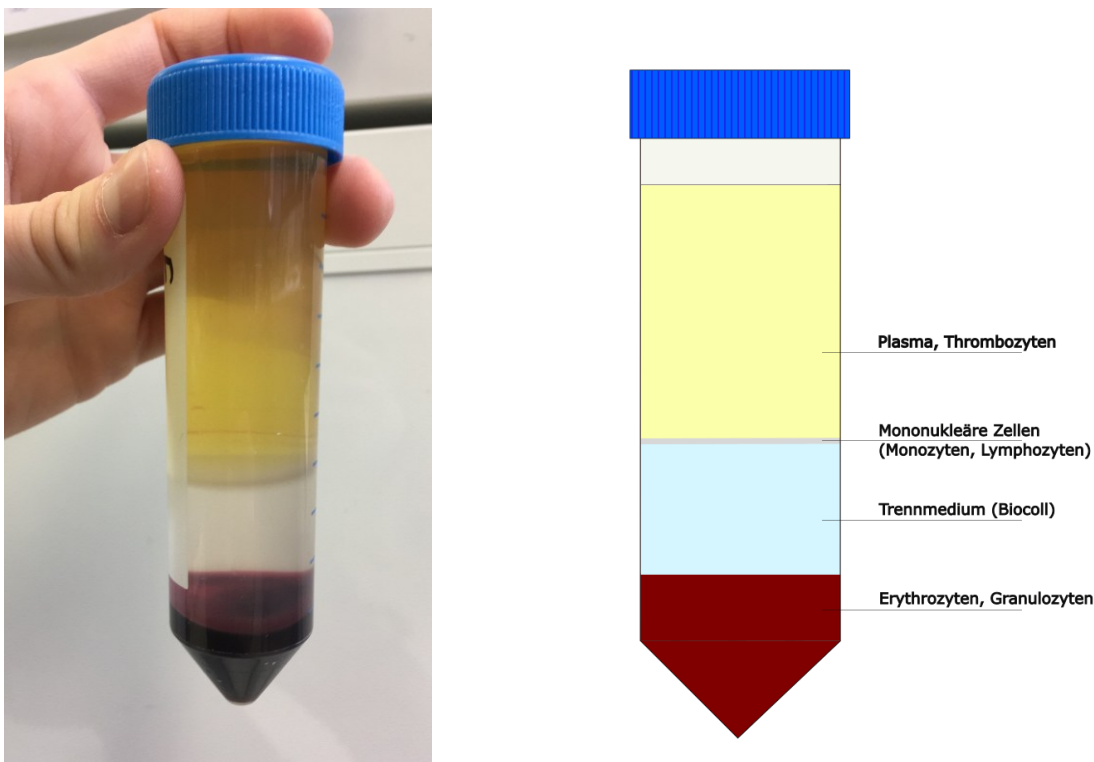
---

Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (Version 2502 Build 16.0.18526.20144) 32 Bit	Microsoft® Corporation, Redmond, US-Bundesstaat Washington, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft® Word für Microsoft 365 MSO (Version 2502 Build 16.0.18526.20144) 32 Bit	Microsoft® Corporation, Redmond, US-Bundesstaat Washington, Vereinigte Staaten von Amerika
NanoDrop2000/200c Software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

## 7 Methoden

### 7.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Die heparinisierten Vollblutproben gesunder Erwachsener und reifgeborener Neonaten wurden direkt im Anschluss an die Probengewinnung in unserem Labor in einer sterilen Sicherheitswerkbank weiterverarbeitet und mononukleäre Zellen mittels der Dichtegradientenzentrifugation separiert von den übrigen Blutbestandteilen. Zunächst wurde das Vollblut 1:2 mit PBS auf 35 ml verdünnt und anschließend auf 20ml Biocoll aufgeschichtet ohne Vermischung der Phasen. Nach dem Prinzip von Arne Bøyum<sup>[70-72]</sup> sinken die Erythrozyten und Granulozyten bei der 25-minütigen Zentrifugation mit 400g bei 20°C (ohne Bremse) in diesem flüssigen Polymer (Polysucrose) mit der Dichte von 1,077 g/ml ab, das Blutplasma inklusive Thrombozyten bleibt in der obersten Phase und oberhalb der Biocollschicht sammeln sich in einer milchig-trüben Schicht die mononukleären Zellen an.



**Abbildung 2** Isolation mononukleärer Zellen via Dichtegradientenzentrifugation nach Arne Bøyum

Auftrennung des verdünnten Vollblutes nach Dichtegradientenzentrifugation in Plasma (oben, gelblich), mononukleäre Zellen (trüber Ring), Biocoll (durchsichtig) und Erythrozyten mit Granulozyten (unten, rot).

Die Schicht mit den mononukleären Zellen wurde mit einer Stabpipette vorsichtig abgesaugt und in ein weiteres 50ml-Spitzbodenröhrchen überführt, um die Zellen mit PBS zu waschen (Zentrifugation für 10 Minuten bei 10°C und 500g). Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte ein dritter Waschschrift mit PBS (Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 400g).

## 7.2 Bestimmung der Zellzahl

Zum Ermitteln der Zellzahl wurde das Zellpellet resuspendiert und eine definierte Menge PBS zugegeben, meist 10 ml. Davon wurden 100µl in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und im Zellzählgerät untersucht.

Bei der Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop wurde die Zählprobe von 50 µl 1:1 mit Trypanblau gefärbt, um nicht vitale Zellen zu detektieren. Die Zellkonzentration der Suspension errechnete sich dann wie folgt:

$$\text{Zellzahl/mL} = \text{Mittelwert der ausgezählten Felder} * \text{Verdünnungsfaktor} (2) * 10^4 \text{ Zellen/mL}$$

Anhand der gemessenen bzw. errechneten Zellzahl wurde das Zellpellet in eine entsprechende Menge Nährmedium (RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen, sodass die Zellkonzentration auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt wurde (für den Western Blot wurde eine Zellkonzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt).

## 7.3 Anlage der Zellkulturen in Normoxie und Anoxie

Die Zellkulturen wurden in 6-, 12-, 24- oder 48-Well-Platten angelegt (je nach Volumen entsprechend der Zellzahl). Die Wells wurden – im Nachhinein geschätzt – ca. mit einer Füllhöhe von 3-5 mm belegt.

Proben für Normoxie wurden im Inkubator bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Proben für Anoxie wurden nach der Aufreinigung in Normoxie im selben Inkubator wie die normoxischen Proben in einem dicht schließenden Anoxiebehälter (ca. 1-3 Liter Volumen) mit einem Beutel Anaerogen® inkubiert, das heißt bei 37°C und durch den Beutel Anaerogen® mit <1% O<sub>2</sub> innerhalb einer Stunde (laut Herstellerangaben),

sowie weniger als 100% Luftfeuchtigkeit, die innerhalb des dicht schließenden Behälters nicht erhöht werden konnte. Bei der späteren Zugabe von Substanzen, wie Antibiotikum in die Wells, musste die Anoxie unterbrochen und mit einem neuen Beutel Anaerogen® wieder hergestellt werden. Die Unterbrechungszeiten wurden so kurz wie möglich gehalten.

## 7.4 Arbeiten mit Bakterien

Es wurden *E.coli K1strain DH5α* verwendet, die am Abend vor dem Versuch aus dem -80°C Gefrierschrank aufgetaut und in 5mL LB-Medium über Nacht bei 37°C und einer Frequenz von 200 rpm geschüttelt inkubiert wurden. Morgens wurden 200 µl der Bakterienkultur in 5 mL frisches LB-Medium umgesetzt und erneut ca. eine Stunde geschüttelt inkubiert, um die logarithmische Wachstumsphase der Bakterien zu erwischen.

Zur Messung der Bakterien-Konzentration wurde die Extinktion bei OD 600 (*optical density at 600nm*) gemessen, wobei 100µl LB-Medium als Leerwert gemessen wurden und anschließend 100µl der Bakteriensuspension. Der Zielbereich lag zwischen 0,4 bis 0,6 OD (logarithmische Wachstumsphase). Die Bakterienkultur wurde nach der Messung auf Eis gelagert zur Hemmung weiteren Bakterienwachstums.

Die MOI (*multiplicity of infection*) betrug 1:50 (humane Zellen:*E.coli*). Dies wurde anhand der Rechnung  $\frac{100}{2*OD}$  µl Bakteriensuspension pro mL Zellsuspension (mit  $2 \times 10^6$  Zellen/mL) erreicht.

Anschließend wurden entsprechende Zellkulturen, die frisch in die Well-Platten gesetzt worden waren, mit dem errechneten Volumen der Bakterienkultur infiziert und für eine Stunde inkubiert.

Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dazu gut resuspendiert, in ein 15ml-Spitzbodenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 4°C und 310g zentrifugiert. Der Überstand wurde steril abgekippt, das Zellpellet wieder resuspendiert und vorsichtig auf 3 ml FBS geschichtet. Nach nochmaligem Zentrifugieren im selben Programm wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abpipettiert, die Zellen resuspendiert und in der Konzentration wie zuvor in

Nährmedium aufgenommen, dazu 10 µl Gentamycin pro ml Zellsuspension gegeben und weiter inkubiert.

In späteren Versuchen wurde der Waschschrift übersprungen und lediglich nach einer Stunde Inkubation mit vitalen Bakterien 10 µl Gentamycin pro ml Zellsuspension hinzupipettiert, um Zellverlust durch den zusätzlichen Waschschrift zu vermeiden.

## 7.5 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie kann die Streustrahlung und Fluoreszenz einzelner Zellen detektiert werden, die durch ein Flüssigkeitssystem geleitet einzeln mit Laserstrahlung und Spiegeln angeregt wurden. Das ausgesandte Licht wird über Sensoren in Messwerte verwandelt. Die Zellgröße kann anhand der Streustrahlung im sogenannten *Forward Scatter* (FSC) und die Granularität der Zelle im sogenannten *Side Scatter* (SSC) errechnet werden. Zur Bestimmung bestimmter membranständiger Oberflächenmarker der Zellen werden monoklonale Antikörper eingesetzt, an die Fluorochrome gebunden sind. Nach Permeabilisieren der Zellmembran ist so auch eine Bestimmung intrazellulärer Strukturen möglich. Die ungewollte Streustrahlung verschiedener Fluorochrome in andere spektrale Bereiche kann rechnerisch kompensiert werden.

Die von uns am FACS Calibur™ gemessenen Werte wurden mit den Softwares CellQuestPro und FlowJo v10 ausgewertet.

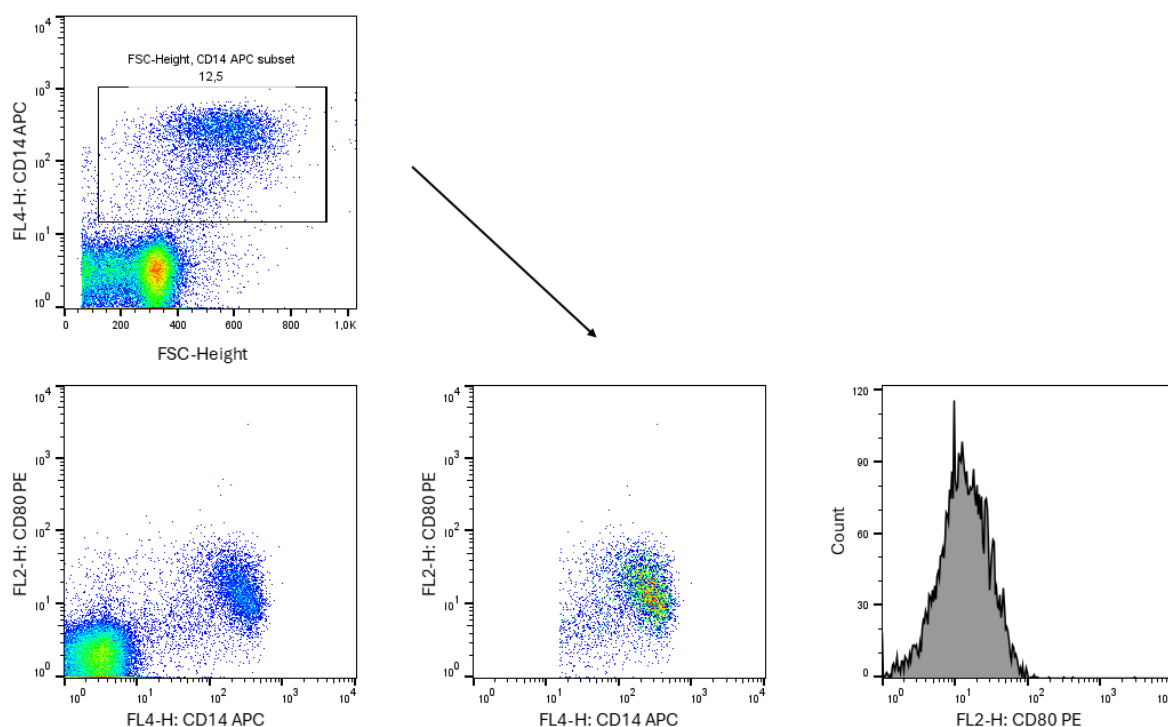


Abbildung 3 Beispielhafte Gating-Strategie auf CD80 für CD14-tragende Zellen

### 7.5.1 Magnetische Zellsortierung (MACS)

*Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)* ermöglicht es mittels magnetischer Partikel, die spezifisch an bestimmte Zellen binden, diese aus einer gemischten Zellpopulation zu separieren. Antikörper-gekoppelte magnetische *Micro-Beads* binden an Oberflächenmarker der Zelle und werden dann durch eine Säule geleitet, die eine ferro-magnetische Matrix enthält, die das elektromagnetische Feld außerhalb der Säule um ein Vielfaches verstärkt. Hierbei werden die Zellen mit gebundenen Antikörper-gekoppelten *Beads* magnetisch festgehalten und die nicht markierten Zellen werden ausgewaschen. Im zweiten Schritt wird das elektromagnetische Feld abgeschaltet und die verbliebenen Zellen in ein neues Gefäß unter der Säule ausgewaschen. Nachteil ist unter anderem, dass die mittels Antikörper an die Zelle gebundenen *Beads* anschließend nicht entfernt werden können und eventuell die Zelle aktivieren oder ihre Funktion beeinträchtigen. Daher wählten wir die negative Selektion unserer CD14-positiven (CD14+) Monozyten.

Die Zellseparierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Die per Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen mononukleären Zellen wurden gezählt und nach dem letzten Zentrifugieren der Überstand verworfen, die Zellen in 30

$\mu\text{l}$  MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Es wurden  $10 \mu\text{l}$  Fc-Rezeptor Blocking Reagenz und  $10 \mu\text{l}$  der Biotin-Antikörper-gekoppelten Beads-Mischung (Pan Monocyte Isolation Kit, Miltenyi Biotec für FACS-Versuche, Classical Monocyte Isolation Kit, Miltenyi Biotec für VEGF und Western Blot) pro  $10^7$  Zellen den Zellen zugegeben und für 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Zugabe von  $30 \mu\text{l}$  MACS-Puffer wurden  $20 \mu\text{l}$  Anti-Biotin MicroBeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen hinzugefügt und für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Eine *MACS-Column* (Säule) wurde in den autoMACS®-Apparat eingesetzt und mit MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde in den Apparat gegeben und über die Säule laufen gelassen, die gesammelte Flüssigkeit enthielt erste nicht-markierte Zellen (ohne Beads). Anschließend wurde mit MACS-Puffer nachgespült und nochmals unmarkierte Zellen gesammelt. In der gesammelten Zellsuspension im 15ml-Spitzbodenröhrchen befanden sich nun die erwünschten unmarkierten (CD14 positiven) Monozyten. Die übrigen Zellen wurden im letzten Schritt ohne magnetisches Feld in ein anderes 15ml-Spitzbodenröhrchen ausgewaschen.

### 7.5.2 Phänotyp-Färbung

Zur Messung von Oberflächenantigenen. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen aus der Zellkultur in Spitzbodenröhrchen überführt und die Zellen 5 Minuten bei  $310g$  und  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Währenddessen wurden die FACS-Antikörpermischungen vorbereitet und auf die FACS-Rundbodenröhrchen verteilt, anschließend die volumengleich in FacsFlow resuspendierten Zellen auf die FACS-Rundbodenröhrchen verteilt und gevortext zur gleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenzantikörpermischung auf die Zellen ( $2 \times 10^5$  bis  $4 \times 10^5$  Zellen pro Rundbodenröhrchen). Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Dunkelheit im Kühlschrank erfolgte ein Waschschrift zur Säuberung von nicht gebundenen FACS-Antikörpern mit je  $1 \text{ ml}$  FacsFlow (Zentrifugation für 5 Minuten bei  $310g$  und  $4^\circ\text{C}$ ). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vor der durchflusszytometrischen Messung gevortext. Ein Rundbodenröhrchen wurde als Kontrolle nur mit Zellen ohne Fluoreszenzantikörper gemessen (ohne Färbung).

Die Menge der verschiedenen fluoreszenzgebundenen Antikörper wurde in Vorversuchen unserer Laborgruppe titriert.

### 7.5.3 Intrazellulär-Färbung

Zur Messung der Interleukin-Produktion. 4 Stunden vor der Messung wurde der Zellkultur Brefeldin hinzugefügt (10µl Brefeldin pro  $2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml), um den intrazellulären Proteintransport zu hemmen und somit die intrazelluläre Anreicherung der produzierten Proteine zu erwirken. Somit können Interleukine, die sonst sezerniert werden, intrazellulär bestimmt werden.

Nach Überführung aus der Well-Platte in Spitzbodenröhrchen und einmaligem Waschen der Zellen (1 ml FACS Flow, Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C, Überstand abkippen und Zellen resuspendieren) erfolgte die Extrazellulärfärbung wie bei der Phänotypfärbung. Hierbei wurden die Zellen mit CD14-APC-Antikörpern für 10 Minuten bei Dunkelheit im Kühlschrank inkubiert, wiederum erfolgte ein Waschgang (1 ml FACS Flow pro Röhrchen, Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C, Überstand abkippen). Anschließend wurden pro FACS Rundbodenröhrchen 200µl Zytofix/Cytoperm® zur Permeabilisierung der Membran hinzugefügt und für 20 Minuten bei Dunkelheit im Kühlschrank inkubiert. Im Nachgang wurde mit einer 1:10 Verdünnung Perm/Wash® (enthält Saponine) im selben Programm wie eben gewaschen (Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C). Dann erfolgte die Inkubation mit den intrazellulären fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 30 Minuten im Kühlschrank, danach ein Waschschrift mit FACS Flow (Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C) vor der Messung. Ein Rundbodenröhrchen ohne jegliche Färbung und eines mit lediglich der extrazellulären Färbung dienten als Kontrollen.

### 7.5.4 Effektor-Enzym-Färbung

Nach Überführung der Zellen aus der Zellkulturplatte in Spitzbodenröhrchen und einmaligem Waschen der Zellen (1 ml FACS Flow, Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C, Überstand abkippen und Zellen resuspendieren) erfolgte die Extrazellulärfärbung wie bei der Phänotypfärbung. Hierbei wurden die Zellen mit CD14-PerCP-Antikörpern für 10 Minuten bei Dunkelheit im Kühlschrank inkubiert, wiederum erfolgte ein Waschgang (1 ml FACS Flow pro Röhrchen, Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C, Überstand abkippen). Anschließend wurden pro FACS Rundbodenröhrchen 100µl Zytofix/Cytoperm® zur Permeabilisierung der Membran hinzugefügt und für 20

Minuten bei Dunkelheit im Kühlschrank inkubiert. Im Nachgang wurde mit einer 1:10 Verdünnung Perm/Wash® (enthält Saponine) im selben Programm wie eben gewaschen (Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C). Dann erfolgte die Inkubation mit den intrazellulären fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 30 Minuten im Kühlschrank, danach ein Waschschrift mit FACS Flow (Zentrifuge 5 Minuten bei 310g und 4°C) vor der Messung. Ein Rundbodenröhrchen ohne jegliche Färbung und eines mit lediglich der extrazellulären Färbung dienten als Kontrollen.

## 7.6 Arbeiten mit Proteinen

### 7.6.1 Gewinnung der Proteinproben

Die inkubierten Zellen wurden resuspendiert und aus den Zellkulturen jeweils in ein 15ml-Spitzbodenröhrchen überführt. Nach Zugabe von ca. 5 ml 4°C kaltem PBS wurden die Zellen bei 4°C und 310g 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt, um FBS (Bestandteil des Zellkulturmediums) zu entfernen, und die Probenröhrchen anschließend auf Zellstoff abgetropft, um dem Zellpellet möglichst viel Flüssigkeit vor der Lyse zu entziehen. Das Zellpellet wurde daraufhin in 100µl Lysepuffer inklusive 1µl Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen, gut resuspendiert, um die Zellmembranen aufzubrechen, und in ein Eppendorfgesäß überführt, das kurze Zeit in flüssigen Stickstoff getaucht wurde. Die Proben wurden anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert und der Zelldedritus danach bei 4°C für 10 Minuten bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. Der Probenüberstand mit den darin gelösten Zellproteinen wurde abpipettiert und auf zwei neue Eppendorfgesäße verteilt (eines zur Proteinbestimmung, eines für den späteren Western Blot), das Eppendorfgesäß mit dem Zelldedritus verworfen.

Die so gewonnenen Proteinproben wurden bei -80°C eingefroren.

### 7.6.2 Ermittlung der Proteinmenge mittels Bicinchoninsäure (BCA-Test)

In eine 96-Well-Platte (Flachboden) wurde eine Verdünnungsreihe in Triplets mit BSA-Standard (Bovines Serumalbumin in der Konzentration 2mg Protein/ml) und Lysepuffer pipettiert (0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1250; 1500; 2000 µg BSA/ml pro 10µl Lösung). Für jede Probe wurden vier Verdünnungen aufgetragen mit 2, 5, 7 und 10µl

Proteinprobe, wovon die ersten drei mit Lysepuffer auf 10µl Volumen aufgefüllt wurden.

Anschließend wurde das BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure) nach Anleitung des Herstellers hergestellt (Reagenz A (Bicinchoninsäurelösung) wurde mit Reagenz B (Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat 4%-Lösung) 50:1 gemischt) und je 190µl pro Well der Platte hinzugegeben. Die Platte wurde bei 37°C und 600 rpm 30 Minuten im Schüttler inkubiert. Die 96-Well-Platte konnte dann im „ELISA-Reader“ bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen werden. Die Extinktionswerte wurden in eine entsprechende Excel-Tabelle überführt. Anhand der Extinktionswerte der BSA-Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt und damit aus den Probenextinktionswerten die Proteinmenge der Proben errechnet.

BSA-Standardreihe [µl]+ Lyse-Puffer [µl]											
	0,5	2,5	5	10	15	20	25	30		2	2
	39,5	37,5	35	30	25	20	15	10		8	8
	je 10µl	je 10µl	je 10µl	je 10µl	je 10µl	je 10µl	je 10µl	je 10µl			
10	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	10	5	5
10	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	10	5	5
10	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	10	7	7
										3	3
										10	10
										0	0
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Protein-Lysate [µl]+ Lyse-Puffer [µl]											

Abbildung 4 Pipettierschema zur Proteinmengenbestimmung mittels ELISA

### 7.6.3 Western Blot

Das Western-Blot Verfahren dient dem Nachweis von Proteinen, die zuvor mittels eines Elektrophorese-Verfahrens aufgetrennt wurden, beispielsweise anhand ihrer Größe oder elektrischen Ladung. Wir führten zunächst eine Denaturierung der Proteine durch, indem wir die Proben mit SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*, Natriumdodecylsulfat) und  $\beta$ -Mercaptoethanol für 5 Minuten auf 95°C erhitzen. Hierbei

wird zugleich die Eigenladung der Proteine mit negativen Ladungen ersetzt, sodass bei der Gelelektrophorese durch ein Polyacrylamidgel die Proteine anhand ihrer Proteingröße unabhängig ihrer ursprünglichen Ladung aufgetrennt werden konnten. Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteinproben aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, hydrophob) übertragen mittels *Wet-Blot*. Nach dem Blotting erfolgte die Immundetektion, indem ein Primärantikörper an die Proteine von Interesse band und ein Sekundärantikörper mit HRP-Konjugat (Meerrettich-Peroxidase) wiederum an den Primärantikörper band. Die Chemilumineszenz der Proteinbanden wurde zuletzt mit einem entsprechenden Gerät detektiert.

#### 7.6.3.1 Auftrennung der Proteine (SDS-Page)

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese, der *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), wurden am Vortag 10%ige Gele von 1,5mm Dicke mit 10 Kammern gegossen. Die Glasplatten wurden in die Halterung gespannt und etwa zwei Drittel der Glasplattenhöhe mit Trenngel gefüllt. Gleich anschließend wurde 1ml destilliertes Wasser darauf gegeben, um einen glatten Abschluss zum Sammelgel hin zu erhalten (siehe Tabelle 4 Kulturmedien und Puffer). Das Trenngel polymerisierte in ca. 20 Minuten aus, was am Gelrest gut zu überprüfen war. Das Wasser wurde abgekippt und anschließend auf einer Höhe von einem Drittel bis zu einem Viertel der Glasplatte das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, welches wiederum etwa 20 Minuten auspolymerisierte. Gelagert wurden die Gele über Nacht in mit einfachem Laufpuffer getränkten Tüchern. Am nächsten Tag wurden die Glasplatten mit den Gelen aus den Halterungen genommen, die Kämmen vorsichtig entfernt und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde dann bis zur Oberkante der Gele mit einfachem Laufpuffer gefüllt.

Die Proben wurden vorbereitet, von den Proben jeweils dieselbe Proteinmenge (errechnet anhand des BCA-Tests) in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, wobei das Volumen 25µl nicht überschreiten sollte, und mit Lysepuffer auf 40µl aufgefüllt. Dazu wurden 8µl fünffach Ladepuffer gegeben. Das Laden der Proben in die Geltaschen erfolgte mit einer Ladespritze. Mindestens eine Tasche pro Gel wurde mit 15µl *Prestained Protein Ladder page Ruler* befüllt, einem gefärbten Proteingrößenstandard,

anhand dessen sichtbar wurde, wie weit die Proben bereits gelaufen waren und der später zur Einschätzung der Probenproteingröße diene.

Nach dem Laden der Gele wurde die Elektrophoresekammer an das Spannungsgerät mit einer begrenzten Höchstspannung von 300V und 15mA pro Sammelgel plus 20mA Stromstärke pro Trenngel angeschlossen. Die Laufzeit wurde daran bemessen, inwieweit der Ladepuffer sichtbar über den Rand des Gels hinauslief bzw. die Proteinmarker die gewünschte Position erreicht hatten.

### 7.6.3.2 Transfer der Proteine auf eine Membran mittels Wet Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele vorsichtig aus den Glasplatten genommen, das Sammelgel abgetrennt und verworfen, und auf die zuvor für 5 Sekunden in Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Dies wurde zwischen zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman Papiere und dann wiederum zwei getränkte Schwämme gebettet. Dieser Komplex wurde anschließend in die Halterung für den *Wet-Blot* geklemmt, wobei darauf zu achten war, dass die linke und rechte Seite des Gels auf der Membran markiert wurde und der Stromfluss so angelegt wurde, dass die Proteine vom Gel in Richtung Membran geblottet wurden. Die Halterungen wurden in die Kammer eingesetzt und bis zum Rand mit Transferpuffer gefüllt. Etwa 16 Stunden wurde über Nacht bei 40V und 200mA geblottet.

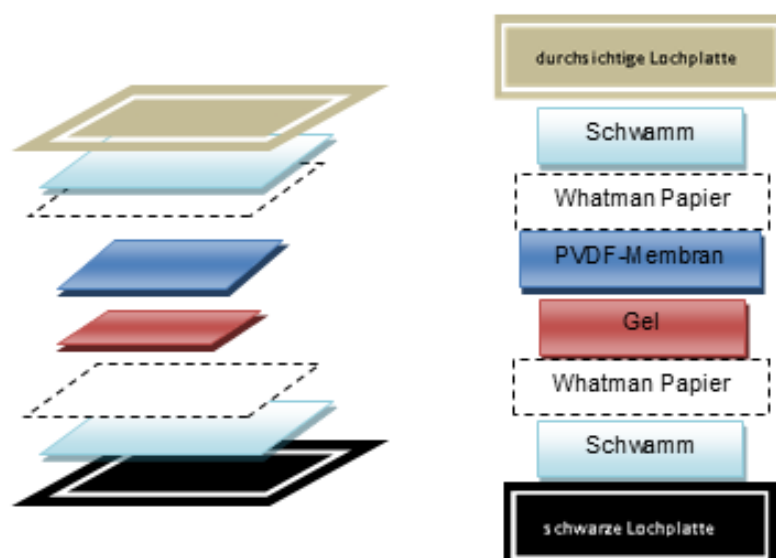


Abbildung 5 Vorbereitung der Blotting-Halterung

### 7.6.3.3 Immundetektion mittels Antikörper

Die Membran wurde nach der Entnahme aus der Blotting-Halterung zunächst für ca. 10 Minuten in 0,1% Tween gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in 0,1% Tween mit 5% Milch (aus 0,1% Tween und entfettetem Milchpulver) geblockt.

Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte nach horizontaler Durchtrennung der Membran anhand der sichtbaren Proteinmarker in die Teile, auf denen das jeweilige Protein zu erwarten war.

Der Primär-Antikörper wurde mit 0,1% Tween und 5% Milch verdünnt und die Membran darin bei 4°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag viermal für 10 bis 15 Minuten in 0,1% Tween gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper, ebenfalls verdünnt mit 0,1% Tween und 5% Milch, eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran im Schüttler gegeben (im Dunkeln). Hiernach erfolgte der letzte Waschschrift vor der Messung viermal für 10 bis 15 Minuten in 0,1% Tween.

Die Antikörper wurden wie folgt mit 5% Milch in 0,1% Tween verdünnt:

Primärantikörper:

- HIF-1 alpha            mouse-anti-human    Verdünnung 1:500
- PHD II                rabbit-anti-human    Verdünnung 1:1000
- Actin (I-19)-R        rabbit-anti-human    Verdünnung 1:1000

Sekundärantikörper:

- Goat-anti-rabbit HRP    Verdünnung 1:2000
- Goat-anti-mouse HRP    Verdünnung 1:2000
- Für den Goat-anti-mouse HRP wurde als Ersatz ein rekombinanter Anti-Mouse Antikörper verwendet: Verdünnung 1:1000

Für die Detektion der Chemilumineszenz musste nun noch Substrat für die an den Sekundärantikörper gebundenen Enzyme (Meerrettichperoxidase) gegeben werden. Dazu wurden die ECL-Reagenzien 1:1 gemischt (Reagenz A = Luminol-Lösung, Reagenz B = Peroxid-Lösung) und die gewaschene Membran mit dem Gemisch überschichtet. Direkt im Anschluss wurde im Li-Cor Western Blot Entwickler die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Ausgewertet wurden die Bilder in der freien Software von Li-Cor „Image Studio Lite Version 5.2“.

## 7.6.4 VEGF ELISA

Die Zellen wurden resuspendiert und von der Zellkulturplatte jeweils in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für etwa 3 bis 4 Minuten bei 13000rpm wurde der Überstand abpipettiert und bei -80°C eingefroren.

Der Versuch erfolgte nach den Instruktionen der Kits „Human VEGF DuoSet ELISA“ und „DuoSet Ancillary Reagent Kit 2“ von R&D Systems.

### *Vorbereitung der 96-Well-Platten (Coating)*

96-Well-Platten (Flachboden) wurden mit dem *Capture*-Antikörper über Nacht bei +20°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten 3x gewaschen, jeweils mit 300µl *Wash Buffer* (Waschpuffer) pro Well und anschließendem Verwerfen des Inhalts sowie gründlichem Ausklopfen der Platte auf Zellstoff.

Zum Blocken wurden 300µl *Reagent Diluent* pro Well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wiederum 3 Waschschrte mit je 300µl Waschpuffer pro Well.

### *Verdünnungsreihe des Standards*

Die Verdünnungsreihe des VEGF-Standards wurde mit *Reagent Diluent* verdünnt (Konzentrationen von 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 und 31,3pg/ml VEGF).

### *Beladen der Platte*

Die Proben wurden aufgetaut und abzentrifugiert.

Die Platte wurde mit je 100µl Volumen pro Well mit Proben und Standard in Dupletts sowie einer Leerprobe mit RPMI-Medium befüllt. Anschließend wurden die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert. Danach wurde der Inhalt verworfen. Es folgten wieder 3 Waschschrte mit je 300µl Waschpuffer pro Well.

### *Detection Antibody*

Der mit *Reagent Diluent* verdünnte *Detection Antibody* (100 ng/ml) wurde mit 100µl pro Well pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert.

### *Streptavidin-HRP*

Der Inhalt wurde verworfen und wiederum 3x mit je 300µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Zuletzt wurde in *Reagent Diluent* verdünnter Streptavidin-HRP in die

Wells pipettiert, 100µl pro Well. Dieser wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert.

### *Color Reagent*

Im Anschluss wurden die Platten wiederum 3x mit je 300µl Waschpuffer pro Well gewaschen, 100µl pro Well Substrat-Lösung (1:1 aus Color Reagent A + Color Reagent B) pipettiert und bei Raumtemperatur für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert.

### *Stop Solution und Messung*

Direkt im Anschluss wurde ohne Verwerfen des Inhalts 50µl pro Well *Stop Solution* hinzupipettiert, um die Reaktion zu stoppen, vorsichtig auf dem Plattenschüttler gemischt und direkt anschließend gemessen.

Die 96-Well-Platten wurden bei 450nm und 550nm gemessen und die Differenz als Ergebnis ausgewertet, um optische Fehler durch die Platte auszugleichen.

Die Werte der Verdünnungsreihe des Standards wurden zur Erstellung einer Standard-Kurve herangezogen<sup>[73]</sup>. Anmerkung: Als Nullwert wurde 0 gesetzt, um den Graphen im Nullpunkt beginnen zu lassen.

## **7.7 Arbeiten mit DNA/RNA**

Bei der quantitativen PCR (*Polymerase Chain Reaction*) mit SYBR Green I handelt es sich um eine DNA-Amplifikationsmethode, bei der anhand der Fluoreszenzstärke dieses Cyanin-Farbstoffes (SYBR Green I) auf die DNA-Menge in der Probe geschlossen werden kann. SYBR Green I bindet an die DNA oder RNA und absorbiert blaues Licht bei 494 nm Wellenlänge, emittiert dann grünes Licht der Wellenlänge 521 nm. Bei Bindung von Einzelsträngen wird nur schwach Licht emittiert, bei der Bindung an Doppelstränge wird deutlich Licht emittiert.

### **7.7.1 Probengewinnung**

Die inkubierten Zellkulturen wurden resuspendiert und von der Zellkulturplatte jeweils in ein 15ml-Spitzbodenröhrchen überführt. Nach der Zugabe von ca. 5 ml 4°C kaltem PBS wurden die Zellen bei 4°C und 310g 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Zellpellet resuspendiert und in ein 1,5ml-Eppendorf-Gefäß

überführt, das 15ml-Spitzbodenröhrchen wurde mit etwa 1ml PBS nochmals gespült und auch diese Spülflüssigkeit in das Eppendorf-Gefäß gegeben, um größere Zellverluste zu vermeiden. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge für 3-4 Minuten bei 13000rpm wurde der Überstand abpipettiert und die Zellpellets bei -80°C eingefroren.

### *RNA-Extraktion*

Generell wurden alle Proben und Reagenzien mit Ausnahme von Enzymen nach dem Auftauen gevortext und anschließend kurz abzentrifugiert. Enzyme wurden in ihren Gefäßen kurz angeschnipst.

Nach Auftauen der Proben wurde die RNA mithilfe des RNA-Extraktions-Kits „NucleoSpin® RNA“ von Macherey-Nagel gewonnen. Die Arbeitsschritte erfolgten nach Anleitung des Kits mit einer Ausnahme: Der letzte Waschschrift der Säule wurde mit nur 20µl HPLC H<sub>2</sub>O durchgeführt und nicht mit 60µl, um eine höhere RNA-Konzentration zu erhalten. Nach 1 Minute Zentrifugation bei 13g wurden die 20µl Elution ein zweites Mal auf die Säule zum gründlichen Auswaschen gegeben und wiederum 1 Minute bei 13g zentrifugiert.

Da zügig gearbeitet wurde, konnte auf die Zugabe von β-Mercaptoethanol verzichtet werden entsprechend dem Herstellerprotokoll.

Die exakte RNA-Menge wurde anschließend mittels Mikrovolumen-Spektralphotometer (NanoDrop™) gemessen.

### 7.7.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

In 500µl-Eppendorfgefäße wurde die jeweils errechnete Menge RNA pipettiert und mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 11,5µl Volumen aufgefüllt. Aus den gemessenen Werten der RNA-Konzentration mit dem NanoDrop™ (in ng/µl) habe ich in meinem Fall 300ng RNA in 20µl Volumen eingesetzt.

Hierzu wurden jeweils 1µl *Random Hexamer-Primers* hinzu pipettiert und kurz abzentrifugiert. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend in den Cycler eingesetzt und 5 Minuten auf 65°C erhitzt zur RNA-Denaturierung. Danach wurden die Proben auf 4°C gekühlt.

In jedes Eppendorf-Gefäß wurden 7,5µl *MasterMix* für die cDNA-Synthese pipettiert, bestehend aus 4µl 5-fach RT-Puffer, 0,5µl Ribolock RNase Inhibitor, 2µl dNTPs (10mM jeweils) und 1µl Reverse Transkriptase. Nach Resuspension wurden die Eppendorf-Gefäße wieder in den Cyclor gesetzt und für 5 Minuten bei 25°C inkubiert, für 60 Minuten bei 42°C zur Transkription inkubiert und zuletzt für 5 Minuten auf 70°C die Transkriptase inaktiviert. Anschließend wurden die Proben wieder auf 4°C abgekühlt. Die rechnerische Endkonzentration der cDNA betrug 50ng/µl. Die so gewonnenen cDNA-Proben konnten bei -20°C gelagert werden.

### 7.7.3 Primer Testung

Die Testung der später verwendeten Primerpaare von BioRad wurde anhand von cDNA von THP1-Zellen (Monozyten) des Labors AG Schneidawind im Vergleich zu einem von Hilde Keppeler designtem und erfolgreich genutztem HIF-1α-Primerpaar (forward/backward Primer) vorgenommen.

Zunächst wurde eine 1:5-Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt, indem in 4 Eppendorf-Gefäße je 20µl HPLC-H<sub>2</sub>O vorgelegt wurden. Aus der unverdünnten Ursprungsprobe cDNA wurden 5µl in das zweite Gefäß pipettiert, resuspendiert und davon wiederum 5µl in das nächste Gefäß pipettiert. So erhielt man am Ende 5 Gefäße mit den relativen Verdünnungen 100%, 20%, 4%, 0,8% und 0,16%.

Für jedes Primerpaar wurde ein *MasterMix* vorbereitet, der sich pro Well aus 10µl 2-fach *MasterMix* SYBR, 1µl Primermix und 7µl HPLC-H<sub>2</sub>O zusammensetzte. Je 18µl dieses Mastermixes wurden in jedes Well der 96-Well-Platte pipettiert und anschließend 2µl cDNA an den Rand des Wells unter Sichtkontrolle hinzu pipettiert. In diesem Fall entsprachen die Proben den 5 Verdünnungen der cDNA-Probe und einer *no template control* (NTC), die aus 2µl HPLC-H<sub>2</sub>O bestand. Es wurden hier und auch in den weiteren Versuchen Doppelbestimmungen (Dupletts) gemacht, das heißt je 2 Wells mit derselben Probe befüllt.

Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt und kurz bis 2500rpm abzentrifugiert.

Die Platte wurde in den Light Cyclor ® 480 eingegeben und das Programm für die qPCR mit SYBR-Green gestartet. Die Entwicklung der DNA-Fragmente war in den Schmelzkurven sichtbar, die C<sub>T</sub>-Werte wurden mit der LightCyclor®480 Software

release 1.5.1 ausgewertet und bestätigte eine suffiziente Amplifikation mit den gekauften Primerpaaren von BioRad, vergleichbar mit den Ergebnissen des Primerpaars, das in der AG Schneidawind eingesetzt wurde.

#### 7.7.4 Quantitative Real-Time PCR

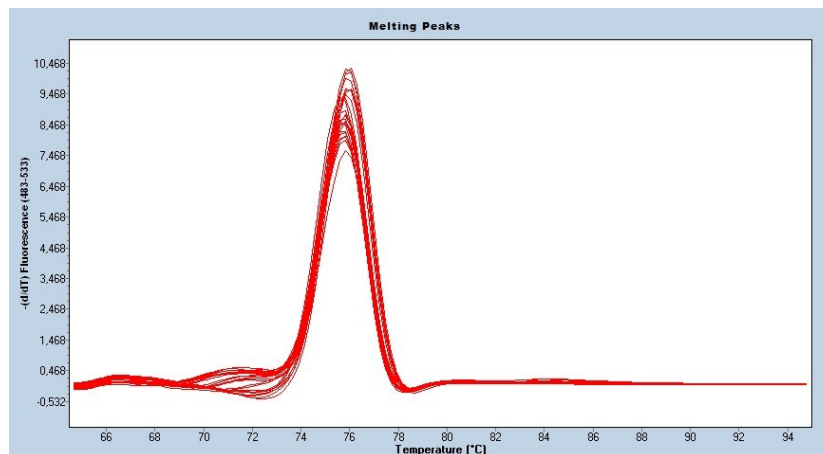
Die Proben wurden aufgetaut und mit 20µl HPLC-H<sub>2</sub>O verdünnt, da die angefallenen Produkte aus der cDNA-Synthese die PCR inhibieren können und durch die 1:1-Verdünnung dieser Effekt minimiert werden kann. Somit lagen nun 40µl cDNA-Probenvolumen mit einer rechnerischen cDNA-Konzentration von 25ng cDNA pro µl Probe vor.

Für jedes zu amplifizierende Gen wurden die Reagenzien samt den entsprechenden Primern (10µl 2-fach SYBR-*MasterMix*, 1µl PrimerMix und 5µl HPLC-H<sub>2</sub>O pro Well) angesetzt und in der 96-Well-Platte vorgelegt. In jedes Well wurden 4µl Probenvolumen bzw. HPLC-H<sub>2</sub>O für die Leerprobe (*no template control*, NTC) gegeben. Es wurden Dupletts gemessen, das heißt jede Probe und auch die Leerprobe wurden zweimal aufgetragen. Es wurden Primer für die Gene HIF-1α, RPL37A und EGLN1 (Protein des Gens ist PHDII) eingesetzt.

Die Platte wurde nach dem Pipettieren mit einer Folie versiegelt, kurz bis 2500rpm abzentrifugiert und in den Light Cycler®480 gegeben. Das Programm für den SYBR-Green MasterMix bestand aus 10 Minuten Präinkubation bei 95°C und 45 Zyklen für die Amplifizierung bestehend aus 14 Sekunden 95°C zur Denaturierung der cDNA-Moleküle und 1 Minute 60°C für die Anlagerung der Primer und Amplifizierung der Genabschnitte. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und nach den 45 Zyklen eine Schmelzkurve erstellt, indem zunächst 1 Sekunde die Moleküle bei 95°C wieder denaturiert wurden und dann von 65°C kontinuierlich (0,06°C pro Sekunde) bis 95°C erhitzt wurden, wobei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Am Ende der Schmelzkurvenerstellung wurde auf 37°C abgekühlt.

#### 7.7.5 Auswertung

Anhand der Schmelzkurve konnte beurteilt werden, ob ein PCR-Produkt amplifiziert worden war oder ob die Probe verunreinigt war.



**Abbildung 6 HIF-1 $\alpha$ -Schmelzkurve einer Probe nach erfolgreicher quantitativer PCR**

Erfolgreiche Amplifikation der HIF-1 $\alpha$ -cDNA in der Schmelzkurve einer Probe. Es sind keine anderen Peaks zu sehen, die auf ein weiteres Amplifikationsprodukt hinweisen würden.

Die gemessenen Fluoreszenzen am Ende eines jeden Zyklus gaben Rückschluss auf die Menge des PCR-Produkts. Die Zykluszahl, in der die Fluoreszenz den Schwellenwert des Hintergrundrauschens überschreitet, ist mit Vernachlässigung von Störfaktoren umso kleiner, je mehr Ausgangs-cDNA des zu amplifizierenden Gens zu Beginn in der Probe vorhanden war. Diese Zykluszahl wird als *Threshold Cycle* ( $C_T$  oder  $C_P$ ) bezeichnet. Dies bedeutet, dass die Zykluszahl des Überschreitens der Fluoreszenzschwelle Aufschluss über die Menge des Ausgangsprodukts gibt.

Zur relativen Quantifizierung des Zielgens wurde der  $C_T$  des Zielgens in Relation zum  $C_T$  des *Housekeeping Genes* gesetzt (jeweils die Mittelwerte der Dupletts). Als *Housekeeping Gene* wurde von mir das RPL37A-Gen herangezogen, das von Maess et. al in humanen Monozyten als geeignetes Housekeeping Gene verwendet wurde<sup>[74]</sup>. Diese Methode ist bekannt als  $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

## 7.8 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Bilddaten des Western Blots wurde das Programm „ImageJ“ verwendet. Zur Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten wurden die Programme „CellQuestPro“ und „FlowJo“ verwendet. Zur Auswertung der Daten von ELISA und qPCR wurde mit Excel® für Microsoft 365 gerechnet.

Die statistischen Tests und Erstellung von Grafiken erfolgte mit der Software „GraphPadPrism“. P-Werte  $<0,05$  galten hierbei als statistisch signifikant (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Während des primären Datencleanings wurde basierend auf dem ROUT-Test (mit  $Q=1\%$ ) auf Ausreißer (*Outlayer*) getestet und entsprechend entfernt. Auf Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet.

Um zwei nicht-gepaarte Gruppen mit normalverteilten Werten miteinander zu vergleichen, wurde der (unpaired) t-Test angewandt, mit nicht normal verteilten Werten der Mann-Whitney Test. Um zwei gepaarte Gruppen mit normalverteilten Werten miteinander zu vergleichen, wurde der (paired) t-Test angewandt, mit nicht normal verteilten Werten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen, wurde für normal verteilte Daten die gewöhnliche One-way ANOVA herangezogen zusammen mit Tukey's multiple comparison Test, für nicht normal verteilte Daten der Kruskal-Wallis Test zusammen mit Dunn's multiple comparison Test.

Im Weiteren sind Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen angegeben, falls nicht anders bezeichnet, auch für nicht normal verteilte Daten ohne Berücksichtigung einer eventuell schiefen Verteilung.

## 8 Ergebnisse

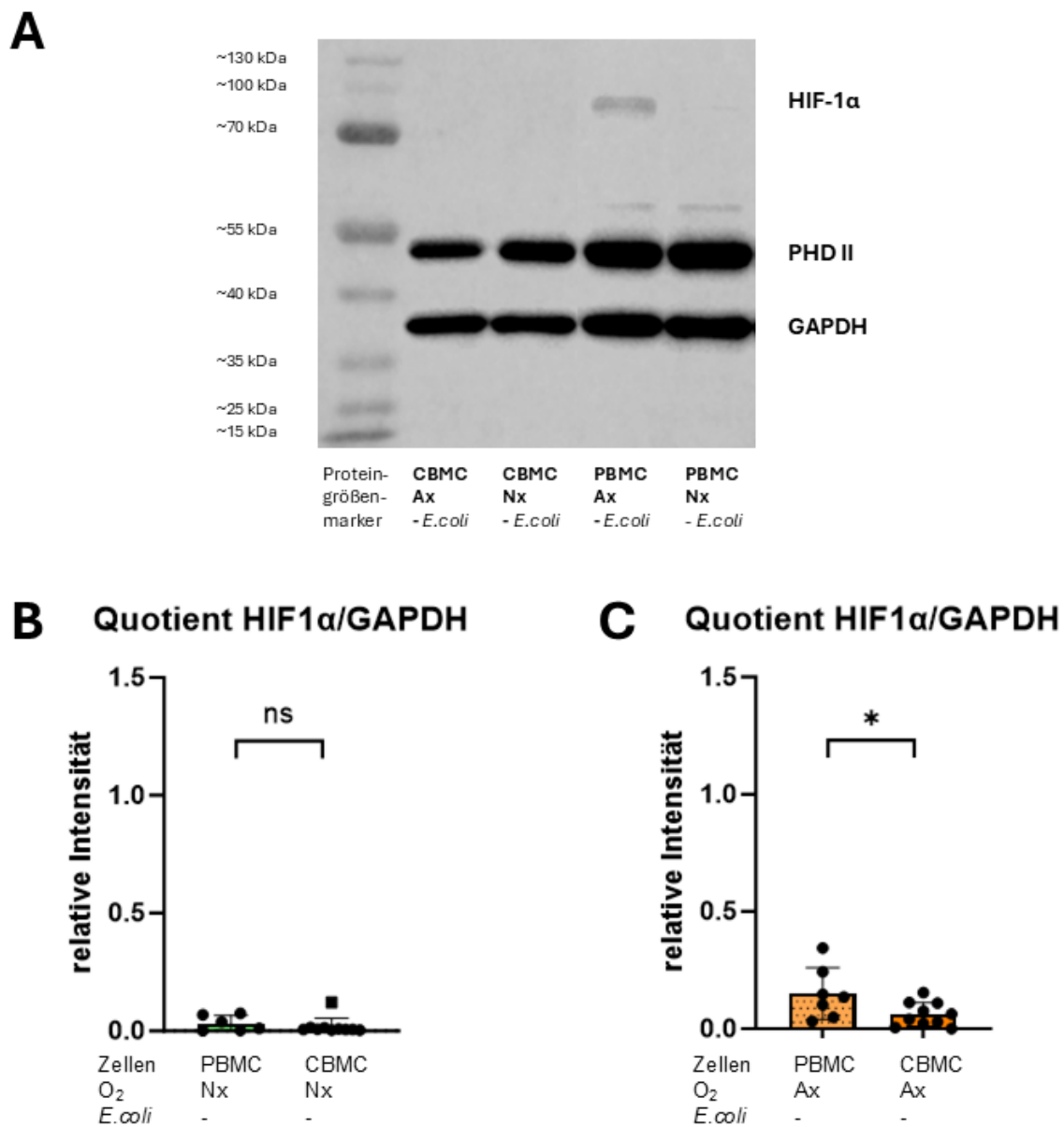
Teile der im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden mit geteilter Erstautorenschaft unter dem Geburtsnamen Schlegel im Juli 2022 online veröffentlicht: „Decreased expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in cord blood monocytes under anoxia“, Christiane Schlegel, Kai Liu, Bärbel Spring, Stefanie Dietz, Christian F. Poets, Hannes Hudalla, Trim Lajqi, Natascha Köstlin-Gille and Christian Gille.

### 8.1 Versuche mit Mononukleären Zellen

Die Versuche wurden zunächst sämtlich an via Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten mononukleären Zellen vorgenommen.

#### 8.1.1 HIF-1 $\alpha$ -Protein akkumulierte unter Anoxie geringer in CBMC als in PBMC

Zu Beginn wollten wir die HIF-1 $\alpha$ -Proteinakkumulation von CBMC und PBMC unter Normoxie und Anoxie betrachten. In Normoxie konnte sowohl in CBMC als auch in PBMC eine kaum nachweisbare Menge an HIF-1 $\alpha$  detektiert werden (0,019 +/- 0,036 vs. 0,032 +/- 0,033 relative Intensitäten, n=6-10, p=0,7128, Abbildung 7 B). Der Proteinnachweis von HIF-1 $\alpha$  im Western Blot gelang wie erwartet unter Anoxie. In CBMC konnte nach vierstündiger Anoxie deutlich weniger HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen werden als in PBMC (0,06 +/- 0,05 vs. 0,15 +/- 0,11 relative Intensitäten, n=7-10, p=0,0399, Abbildung 7C).



**Abbildung 7 HIF-1α-Menge in neonatalen mononukleären Zellen in Anoxie signifikant geringer als in adulten mononukleären Zellen**

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC bzw. PBMC unter Normoxie bzw. Anoxie wurden die Proteine isoliert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran über Nacht geblottet. Die Proteine HIF-1α und GAPDH wurden mit Antikörper gebundenen HRP-Enzymen und Substrat sichtbar gemacht und die relativen Intensitäten der Chemilumineszenz digital ausgewertet. **A** beispielhafter Western Blot, **B** in Normoxie jeweils wenig HIF-1α (n=6-9, nicht normalverteilt, Mann-Whitney-Test, p=0,71), **C** in Anoxie signifikant geringere Akkumulation von HIF-1α in CBMC als in PBMC (n=7-10, normalverteilt; t-Test, ungepaart; \*p<0,05).

### 8.1.2 HIF-1 $\alpha$ -Protein akkumulierte unter Normoxie mit *E.coli*-Infektion weniger in CBMC als in PBMC

Als weitere Stimulanz für die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation wandten wir die Infektion mit *E.coli* an. Auch hier konnten wir eine deutlich geringere HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation nach vierstündiger Infektion in CBMC feststellen als in PBMC (0,03 +/- 0,01 vs. 0,19 +/- 0,14 relative Intensitäten, n=9-10, p=0,0435, Abbildung 8 B).

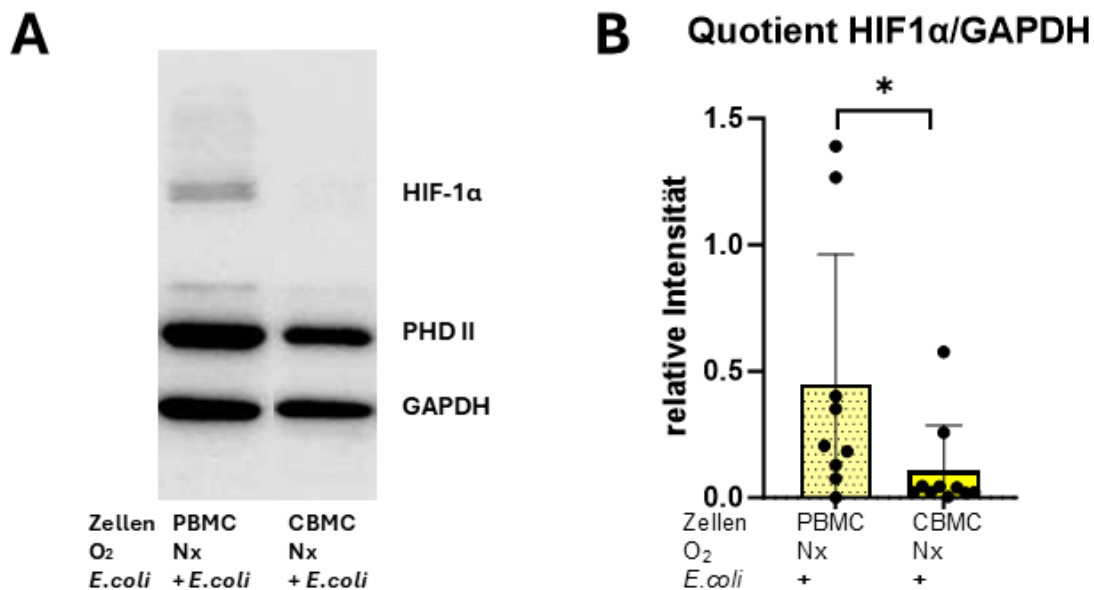


Abbildung 8 HIF-1 $\alpha$ -Menge nahm in neonatalen mononukleären Zellen unter Normoxie mit *E.coli*-Infektion nicht zu im Gegensatz zu adulten mononukleären Zellen

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC bzw. PBMC unter Normoxie mit *E.coli* wurden die Proteine isoliert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran über Nacht geblottet. Die Proteine HIF-1 $\alpha$  und GAPDH wurden mit Antikörper gebundenen HRP-Enzymen und Substrat sichtbar gemacht und die relativen Intensitäten der Chemilumineszenz digital ausgewertet. **A** beispielhafter Western Blot, **B** in Normoxie mit Infektion durch *E.coli* höhere Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  in PBMC als in CBMC. n=9-10; nicht normalverteilt; t-Test, Mann-Whitney-Test; \*p<0,05.

### 8.1.3 Die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression blieb in CBMC und in PBMC unter Anoxie unverändert

Im nächsten Schritt eruierten wir, ob die verminderte HIF-1 $\alpha$  Akkumulation in CBMC mit einer Regulation auf transkriptioneller Ebene zusammenhing. Dafür wurden CBMC und PBMC 22 Stunden im jeweiligen Milieu kultiviert. Die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge von CBMC vs. PBMC war in Normoxie signifikant vermindert (0,34 +/- 0,16 vs. 1,0 +/- 0,42 -fache Expression, n=8-10, p=0,004, Abbildung 9), in Anoxie ebenfalls vermindert, aber nicht signifikant (0,48 +/- 0,24 vs. 1,02 +/- 1,00 -fache Expression, n=9-10, p=0,926, Abbildung 9). Jedoch nahm die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge unter Anoxie im

Vergleich zur Normoxie sowohl in CBMC (0,48 +/- 0,24 vs. 0,34 +/- 0,16 -fache Expression, n=8-9, p>0,999, Abbildung 9) als auch in PBMC (1,02 +/- 1,00 vs. 1,00 +/- 0,42 -fache Expression, n=10, p>0,999, Abbildung 9) nicht zu.

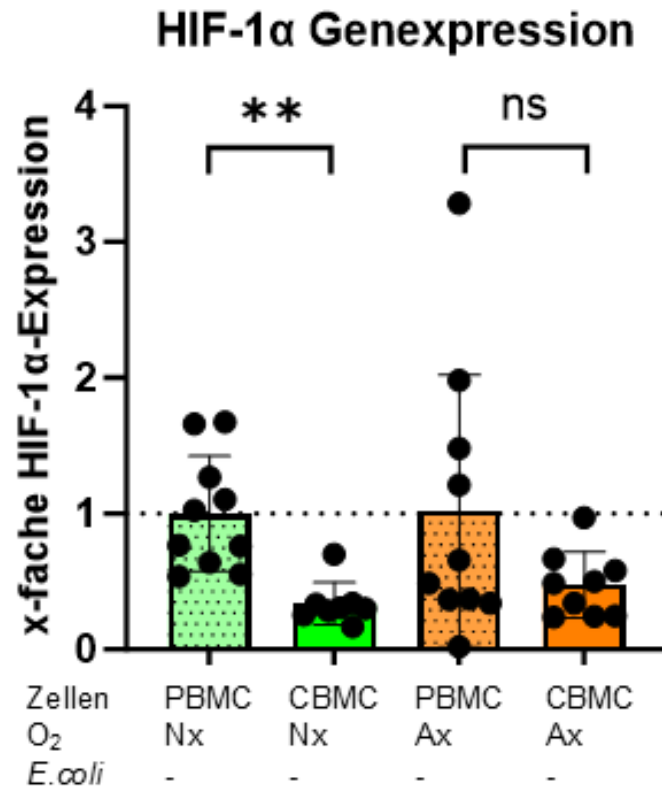


Abbildung 9 Relative HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge nahm nach 22-stündiger Anoxie sowohl in neonatalen als auch in adulten mononukleären Zellen nicht zu

CBMC und PBMC wurden nach 22-stündiger Kultur in Normoxie bzw. Anoxie mittels quantitativer PCR analysiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet. Die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Mengen wurden nach reverser Transkription zu cDNA im Verhältnis zu den RPL37A-cDNA-Mengen berechnet und die Werte ins Verhältnis zu den Werten in PBMC Normoxie (= einfache Menge) gesetzt. (n=8-10; nicht normal verteilt; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison Test; \*\*p<0,01).

#### 8.1.4 Die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression war unter Normoxie mit *E. coli*-Infektion in CBMC nicht erhöht im Gegensatz zu PBMC

Nachdem die Infektion mit *E. coli* auf Proteinebene zu einer starken HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation führte, interessierte uns nun, ob die Infektion mit *E. coli* auf mRNA-Ebene eine vermehrte Genexpression induzieren würde. Die mRNA-Menge stieg nach 22 Stunden mit *E. coli*-Infektion vs. Kontrolle ohne Infektion in PBMC (1,60 +/- 0,84 vs. 1,00 +/- 0,42 -fache Expression, n=10, p>0,999, Abbildung 10) und CBMC (0,84 +/- 0,14 vs. 0,34 +/- 0,16 -fache Expression, n=8-10, p=0,23, Abbildung 10) leicht an. Nach 48 Stunden Infektion war die mRNA-Expression bei PBMC jedoch signifikant erhöht verglichen mit der Kontrolle nach 48 Stunden (3,40 +/- 2,02 vs. 0,40 +/- 0,15 -fache

Expression,  $n=4-7$ ,  $p=0,0171$ , Abbildung 10), jedoch nicht bei CBMC ( $0,79 \pm 0,44$  vs.  $0,31 \pm 0,17$  -fache Expression,  $n=4-8$ ,  $p>0,999$ , Abbildung 10).

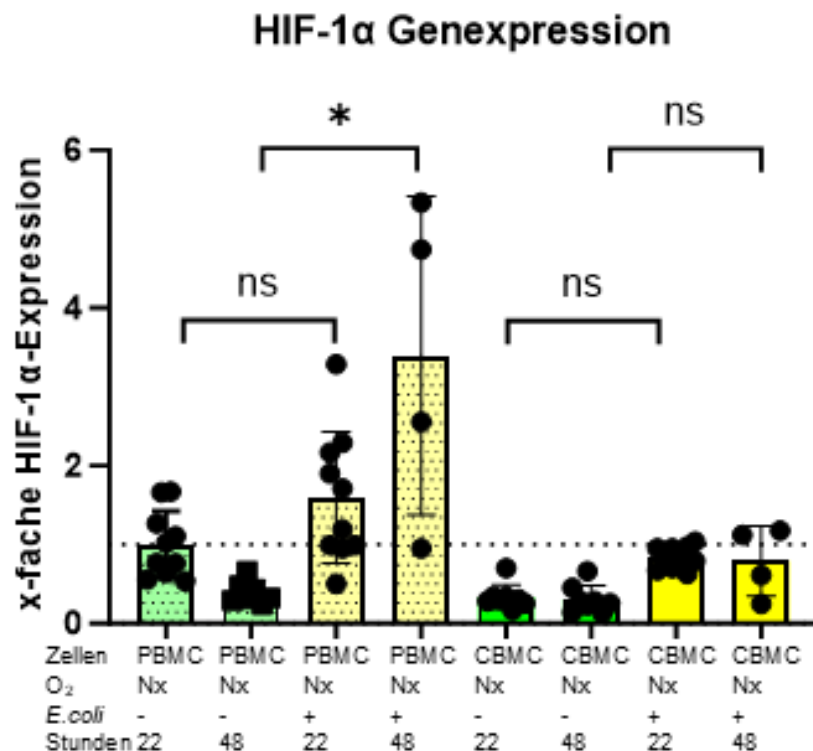


Abbildung 10 Relative HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge nahm unter Infektion mit *E.coli* in adulten mononukleären Zellen zu, kaum jedoch in neonatalen

CBMC und PBMC wurden nach 22-stündiger bzw. 48-stündiger Kultur in Normoxie ohne und mit *E.coli*-Infektion mittels quantitativer PCR analysiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet. Die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Mengen wurden nach reverser Transkription zu cDNA im Verhältnis zu den RPL37A-cDNA-Mengen berechnet und die Werte ins Verhältnis zu den Werten in PBMC Normoxie nach 22 Stunden (= einfache Menge) gesetzt. ( $n=4-10$ ; nicht normal verteilt; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison Test;  $*p<0,05$ ).

### 8.1.5 Die PHDII-Proteinmenge war unter Anoxie sowie unter Normoxie mit *E.coli*-Infektion in CBMC und in PBMC unverändert

Als nächstes überprüften wir die Hypothese, ob die verminderte HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in CBMC durch einen vermehrten Abbau durch Prolylhydroxylasen bedingt sein könnte. Die Menge an Prolylhydroxylase II-Protein unter Anoxie in PBMC war im Vergleich zur Kultur in Normoxie ( $1,17 \pm 0,59$  vs.  $1,21 \pm 0,86$  relative Intensitäten,  $n=7$ ,  $p>0,999$ , Abbildung 11 B) und nach Infektion mit *E.coli* in Normoxie im Vergleich zur Kultur ohne Infektion in Normoxie ( $1,10 \pm 0,61$  vs.  $1,21 \pm 0,86$  relative Intensitäten,  $n=7-8$ ,  $p>0,999$ , Abbildung 11 B) nicht unterschiedlich. Auch in CBMC

hatte die Kultur in Anoxie im Vergleich zur Normoxie (1,22 +/- 0,90 vs. 0,87 +/- 0,50 relative Intensitäten, n=9-10, p>0,999, Abbildung 11 B) und die Infektion mit *E.coli* in Normoxie im Vergleich zur Kultur ohne Infektion in Normoxie (0,83 +/- 0,30 vs. 0,87 +/- 0,50 relative Intensitäten, n=9, p>0,999, Abbildung 11 B) keine Auswirkung.

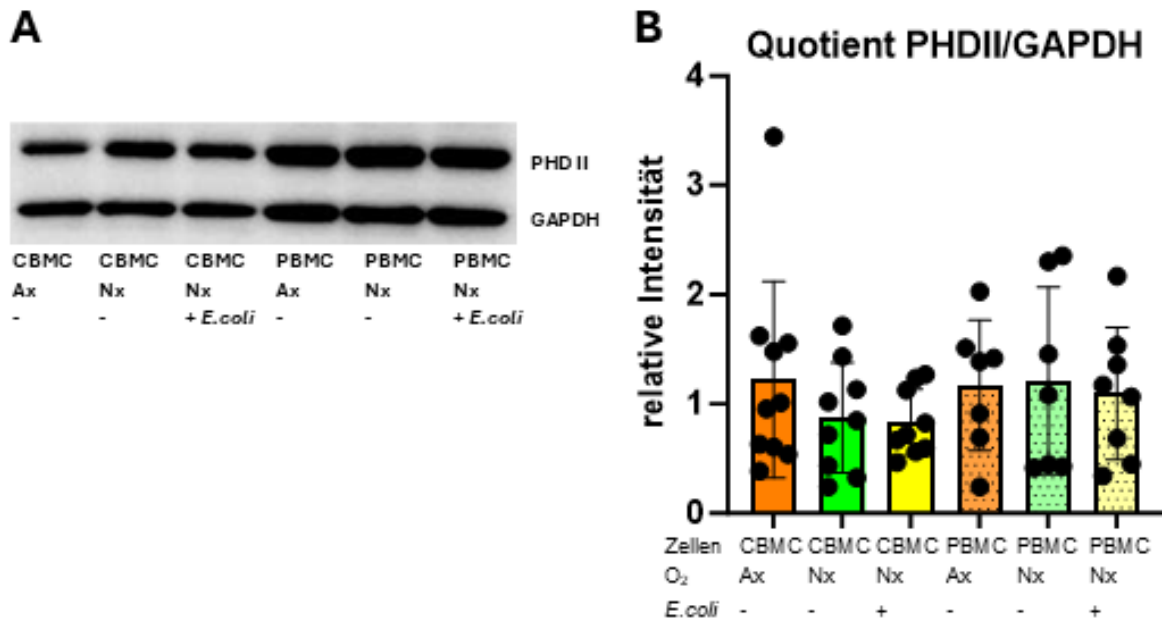


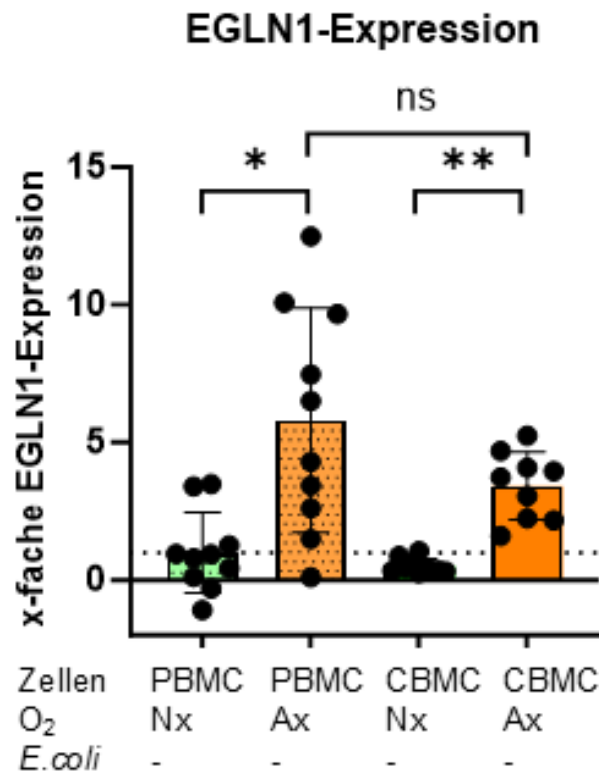
Abbildung 11 PHDII-Proteinmenge veränderte sich in mononukleären Zellen unter Anoxie und unter Normoxie mit *E.coli*-Infektion weder in CBMC noch in PBMC

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC bzw. PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion bzw. Anoxie wurden die Proteine isoliert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran über Nacht geblottet. Die Proteine PHDII und GAPDH wurden mit Antikörper gebundenen HRP-Enzymen und Substrat sichtbar gemacht und die relativen Intensitäten der Chemilumineszenz digital ausgewertet. **A** beispielhafter Western Blot, **B** beinahe unveränderte PHDII-Mengen in CBMC und PBMC unter Normoxie, Normoxie mit Infektion und unter Anoxie, keinerlei Signifikanz. (n=7-10; nicht normalverteilt; Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison Test; \*p<0,05).

### 8.1.6 PHDII-Genexpression war unter Anoxie höher als in Normoxie in CBMC wie in PBMC

Um zu evaluieren, ob auch die mRNA-Menge von PHDII (Gen: EGLN1) sich unter anoxischen Bedingungen ebenso wie die PHDII-Proteinmenge kaum verändern würde, führten wir eine qPCR-Analyse nach 22 Stunden normoxischer bzw. anoxischer Inkubation der CBMC bzw. PBMC durch. Die EGLN1-mRNA-Menge war unter Anoxie in CBMC im Vergleich zur Normoxie (3,42 +/- 1,23 vs. 0,51 +/- 0,27-fache Expression, n=9-10, p=0,006, Abbildung 12) und in PBMC (5,81 +/- 4,08 vs. 1,0 +/- 1,46 -fache Expression, n=10, p=0,015, Abbildung 12) erhöht. Die EGLN1-mRNA-

Menge war unter Anoxie in CBMC vs. PBMC nicht signifikant verschieden ( $3,42 \pm 1,23$  vs.  $5,81 \pm 4,08$  -fache Expression,  $n=9-10$ ,  $p>0,999$ , Abbildung 12).



**Abbildung 12** Relative EGLN1-mRNA-Menge nahm unter Anoxie in adulten und neonatalen mononukleären Zellen zu

CBMC und PBMC wurden nach 22-stündiger Inkubation in Normoxie bzw. Anoxie mittels quantitativer PCR analysiert und mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet. Die EGLN1-mRNA-Mengen wurden nach reverser Transkription zu cDNA im Verhältnis zu den RPL37A-cDNA-Mengen berechnet und die Werte ins Verhältnis zu den Werten in PBMC Normoxie (= einfache Menge) gesetzt. ( $n=9-10$ ; nicht normal verteilt; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ )

### 8.1.7 In CBMC kam es unter Infektion mit *E.coli* zu einer geringeren Zunahme nicht-klassischer Monozyten verglichen mit PBMC

Anhand der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16 wurden die Monozyten, wie die Gating-Strategie in Abbildung 13 zeigt, in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten eingeteilt. Nach Infektion mit *E.coli* war der prozentuale Anteil nicht-klassischer Monozyten in PBMC im Vergleich zur Normoxie ohne Infektion deutlich erhöht ( $45,9 \pm 22,22$  vs.  $5,0 \pm 4,59$  %,  $n=9-10$ ,  $p=0,0002$ , Abbildung 14). Auch in Anoxie erhöhte sich der Anteil nicht-klassischer Monozyten unter Infektion mit *E.coli* bei PBMC signifikant ( $47,67 \pm 23,94$  vs.  $9,39 \pm 8,04$  %,  $n=9-10$ ,  $p=0,018$ , Abbildung 14). CBMC zeigten einen geringeren Anstieg des Anteils nicht-klassischer Monozyten unter Infektion mit *E.coli*, in Normoxie im Vergleich zur Normoxie ohne

Infektion (27,53 +/- 19,19 vs. 9,06 +/- 6,19 %, n=10-12, p=0,67, Abbildung 14) und unter Infektion mit *E.coli*, in Anoxie im Vergleich zur Anoxie ohne Infektion (34,19 +/- 18,5 vs. 9,76 +/- 5,97 %, n=10-12, p= 0,16, Abbildung 14).

Der Anteil klassischer Monozyten unterschied sich nicht signifikant, wobei in CBMC die Anteile klassischer Monozyten unter Infektion mit *E.coli* prozentual relativ anstiegen im Vergleich zur Normoxie ohne Infektion (Abbildung 14,

Tabelle 14). Die Mittelwerte der Anteile intermediärer Monozyten nahmen unter Infektion mit *E.coli* ab. Hierbei ergab sich kein Unterschied zwischen Normoxie und Anoxie sowie zwischen CBMC und PBMC (Abbildung 14,

Tabelle 14).

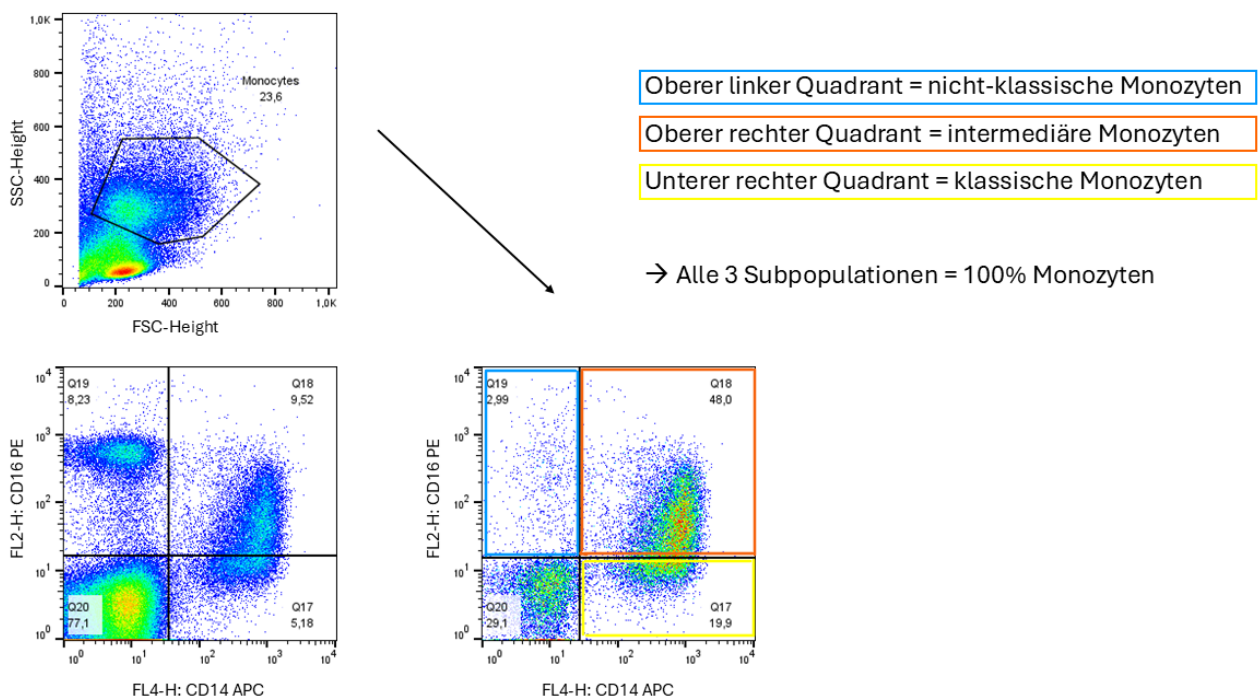


Abbildung 13 Gating-Strategie der Monozyten-Subpopulationen anhand der Oberflächenmoleküle CD14 und CD16

Tabelle 14 Statistik zu den Monozyten-Subpopulationen aus

		klassische Monozyten		intermediäre Monozyten		nicht-klassische Monozyten	
		p-Wert (bereinigt)	Signifikanz	p-Wert (bereinigt)	Signifikanz	p-Wert (bereinigt)	Signifikanz
CBMC Normoxie - <i>E.coli</i>	vs. CBMC Normoxie + <i>E.coli</i>	0,4768	ns	<0,0001	****	0,6717	ns
PBMC Normoxie - <i>E.coli</i>	vs. PBMC Normoxie + <i>E.coli</i>	>0,9999	ns	0,0001	***	0,0002	***
CBMC Anoxie - <i>E.coli</i>	vs. CBMC Anoxie + <i>E.coli</i>	0,0796	ns	<0,0001	****	0,1595	ns
PBMC Anoxie - <i>E.coli</i>	vs. PBMC Anoxie + <i>E.coli</i>	0,9926	ns	<0,0001	****	0,0183	*
CBMC Normoxie - <i>E.coli</i>	vs. CBMC Anoxie - <i>E.coli</i>	0,9899	ns	0,9704	ns	>0,9999	ns
PBMC Normoxie - <i>E.coli</i>	vs. PBMC Anoxie - <i>E.coli</i>	0,8765	ns	0,9271	ns	>0,9999	ns
CBMC Normoxie + <i>E.coli</i>	vs. CBMC Anoxie + <i>E.coli</i>	>0,9999	ns	0,9643	ns	>0,9999	ns
PBMC Normoxie + <i>E.coli</i>	vs. PBMC Anoxie + <i>E.coli</i>	>0,9999	ns	>0,9999	ns	>0,9999	ns
PBMC Normoxie - <i>E.coli</i>	vs. CBMC Normoxie - <i>E.coli</i>	0,9908	ns	0,9994	ns	>0,9999	ns
PBMC Anoxie - <i>E.coli</i>	vs. CBMC Anoxie - <i>E.coli</i>	>0,9999	ns	>0,9999	ns	>0,9999	ns
PBMC Normoxie + <i>E.coli</i>	vs. CBMC Normoxie + <i>E.coli</i>	0,8438	ns	0,9995	ns	>0,9999	ns
PBMC Anoxie + <i>E.coli</i>	vs. CBMC Anoxie + <i>E.coli</i>	0,6694	ns	0,9995	ns	>0,9999	ns

Nicht-klassische Monozyten n=9-12, nicht normal verteilt, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test; Intermediäre Monozyten n=9-12, normal verteilt, One-Way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test; Klassische Monozyten n=9-12, normal verteilt, One-Way-ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test

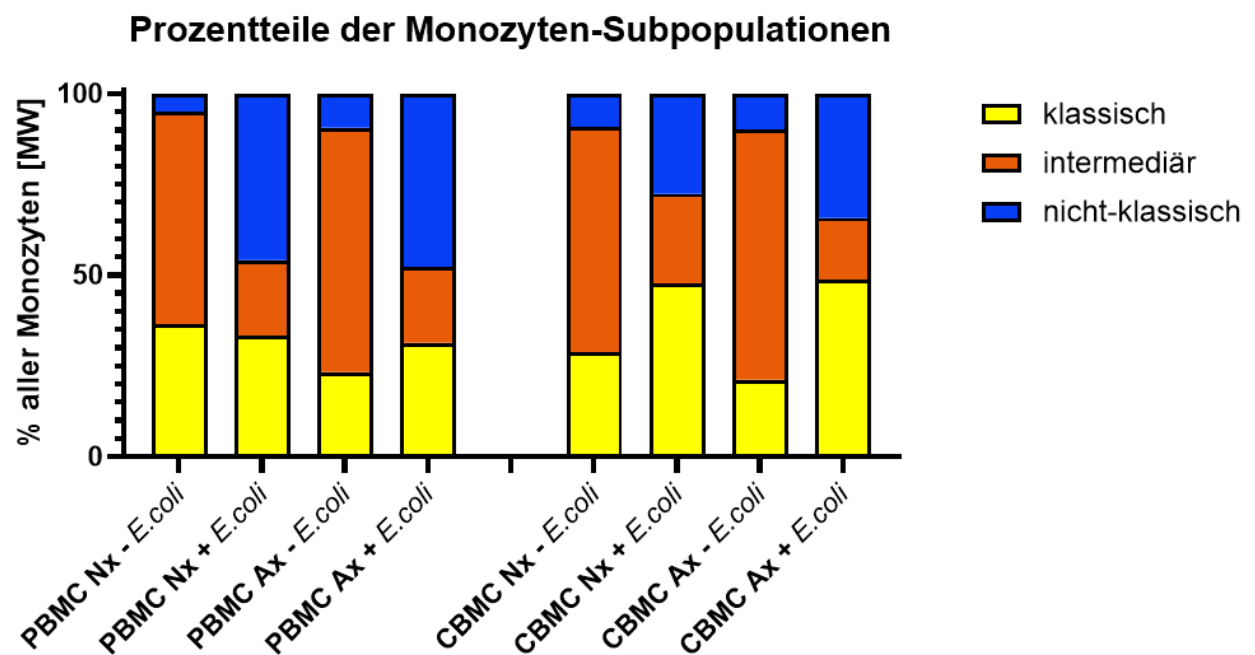


Abbildung 14 Prozentuale Anteile der drei Monozyten-Subpopulationen unter Normoxie und Anoxie sowie mit und ohne Infektion mit *E.coli*

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14- und CD16-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Nachdem die Monozyten im FSC-SSC-Fenster gated wurden, wurden klassische, nicht-klassische und intermediäre Subpopulationen anhand ihrer CD14- und CD16-Vorkommen zugeteilt und die prozentualen Anteile der drei Subpopulationen an allen Monozyten errechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte. (n=9-12; normal verteilt außer nicht-klassische Monozyten der CBMC Normoxie - *E.coli* und CBMC Anoxie - *E.coli*)

## 8.1.8 Funktionelle Auswirkungen von Anoxie und Infektion mit *E.coli* in CBMC und PBMC

Uns interessierte im Weiteren, welchen Einfluss der Sauerstoffpartialdruck sowie eine Infektion mit *E.coli* auf die Funktion neonataler und adulter Monozyten hat.

### 8.1.8.1 CD80/CD86 unter Infektion mit *E.coli* auf CBMC geringer exprimiert als auf PBMC

Die co-stimulatorischen/-inhibitorischen Moleküle CD80 und CD86 unter anderem auf Monozyten vermitteln im Zellkontakt mit einer T-Zelle zusammen mit dem TZR-Antigen/MHCII-Komplex entweder eine Aktivierung der T-Zelle zur Proliferation oder eine Inhibition der T-Zelle. Ihre Expression wurde auf CD14-positiven CBMC und PBMC durchflusszytometrisch ermittelt. Die entsprechende Gating-Strategie ist im Methodenteil dargestellt (Abbildung 3).

Die Expression von CD80 war ohne Infektion in CBMC und PBMC nicht unterschiedlich, sowohl in Normoxie (23,07 +/- 13,27 vs. 20,65 +/- 8,82 MFI, n= 10-15, p=0,94, Abbildung 15 A) als auch in Anoxie (15,26 +/- 8,16 vs. 17,48 +/- 9,78 MFI, n=12-15, p=0,53, Abbildung 15 C). Unter Infektion mit *E.coli* kam es in Normoxie in CBMC weniger als in PBMC zu einer Hochregulation von CD 80 (46,33 +/- 19,16 vs. 75,49 +/- 43,76 MFI, n=11-12, p=0,060, Abbildung 17 B), wenn auch nicht signifikant. In Anoxie war dieser Effekt noch stärker und erreichte das Signifikanzniveau (36,72 +/- 11,28 vs. 59,53 +/- 30,43 MFI, n=11-12, p=0,024, Abbildung 15 D).

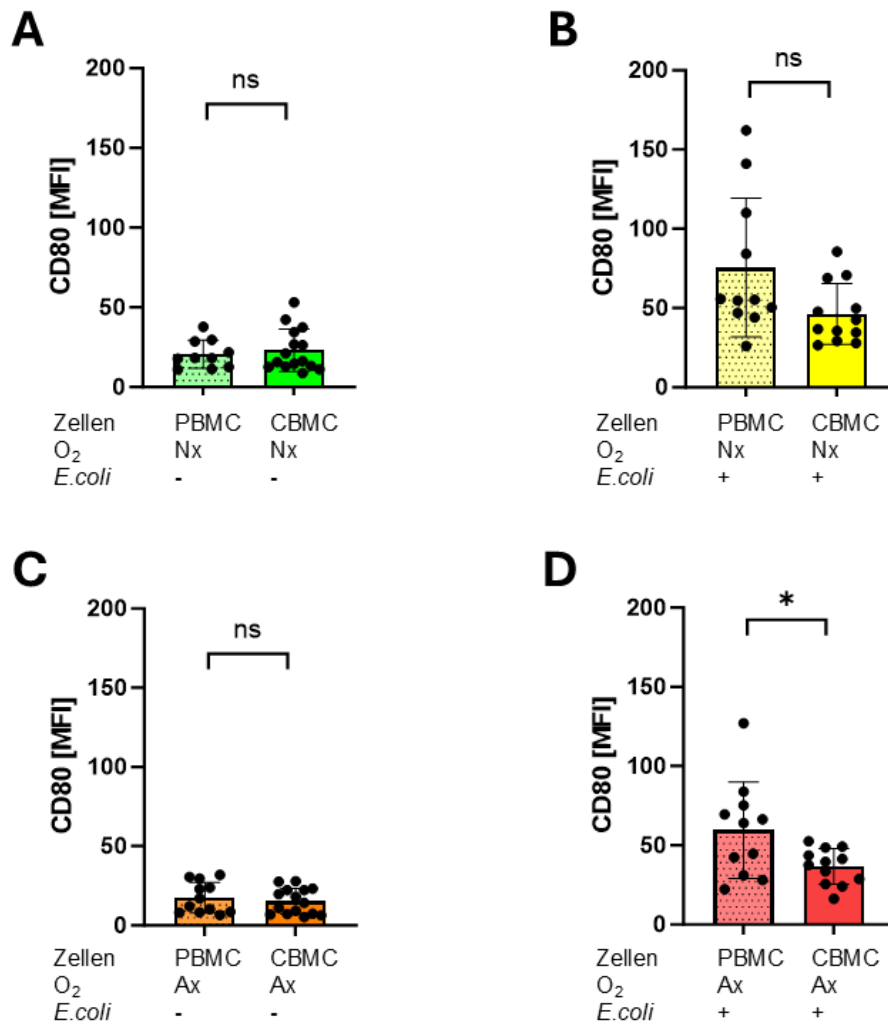
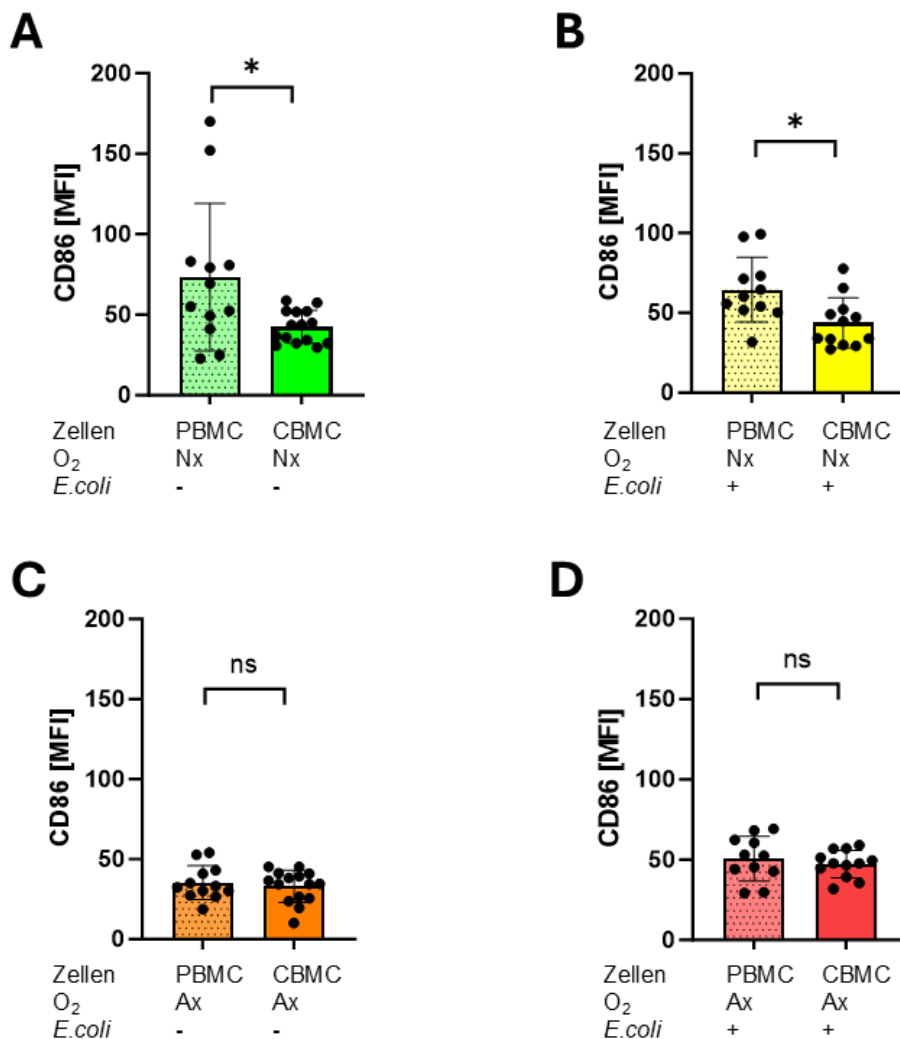


Abbildung 15 MFI CD80 auf CBMC unter *E.coli*-Infektion geringer als auf PBMC

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und CD80-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von CD80 auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E.coli*. (n=10-15; normalverteilt mit unpaired t-Test, nicht normal verteilt mit Mann-Whitney-Test, \* p<0,05)

CD86 wurde auf CD14-positiven Zellen aus CBMC in Normoxie signifikant geringer exprimiert als auf CD14-positiven Zellen aus PBMC (42,39 +/- 10,12 vs. 73,28 +/- 45,79 MFI, n=12-15, p=0,0355, Abbildung 16 A). Auch unter Infektion mit *E.coli* exprimierten CBMC weniger CD86 als PBMC (43,68 +/- 15,71 vs. 64,59 +/- 20,21 MFI, n=11-12, p=0,0111, Abbildung 16 B). In Anoxie hingegen war die Expression von CD86 auf CBMC vergleichbar zu PBMC (33,03 +/- 10,05 vs. 35,39 +/- 10,57 MFI, n=12-15, p=0,558, Abbildung 18 C), ebenso in Anoxie unter Infektion mit *E.coli* (47,28 +/-

8,50 vs. 50,68 +/- 13,89 MFI, n=11-12, p=0,482, Abbildung 18 D). Somit blieb die CD86-Expression auf CBMC quasi konstant.



**Abbildung 16** MFI CD86 auf CBMC in Normoxie und in Normoxie mit *E.coli* geringer als auf PBMC

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und CD86-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von CD86 auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E.coli*. (n=7-10; normalverteilt außer PBMC Normoxie; Mann-Whitney Test und unpaired t-Tests; \* p<0,05)

### 8.1.8.2 PD-L1 vergleichbar auf CBMC wie auf PBMC, PD-L2 in Anoxie geringer auf CBMC als auf PBMC exprimiert

Die Liganden PD-L1 und PD-L2 vermitteln über Bindung an PD-1 zeitgleich mit dem TZR-Antigen/MHCII-Komplex eine Inhibition von T-Zellen. Bildet PD-L1 mit CD80 einen Heterodimer kann eine Co-Stimulation für die T-Zelle mit CD28 erfolgen oder eine Co-Inhibition über eine abgeschwächte Bindung an CTLA-4.

Die PD-L1-Expression auf CD14-positiven Zellen war nach Infektion mit *E.coli* in CBMC wie in PBMC ähnlich hoch (325,2 +/- 272,7 vs. 405,3 +/- 363,7 MFI, n=14-15, p=0,780, Abbildung 17 B). In Normoxie ohne Infektion war die PD-L1-Expression in CBMC und PBMC ebenfalls vergleichbar (122,4 +/- 136,1 vs. 189,8 +/- 194,0 MFI, n=15-17, p=0,50, Abbildung 17 A) und insgesamt etwas geringer. In Anoxie ergaben sich keine relevanten Unterschiede im Vergleich zur Normoxie, CBMC und PBMC blieben vergleichbar (49,23 +/- 65,19 vs. 62,66 +/- 88,63 MFI, n=19-25, p=0,56, Abbildung 17 C) ebenso konnten keine relevanten Unterschiede zwischen CBMC und PBMC in Anoxie mit *E.coli*-Infektion festgestellt werden (226,7 +/- 192,6 vs. 266,9 +/- 206,7 MFI, n=13-15, p=0,53, Abbildung 17 D).

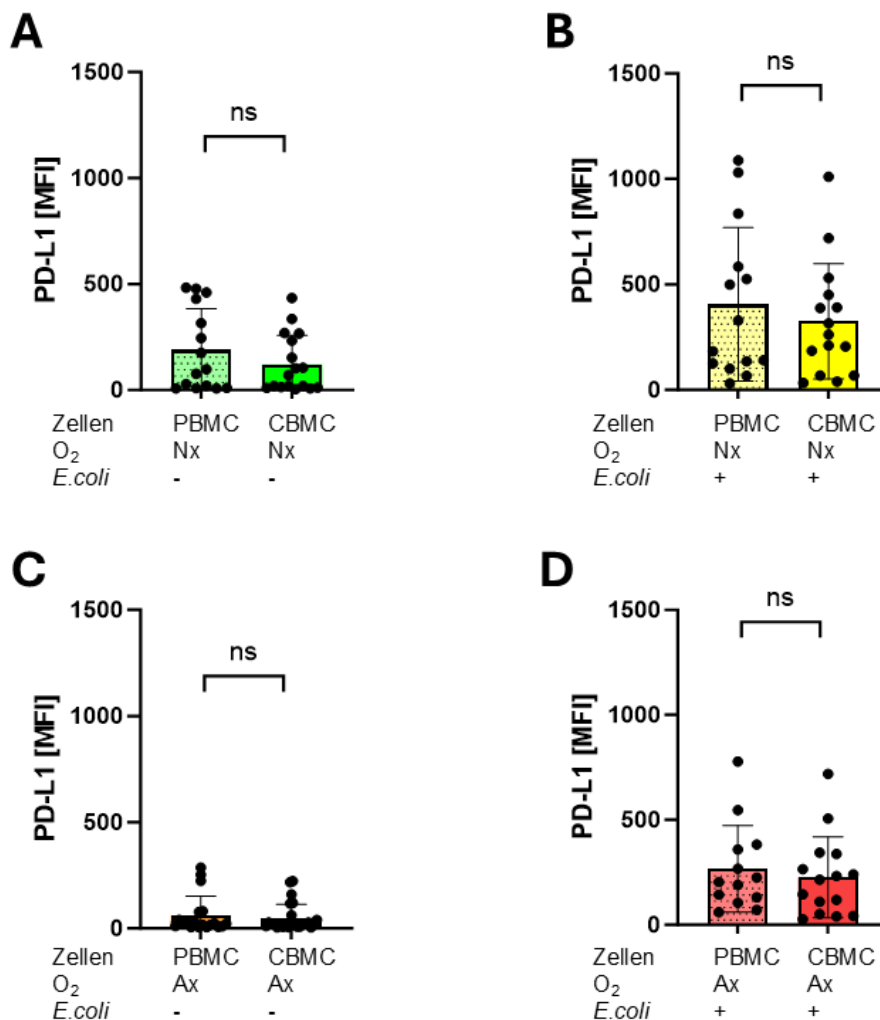


Abbildung 17 MFI PD-L1 auf CBMC und PBMC vergleichbar

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und PD-L1-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von PD-L1 auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E.coli*. (n=13-25; normal verteilt unpaired t-Test, nicht normal verteilt Mann-Whitney Test; \* p<0,05)

Die Expression von PD-L2 war auf CBMC unter Anoxie geringer als auf PBMC (21,38 +/- 8,08 vs. 27,18 +/- 8,51 MFI, n=18-22, p=0,034, Abbildung 18 C), stärker noch, ähnlich wie bei CD80, unter Infektion mit *E.coli* in Anoxie (35,63 +/- 13,08 vs. 56,55 +/- 18,49 MFI, n=11, p=0,006, Abbildung 18 D). Dieselben Tendenzen zeigten sich auch in Normoxie, jedoch ohne Signifikanz, sowohl ohne Infektion (42,31 +/- 24,02 vs. 56,73 +/- 33,53 MFI, n=12-15, p=0,167, Abbildung 18 A), als auch unter Infektion von *E.coli* (52,93 +/- 15,25 vs. 66,57 +/- 22,55 MFI, n=11-12, p=0,101, Abbildung 18 B).

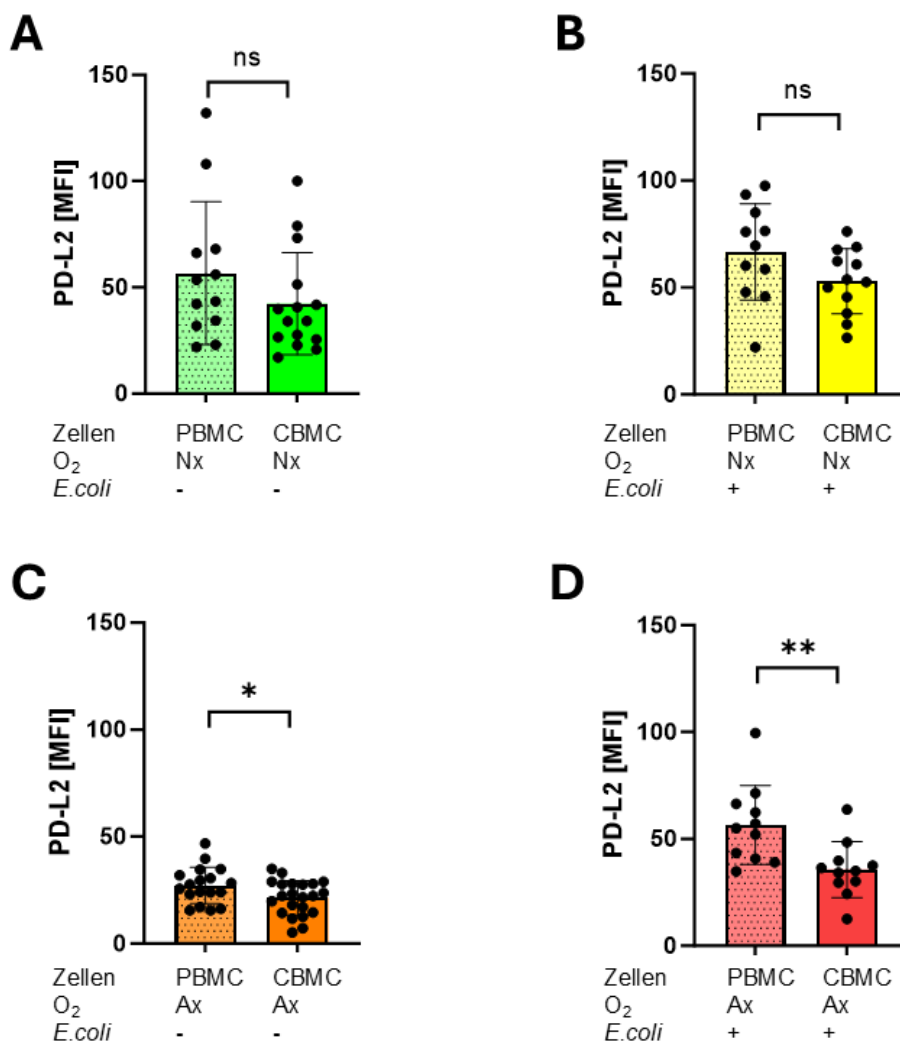


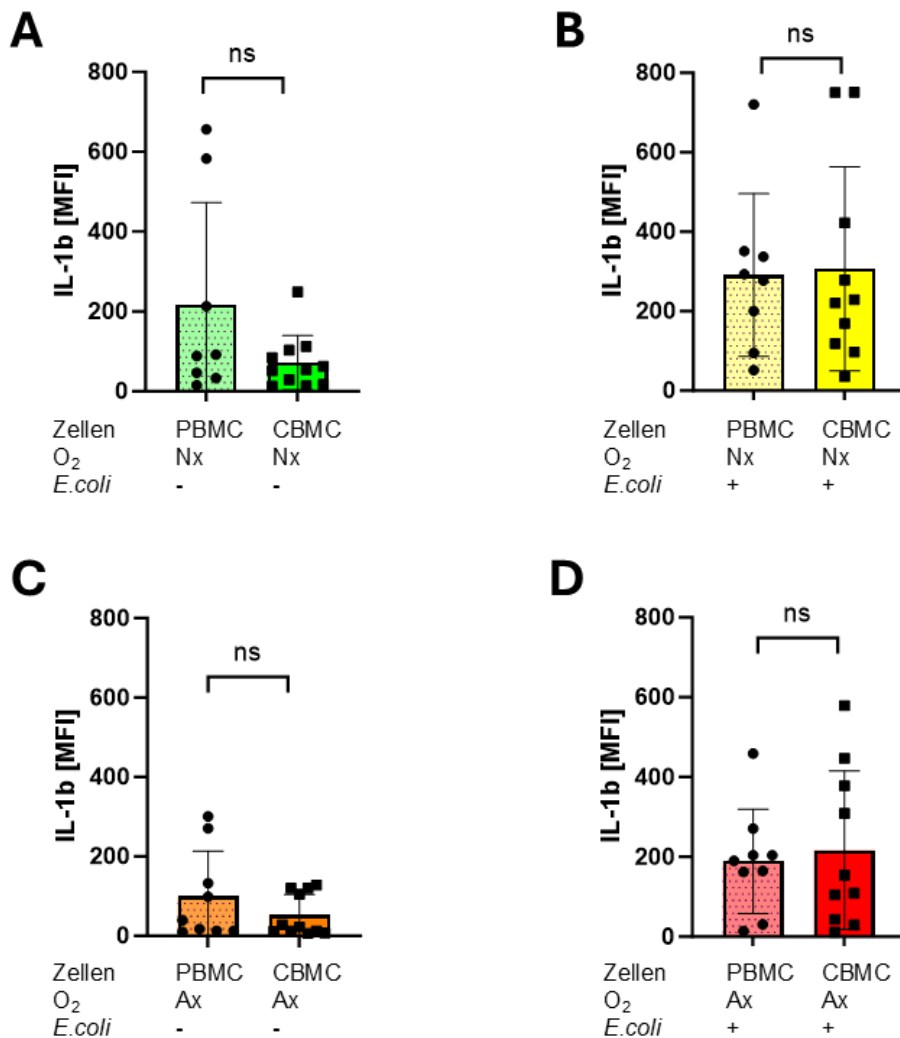
Abbildung 18 MFI PD-L2 auf CBMC geringer als auf PBMC

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und PD-L2-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von PD-L2 auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E.coli*. (n=7-10; nicht normal verteilt; Kruskal-Wallis test; \* p<0,05)

### 8.1.8.3 Gleichmaßen erhöhte Interleukine 1 $\beta$ , 6 und 8 unter Infektion mit *E.coli* in CBMC und in PBMC

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Fähigkeit zur Aktivierung von Immunzellen auf humoralem Wege zwischen neonatalen und adulten mononukleären Zellen gibt und ob die Sauerstoffkonzentration hier einen Einfluss hat, bestimmten wir die intrazelluläre Akkumulation von Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8). Es kam zu einem Anstieg der jeweiligen Interleukin-Konzentration unter Infektion mit *E.coli*, sowohl in Normoxie als auch Anoxie, wobei sich CBMC von PBMC nicht unterschieden. Der Anstieg unter Anoxie war jeweils schwächer.

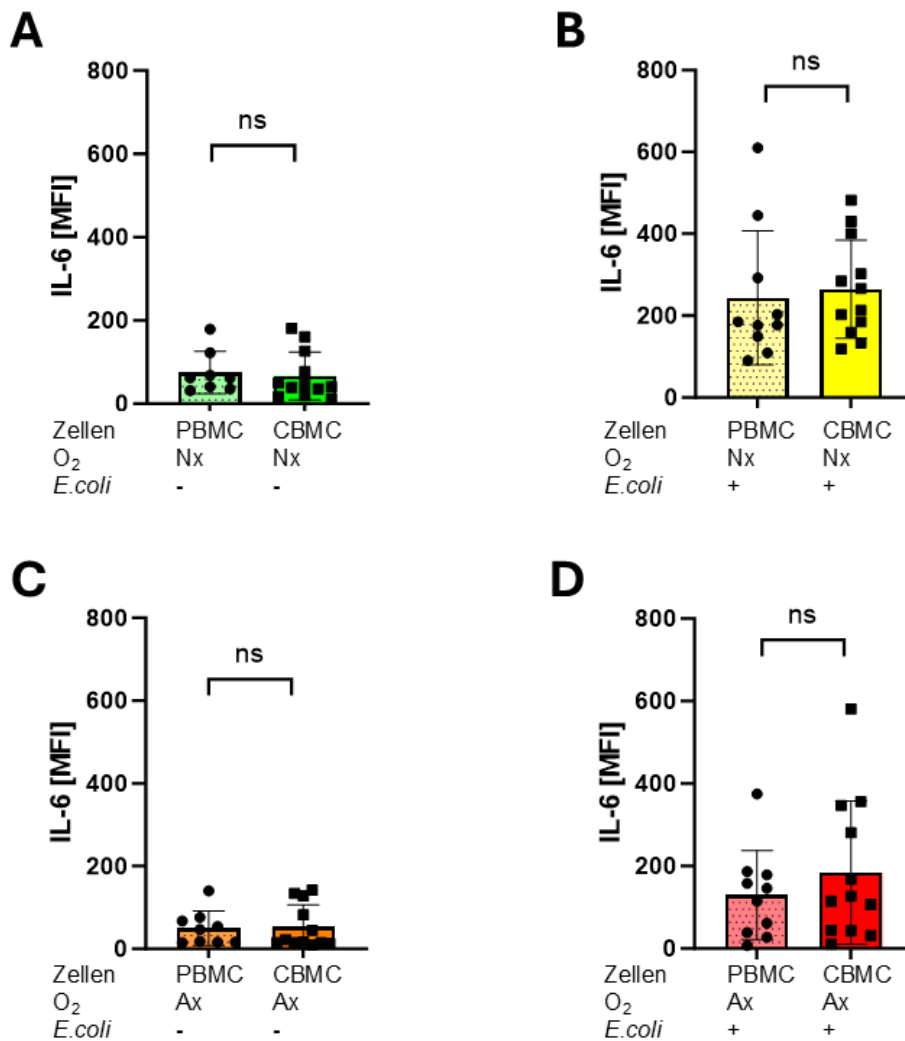
Die IL-1 $\beta$  Konzentration war unter Infektion mit *E.coli* in CBMC vergleichbar zu der in PBMC (306,9 +/- 256,9 vs. 290,6 +/- 204,9 MFI, n=8-10, p=0,965, Abbildung 19 B). Ebenso verhielt es sich in Anoxie unter Infektion mit *E.coli*, die IL-1 $\beta$  Konzentrationen blieben vergleichbar in CBMC und PBMC (216,6 +/- 198,2 vs. 188,9 +/- 130,8 MFI, n=9-10, p=0,727, Abbildung 19 D). Ohne Infektion schien rein deskriptiv CBMC weniger IL-1 $\beta$  zu akkumulieren als PBMC, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied sowohl in Normoxie (71,62 +/- 68,32 vs. 215,7 +/- 257,2 MFI, n=8-11, p=0,272, Abbildung 19 A) als auch in Anoxie (52,36 +/- 52,86 vs. 99,70 +/- 114,2 MFI, n=9-11, p=0,422, Abbildung 19 C).



**Abbildung 19** Vergleichbar hohe Interleukin-1 $\beta$ -Akkumulation in CBMC und PBMC unter Infektion mit *E. coli*

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E. coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E. coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und IL-1 $\beta$ -Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von IL-1 $\beta$  auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E. coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E. coli*. (n=8-11; normal verteilt unpaired t-Test, nicht normal verteilt Mann-Whitney-Test; \* p<0,05)

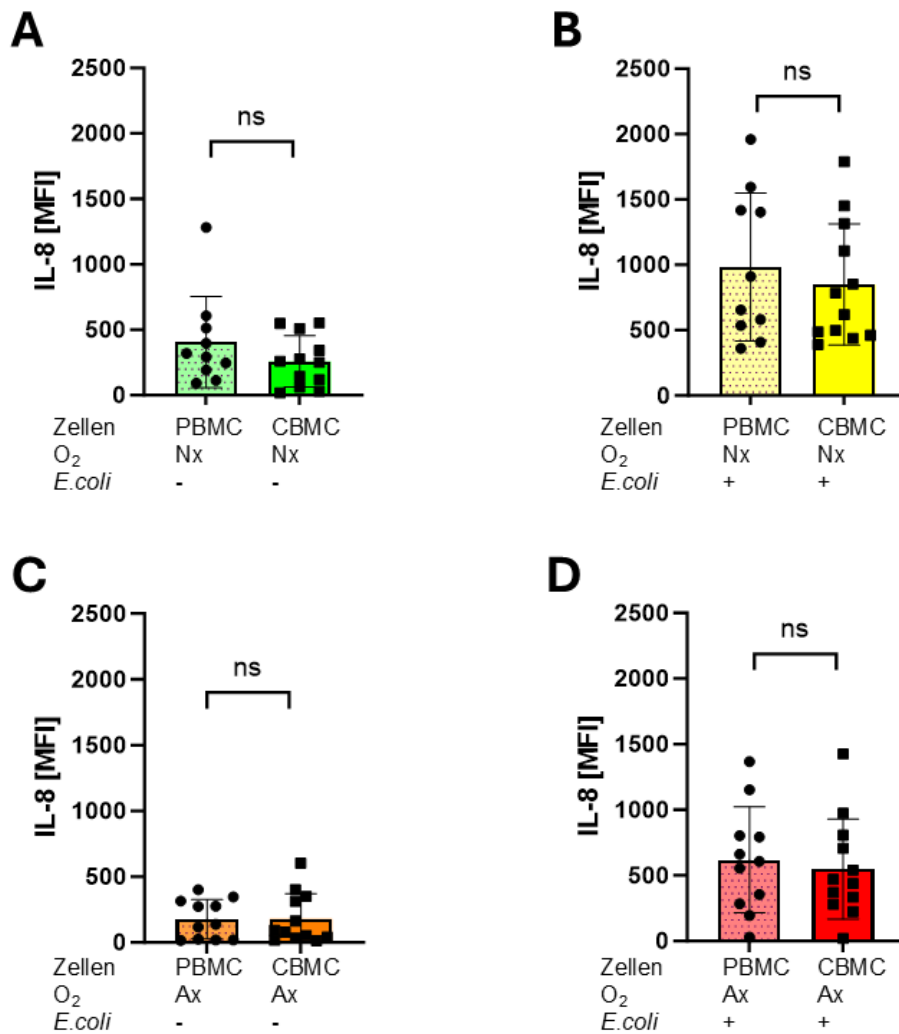
Die Produktion von IL-6 war ohne Infektion auf gleichem Niveau in CBMC und PBMC sowohl in Normoxie (67,06 +/- 57,34 vs. 75,09 +/- 50,75 MFI, n=8-12, p=0,624, Abbildung 20 A) als auch in Anoxie (53,17 +/- 53,18 vs. 50,20 +/- 41,24 MFI, n=9-12, p=0,638, Abbildung 20 C). Unter Infektion mit *E. coli* ergaben sich vergleichbare IL-6-Werte für CBMC und für PBMC, tendenziell sogar etwas höher in CBMC, in Normoxie (264,5 +/- 119,7 vs. 243,6 +/- 163,9 MFI, n=10-12, p=0,427, Abbildung 20 B) sowie in Anoxie (184,3 +/- 173,2 vs. 129,6 +/- 108,1 MFI, n=10-12, p=0,397, Abbildung 20 D).



**Abbildung 20** Vergleichbar hohe Interleukin-6-Akkumulation in CBMC und PBMC unter Infektion mit *E.coli*

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und IL-6-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von IL-6 auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E.coli*. (n=8-12; normal verteilt unpaired t-Test, nicht normal verteilt Mann-Whitney-Test; \* p<0,05)

Für IL-8 ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie für IL-1 $\beta$  und IL-6. Die IL-8-Akkumulation war ohne Infektion vergleichbar in CBMC und PBMC sowohl in Normoxie (259,5 +/- 196,0 vs. 405,7 +/- 348,7 MFI, n=10-12, p=0,346, Abbildung 21 A) als auch in Anoxie (180,0 +/- 191,3 vs. 177,1 +/- 148,3 MFI, n=11-12, p=0,990, Abbildung 21 C). Unter Infektion mit *E.coli* ergaben sich ebenfalls vergleichbare IL-8-Werte für CBMC und für PBMC, in Normoxie (849,5 +/- 464,1 vs. 983,1 +/- 566,0 MFI, n=10-12, p=0,550, Abbildung 21 B) sowie in Anoxie (549,4 +/- 381,0 vs. 618,4 +/- 403,0 MFI, n=11-12, p=0,677, Abbildung 21 D).



**Abbildung 21** Vergleichbar hohe Interleukin-8-Akkumulation in CBMC und PBMC unter Infektion mit *E.coli*

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14 und IL-8-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von IL-8 auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* **C** in Anoxie **D** in Anoxie mit *E.coli*. (n=10-12; normal verteilt unpaired t-Test, nicht normal verteilt Mann-Whitney-Test; \* p<0,05)

#### 8.1.8.4 CBMC exprimierten weniger Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in Infektion mit *E.coli* als PBMC

Die Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) führt zu einer Verminderung der T-Zell-Aktivität über den Tryptophan-Stoffwechsel. Die IDO-Expression in CBMC war im Vergleich zu PBMC nach Infektion mit *E.coli* sowohl in Normoxie (27,47 +/- 13,81 vs. 66,94 +/- 37,16 MFI, n=14-15, p=0,0002, Abbildung 22 A) als auch in Anoxie (30,67 +/- 20,09 vs. 58,53 +/- 27,14 MFI, n= 14-15, p=0,0032, Abbildung 22 B) deutlich reduziert.

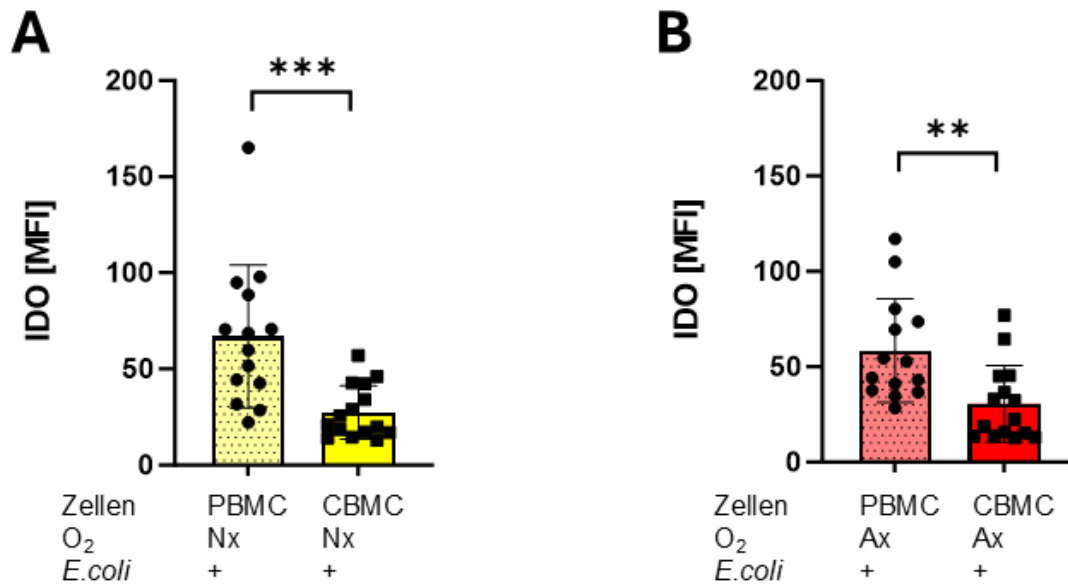


Abbildung 22 IDO unter Infektion mit *E.coli* in CBMC signifikant geringer exprimiert als in PBMC

Nach vierstündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD14- und IDO-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von IDO auf CD14+ mononukleären Zellen dargestellt, **A** in Normoxie mit *E.coli* **B** in Anoxie mit *E.coli*. (n=14-15; nicht normal verteilt; Mann-Whitney-Test; \* p<0,05)

### 8.1.9 Erhöhte VEGF-Produktion unter Anoxie in CBMC und PBMC, nicht jedoch unter Infektion mit *E.coli*

Zur Untersuchung der Auswirkung der unterschiedlichen Akkumulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  wurde die Expression eines der HIF-Zielgene, der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), quantifiziert. Die Expression von VEGF in PBMC war in Kultur in Anoxie im Vergleich zur Normoxie signifikant erhöht (102,0 +/- 21,91 vs. 57,76 +/- 5,10 pg/ml, n=5, p=0,0113, Abbildung 23 A). In CBMC war die VEGF-Expression in Anoxie im Vergleich zur Normoxie nicht signifikant höher (67,20 +/- 29,62 vs. 39,65 +/- 10,96 pg/ml, n=5, p=0,153, Abbildung 23 A), wobei die VEGF-Menge von CBMC in Anoxie im Vergleich zu PBMC in Anoxie nicht signifikant geringer war (67,20 +/- 29,62 vs. 102,0 +/- 21,91 pg/ml, n=5, p=0,0521, Abbildung 23 A).

Im Gegensatz dazu war die VEGF-Expression nach Infektion mit *E.coli* in Normoxie in CBMC und PBMC ähnlich niedrig (28,49 +/- 3,15 vs. 32,18 +/- 7,12 pg/ml, n=5, p>0,999, Abbildung 23 B). Auch in Anoxie wurde VEGF durch Infektion mit *E.coli* in CBMC und PBMC gleichermaßen nicht induziert (28,74 +/- 3,29 vs. 26,54 +/- 6,22 pg/ml, n=4, p>0,999, Abbildung 23 B).

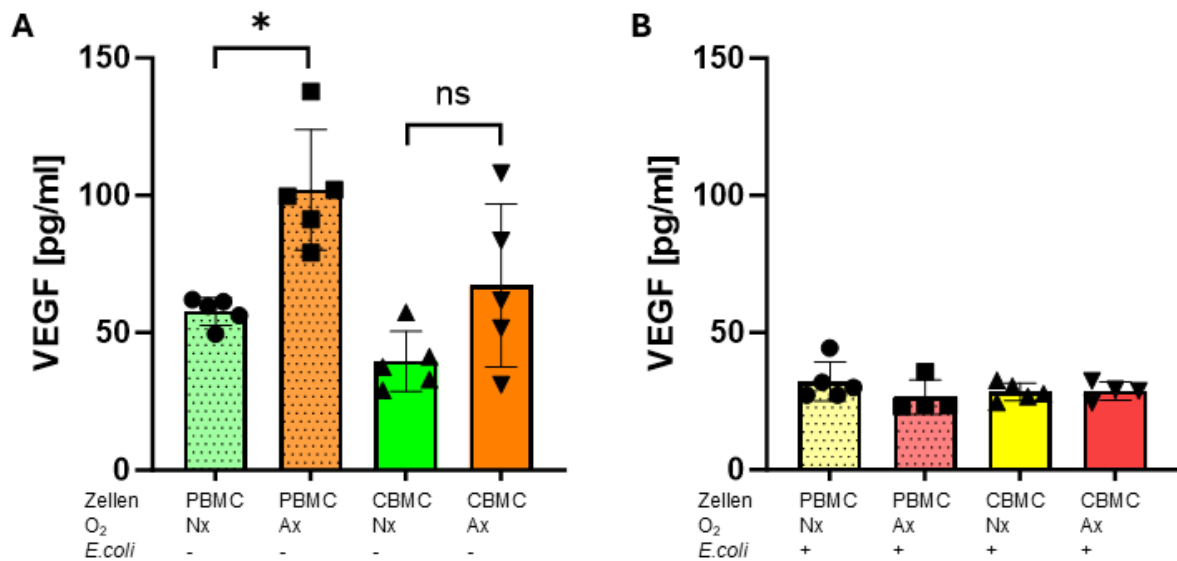


Abbildung 23 VEGF-Akkumulation unter Anoxie verstärkt, nicht aber unter Infektion mit *E.coli*

Nach 16- bis 22-stündiger Inkubation der CBMC und PBMC unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli* sowie Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli* wurden die Überstände abpipettiert und mittels ELISA die Extinktion bei 450nm und 550nm gemessen und anhand einer Eichkurve auf die enthaltene VEGF-Menge rückgeschlossen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der errechneten VEGF-Mengen, **A** in Normoxie und Anoxie **B** in Normoxie mit *E.coli* und in Anoxie mit *E.coli*. (n = 4-5, A normalverteilt, ordinary one-way ANOVA, B nicht normal verteilt, Kruskal-Wallis Test; \*p<0,05)

## 8.2 Versuche mit isolierten CD14+ Monozyten

Im zweiten Schritt wollten wir genauer untersuchen, ob die Monozyten hauptverantwortlich für die beobachteten Reaktionen der mononukleären Zellen auf erniedrigte Sauerstoffpartialdrücke und auf Infektion mit *E.coli* sind. Hierzu wurden CD14 positive Monozyten mittels magnetischer Beads negativ selektiert.

## 8.2.1 HIF-1 $\alpha$ -Protein akkumulierte unter Anoxie, nicht unter Normoxie mit *E.coli*-Infektion in CD14+ Monozyten, stärker in adulten als in neonatalen CD14+ Monozyten

Die isolierten CD14 positiven Monozyten wurden wie zuvor unter Normoxie oder Anoxie mit und ohne *E.coli*-Infektion kultiviert. Auch bei isolierten Monozyten aus CB war die HIF-1 $\alpha$  Akkumulation nach Kultur in Anoxie geringer als bei Monozyten aus PB, wenn auch nicht signifikant (0,087 +/- 0,10 vs. 1,05 +/- 1,26 relative Intensitäten, n=5, p=0,13, Abbildung 24 B). In Normoxie schienen die isolierten CD14 positiven Monozyten aus CB ebenfalls weniger HIF-1 $\alpha$ -Protein zu akkumulieren als CD14 positive Monozyten aus PB, es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied (0,060 +/- 0,79 vs. 0,39 +/- 0,34 relative Intensitäten, n=5, p=0,068, Abbildung 24 A). In Normoxie mit *E.coli*-Infektion war die HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation insgesamt auf niedrigem Niveau und auch hier geringer in isolierten Monozyten aus CB als aus PB (0,066 +/- 0,059 vs. 0,24 +/- 0,18 relative Intensitäten, n=4-5, p=0,084, Abbildung 24 C).

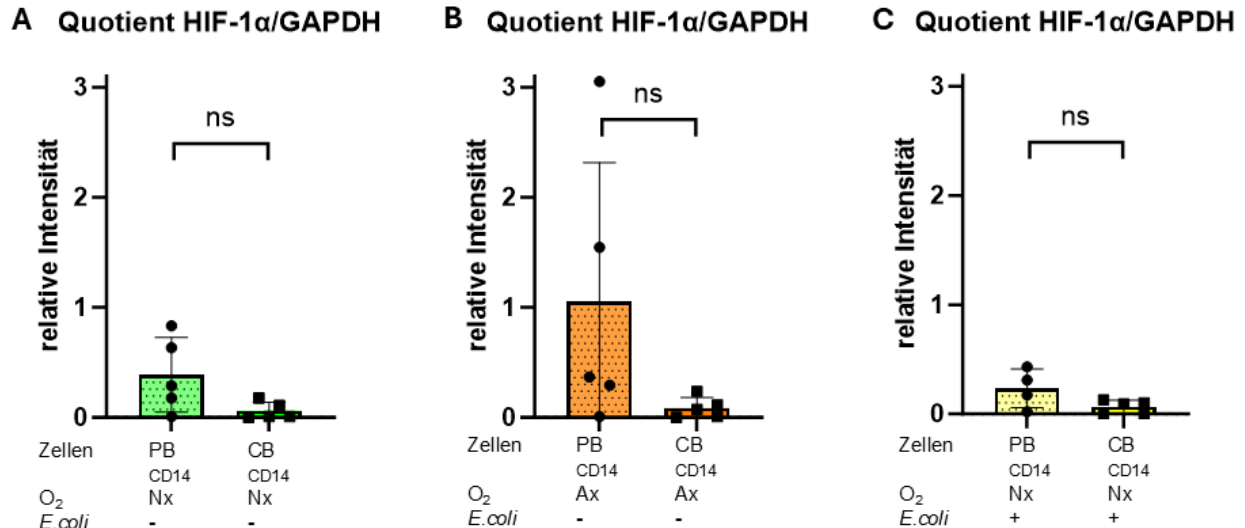
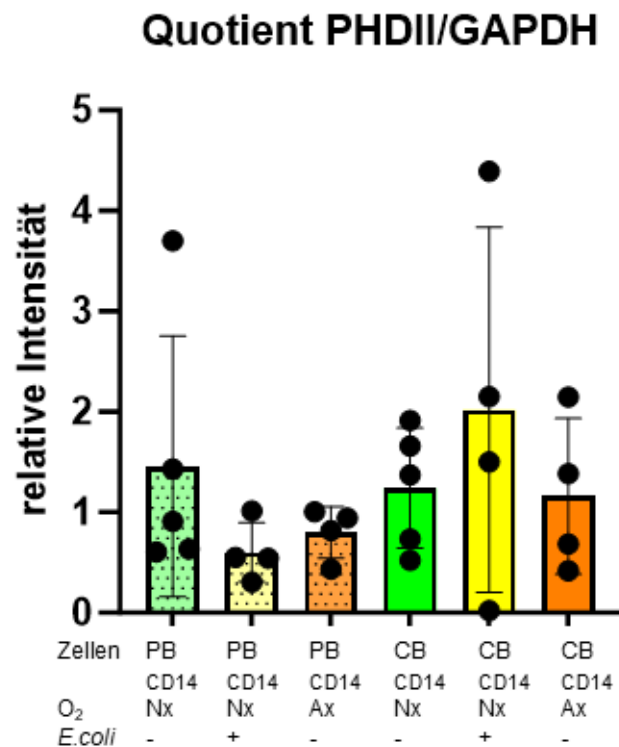


Abbildung 24 HIF-1 $\alpha$ -Proteinmengen tendenziell geringer in neonatalen isolierten CD14+ Monozyten als in adulten, ohne Signifikanz, in Normoxie, Anoxie und Normoxie mit *E.coli*

Nach vierstündiger Inkubation der isolierten CB-CD14+ bzw. PB-CD14+ Monozyten unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion bzw. Anoxie wurden die Proteine isoliert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran über Nacht geblottet. Die Proteine HIF-1 $\alpha$  und GAPDH wurden mit Antikörper gebundenen HRP-Enzymen und Substrat sichtbar gemacht und die relativen Intensitäten der Chemilumineszenz digital ausgewertet. **A** in Normoxie, **B** in Anoxie, **C** in Normoxie mit Infektion mit *E.coli*. (n=4-5; normalverteilt; unpaired t-Test; \*p<0,05).

## 8.2.2 PHDII-Proteinmenge war in CD14+ Monozyten kaum verändert durch Anoxie und Infektion mit *E.coli*

Anoxie führte im Vergleich zu Normoxie auch in isolierten CD14 positiven Monozyten aus CB (1,16 +/- 0,77 vs. 1,24 +/- 0,60 relative Intensitäten, n=4-5, p>0,999, Abbildung 25) und in isolierten Monozyten aus PB (0,80 +/- 0,26 vs. 1,46 +/- 1,30 relative Intensitäten, n=4-5, p>0,999, Abbildung 25) zu keiner wesentlichen Veränderung der PHDII-Expression. Auch nach Infektion mit *E.coli* war die PHDII-Expression in isolierten CD14 positiven Monozyten aus CB und PB nicht signifikant verschieden (2,02 +/- 1,82 vs. 0,60 +/- 0,30 relative Intensitäten, n=4, p=0,967, Abbildung 25).



**Abbildung 25** PHDII-Proteinmenge veränderte sich auch in isolierten CD14+ Monozyten unter Anoxie und unter Normoxie mit *E.coli*-Infektion weder in CB noch in PB signifikant

Nach vierstündiger Inkubation der isolierten CB CD14+ bzw. PB CD14+ Monozyten unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion bzw. Anoxie wurden die Proteine isoliert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran über Nacht geblottet. Die Proteine PHDII und GAPDH wurden mit Antikörper gebundenen HRP-Enzymen und Substrat sichtbar gemacht und die relativen Intensitäten der Chemilumineszenz digital ausgewertet. (n=4-5; nicht normal verteilt, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison Test; \*p<0,05)

## 8.2.3 Funktionelle Auswirkungen von Anoxie und Infektion mit *E.coli* in CB und PB isolierten CD14+ Monozyten

### 8.2.3.1 Keine differente CD80/86-Expression auf isolierten CD14+ Monozyten von CB und PB

War die Expression von CD80 unter Infektion mit *E.coli* auf CBMC geringer als auf PBMC nach 4 Stunden (Abbildung 15), so konnte dies bei isolierten CD14 positiven Monozyten nach 16 bis 20 Stunden nicht nachgewiesen werden, war auf isolierten CD 14 positiven Monozyten aus CB sogar tendenziell höher als aus PB. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen CB und PB isolierten CD14 positiven Monozyten in Normoxie (19,76 +/- 5,06 vs. 21,24 +/- 8,97 MFI, n=5, p=0,76, Abbildung 26 A), in Normoxie mit *E.coli*-Infektion (30,86 +/- 9,34 vs. 28,38 +/- 4,95 MFI, n=4-5, p=0,65, Abbildung 26 B), in Anoxie (10,55 +/- 3,64 vs. 16,18 +/- 9,57 MFI, n=4-5, p=0,31, Abbildung 26 C) und in Anoxie mit *E.coli*-Infektion (21,45 +/- 10,75 vs. 22,10 +/- 5,92 MFI, n=4-5, p=0,91, Abbildung 26 D).

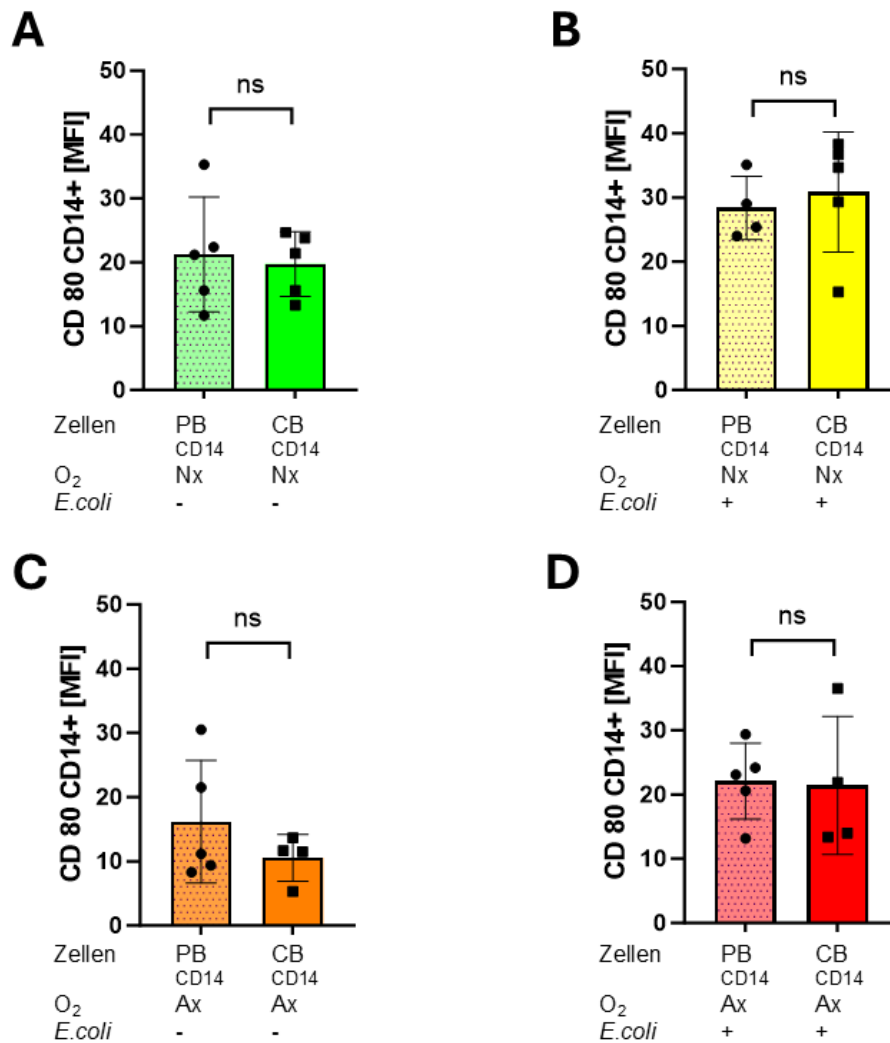
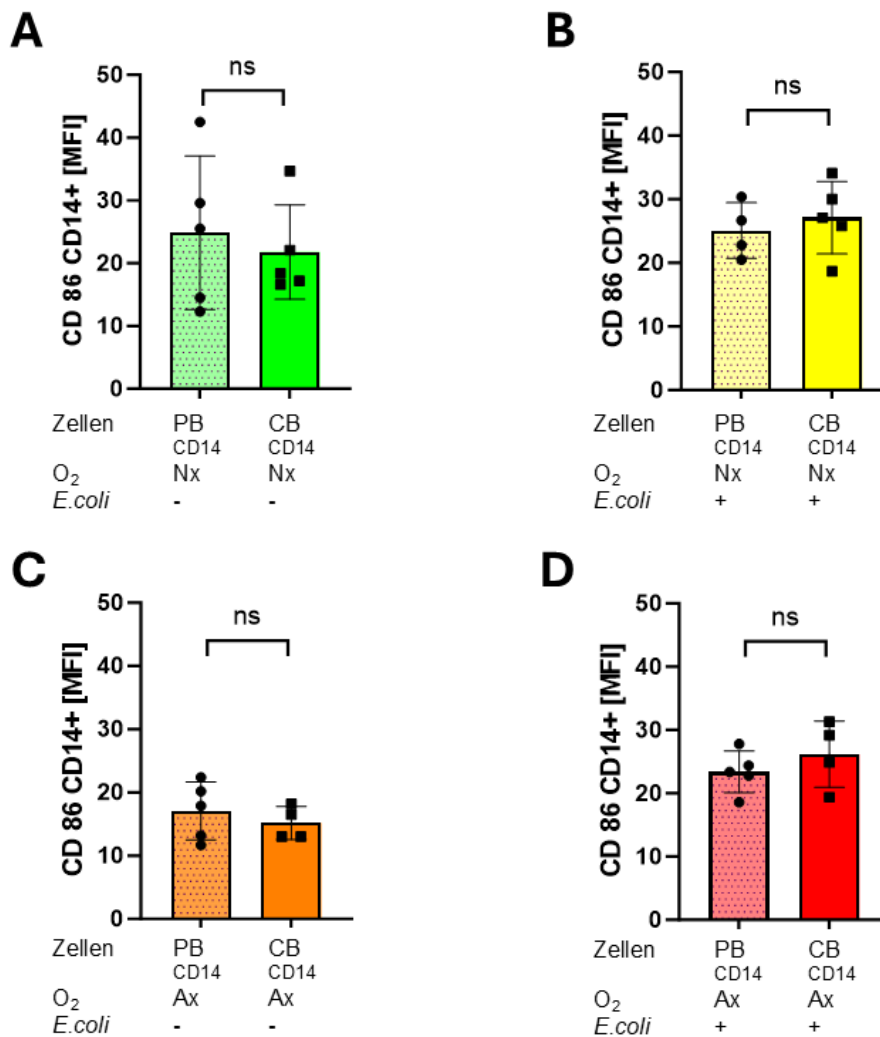


Abbildung 26 MFI CD80 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB

Nach 16- bis 20-stündiger Inkubation der isolierten CB CD14+ und PB CD14+ unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD80-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von CD80 auf CD14+ Monozyten dargestellt **A** in Normoxie, **B** in Normoxie mit *E.coli*-Infektion, **C** in Anoxie, **D** in Anoxie mit *E.coli*-Infektion. (n=4-5; normal verteilt; unpaired t-Tests; \* p<0,05)

CBMC exprimierten in Normoxie nach 4 Stunden signifikant weniger CD86 als PBMC (Abbildung 16). Bei isolierten CD14 positiven Monozyten gab es in Normoxie nach 16 bis 20 Stunden keinen Unterschied in der CD86-Expression zwischen CB und PB (21,80 +/- 7,52 vs. 24,88 +/- 12,24 MFI, n=5, p>0,999, Abbildung 27 A). Auch nach Infektion mit *E.coli* in Normoxie war die CD86-Expression zwischen CB CD14 positiven Monozyten und PB CD14 positiven Monozyten nicht unterschiedlich (27,14 +/- 5,69 vs. 25,10 +/- 4,36 MFI, n=4-5, p=0,575, Abbildung 27 B). Anoxie führte ebenfalls nicht zu einer veränderten CD86-Expression auf CB CD14 positiven und PB CD14 positiven Monozyten (15,18 +/- 2,61 vs. 17,08 +/- 4,55 MFI, n=4-5, p=0,48, Abbildung 27 C),

ebenso Anoxie mit *E.coli*-Infektion (26,20 +/- 5,26 vs. 23,40 +/- 3,31 MFI, n=4-5, p=0,36, Abbildung 27 D).



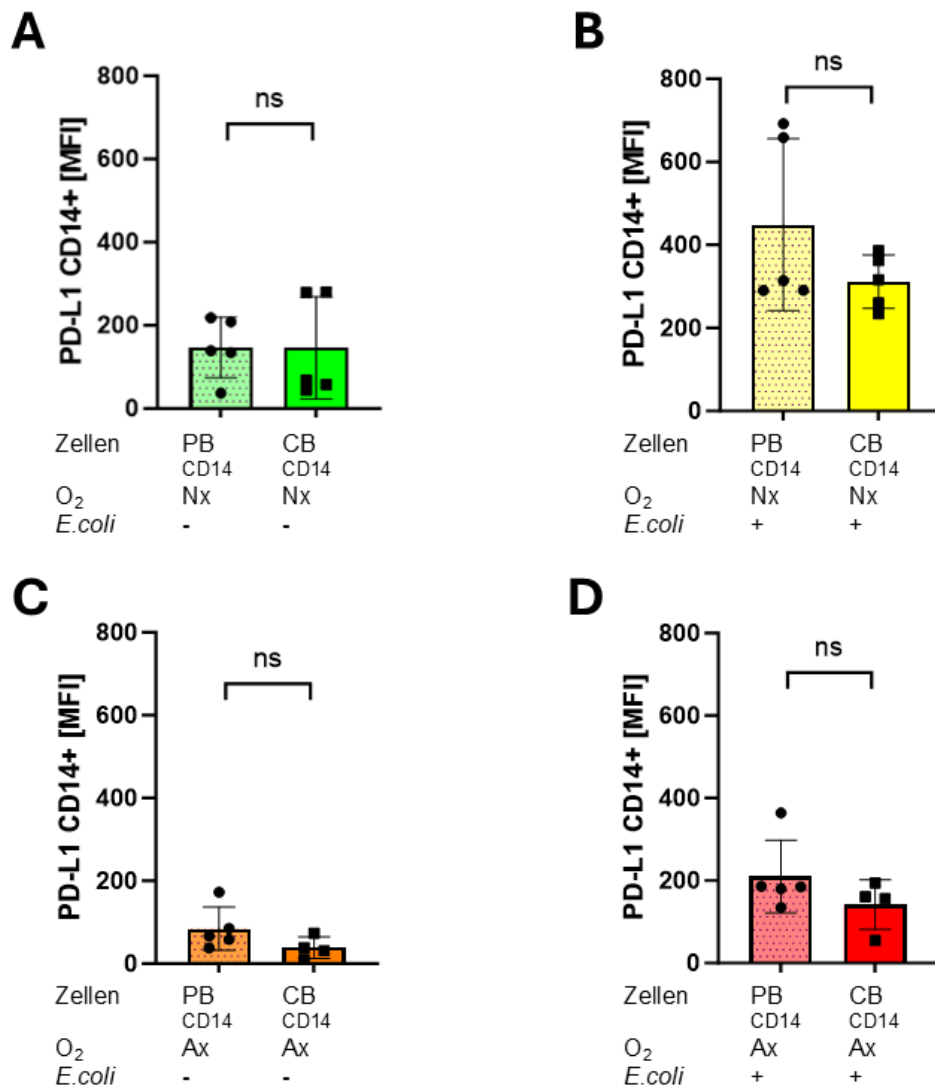
**Abbildung 27** MFI CD86 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB

Nach 16- bis 20-stündiger Inkubation der isolierten CB CD14+ und PB CD14+ unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit CD86-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von CD86 auf CD14+ Monozyten dargestellt **A** in Normoxie, **B** in Normoxie mit *E.coli*-Infektion, **C** in Anoxie, **D** in Anoxie mit *E.coli*-Infektion. (n=4-5; normal verteilt, unpaired t-Tests; \* p<0,05)

### 8.2.3.2 Keine differente PD-L1/PD-L2-Expression auf isolierten CD14+ Monozyten von CB und PB

Bei CBMC und PBMC konnten nach 4 Stunden ähnlich hohe PD-L1-Expressionen gesehen werden, die unter Infektion mit *E.coli* höher waren als ohne (Abbildung 17). Ähnlich hierzu zeigten sich auf isolierten CD14 positiven Monozyten vergleichbare PD-L1-Werte auf CB und PB, in Normoxie unter Infektion mit *E.coli* tendenziell weniger auf CB als auf PB CD14 positiven Monozyten, jedoch ohne signifikante Unterschiede

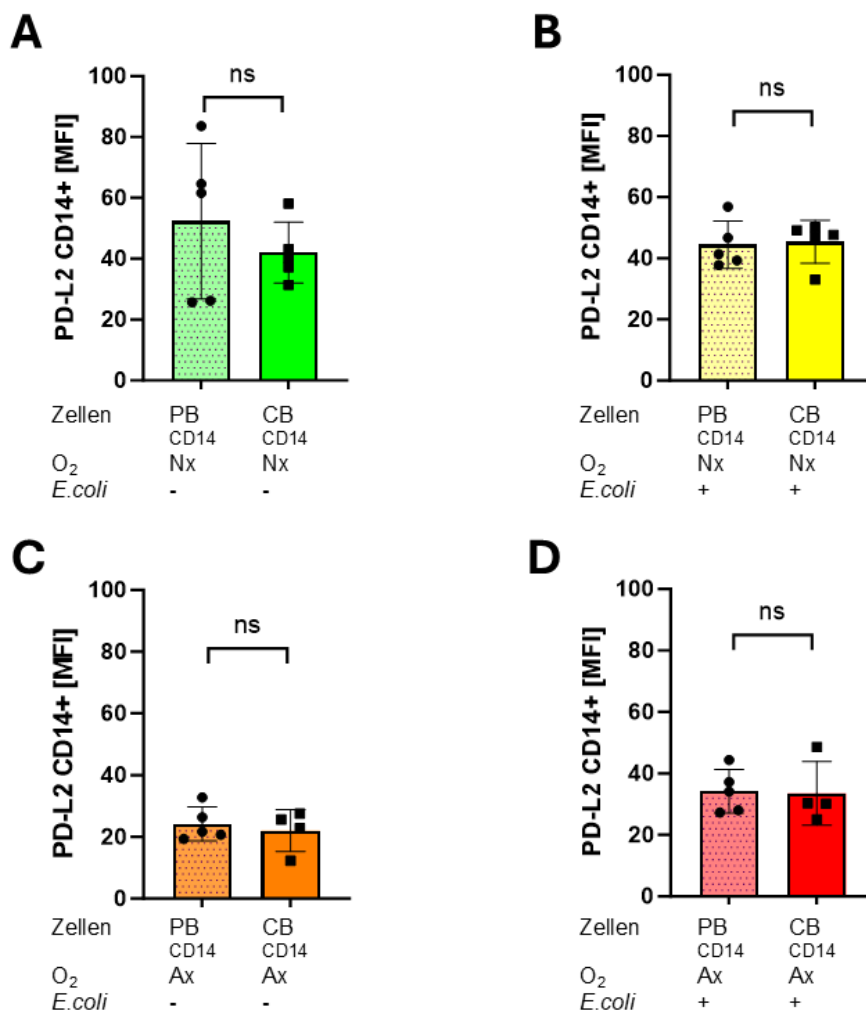
(311,6 +/- 64,77 vs. 449,2 +/- 207,1 MFI, n=5, p=0,55, Abbildung 28 B) und ebenso in Anoxie mit *E.coli* (141,6 +/- 59,94 vs. 210,0 +/- 88,66 MFI, n=4-5, p=0,41, Abbildung 28 D) nach 16 bis 20 Stunden. In Normoxie war die PD-L1-Expression auf isolierten CD14 positiven Monozyten von CB und von PB vergleichbar (145,7 +/- 122,5 vs. 147,2 +/- 72,70 MFI, n=5, p>0,999, Abbildung 28 A), ebenso in Anoxie (38,60 +/- 26,18 vs. 84,56 +/- 52,31 MFI, n=4-5, p=0,16, Abbildung 28 C).



**Abbildung 28** MFI PD-L1 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB

Nach 16- bis 20-stündiger Inkubation der isolierten CB CD14+ und PB CD14+ unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit PD-L1-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von PD-L1 auf CD14+ Monozyten dargestellt **A** in Normoxie, **B** in Normoxie mit *E.coli*-Infektion, **C** in Anoxie, **D** in Anoxie mit *E.coli*-Infektion. (n=4-5; D normal verteilt, unpaired t-Test, A-C nicht normal verteilt, Mann-Whitney-Test; \* p<0,05)

PD-L2 wurde unter Infektion mit *E.coli* in Normoxie und Anoxie nach 4 Stunden auf CBMC geringer exprimiert als auf PBMC (Abbildung 18). Auf isolierten CD14 positiven Monozyten war unter Infektion mit *E.coli* nach 16 bis 20 Stunden kein Unterschied in der Expression von PD-L2 zwischen CB und PB in Normoxie (45,40 +/- 7,04 vs. 44,42 +/- 7,75 MFI, n=5, p=0,55, Abbildung 29 B) und unter Infektion in Anoxie zu sehen (33,50 +/- 10,36 vs. 34,20 +/- 7,06 MFI, n=4-5, p=0,91, Abbildung 29 D). Auch ohne Infektion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der PD-L2 Expression isolierter CD14 positiver CB- und PB-Monozyten in Normoxie (42,02 +/- 9,99 vs. 52,34 +/- 25,53 MFI, n=5, p=0,42, Abbildung 29 A), und in Anoxie (22,08 +/- 6,78 vs. 24,20 +/- 5,49 MFI, n=4-5, p=0,62, Abbildung 29 C).

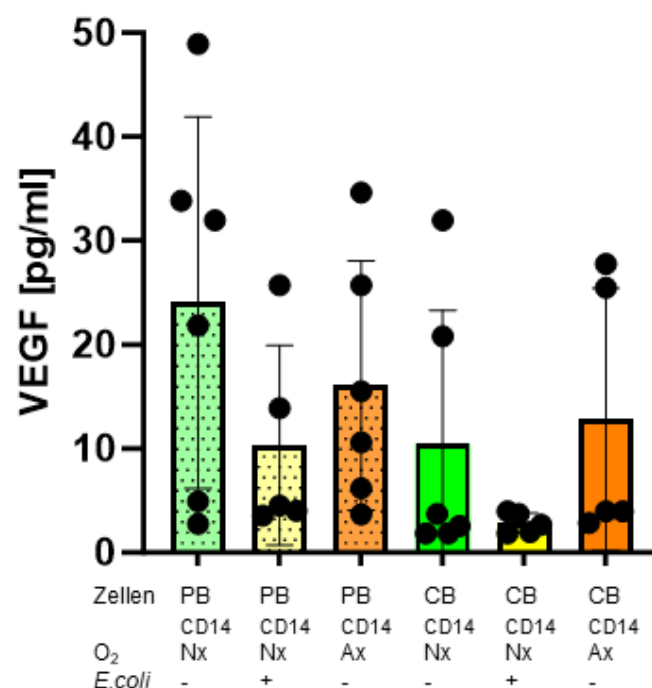


**Abbildung 29** MFI PD-L2 auf isolierten CD14+ Monozyten nicht different zwischen CB und PB

Nach 16- bis 20-stündiger Inkubation der isolierten CB CD14+ und PB CD14+ unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli*-Infektion und Anoxie bzw. Anoxie mit *E.coli*-Infektion erfolgte eine Phänotyp-Färbung mit PD-L2-Antikörpern und die durchflusszytometrische Messung. Es wurde der MFI von PD-L2 auf CD14+ Monozyten dargestellt **A** in Normoxie, **B** in Normoxie mit *E.coli*-Infektion, **C** in Anoxie, **D** in Anoxie mit *E.coli*-Infektion. (n=4-5; normal verteilt, unpaired t-Test, nicht normal verteilt, Mann-Whitney-Test; \* p<0,05)

## 8.2.4 Keine erhöhte VEGF-Produktion von CD14+ Monozyten unter Anoxie in CB und PB

Um zu untersuchen, ob auch isolierte CD14 positive Monozyten auf Anoxie mit erhöhter VEGF-Produktion reagierten wie die gesamten CBMC und PBMC (Abbildung 23), wurde die VEGF-Expression in isolierten CB und PB CD14 positiven Monozyten nach 22 Stunden gemessen. Anoxie führte hierbei nicht mehr zur erhöhten VEGF-Expression im Vergleich zur Normoxie, sowohl bei CB (12,81 +/- 12,64 vs. 10,47 +/- 12,84 pg/ml, n=5-6, p>0,999, Abbildung 30) als auch bei PB CD14 positiven Monozyten (16,06 +/- 12,00 vs. 24,06 +/- 17,88 pg/ml, n=6, p>0,999, Abbildung 30). Die Infektion mit *E.coli* in Normoxie war weiterhin kein Reiz zur VEGF-Bildung verglichen ohne Infektion, sowohl bei CB (2,85 +/- 0,97 vs. 10,47 +/- 12,84 pg/ml, n=5-6, p>0,999, Abbildung 30) als auch bei PB CD14 positiven Monozyten (10,35 +/- 9,61 vs. 24,06 +/- 17,88 pg/ml, n=5-6, p>0,999, Abbildung 30).



**Abbildung 30** VEGF-Akkumulation war unter Anoxie bei isolierten neonatalen und adulten CD14+ Monozyten nicht mehr verstärkt, auch nicht mit *E.coli*-Infektion

Nach 22-stündiger Inkubation der CB-CD14+ Zellen und PB-CD14+ Zellen unter Normoxie bzw. Normoxie mit *E.coli* sowie Anoxie wurden die Überstände abpipettiert und mittels ELISA die Extinktion bei 450nm und 550nm gemessen und mittels Eichkurve auf die enthaltene VEGF-Menge rückgeschlossen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der errechneten VEGF-Mengen in pg/ml. (n = 5-6, nicht normalverteilt, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiple comparison Test, \*p<0,05).

## 9 Diskussion

### 9.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass HIF-1 $\alpha$ -Protein in CBMC (1) in Anoxie und (2) in Infektion mit *E.coli* weniger akkumulierte als in PBMC. In PBMC konnte (3) eine relative Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -mRNA in Infektion mit *E.coli* gezeigt werden, jedoch nicht in CBMC. (4) Eine veränderte Expression von Prolylhydroxylase II konnte für die unterschiedliche HIF-1 $\alpha$  Akkumulation in CBMC und PBMC nicht als ursächlich dargestellt werden.

Nach funktioneller Einteilung der Monozyten in die drei Subpopulationen anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16 gab es (5) weder in CBMC noch in PBMC wesentliche Veränderungen der Subpopulationsrelationen unter Anoxie. Unter Infektion mit *E.coli* konnten wir (6) eine signifikante Zunahme der nicht-klassischen Monozyten in PBMC beobachten, die in CBMC deutlich geringer ausfiel.

(7) Co-stimulatorische (CD80) und co-inhibitorische (PD-L2) Moleküle wurden von CBMC unter Infektion mit *E.coli* geringer exprimiert als von PBMC.

(8) Die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8) war auf CBMC und PBMC in Anoxie und Infektion mit *E.coli* vergleichbar.

(9) Die Expression des Enzyms IDO war in CBMC unter Infektion mit *E.coli* geringer als in PBMC.

(10) Die Expression des Zielgens VEGF stieg in Anoxie in PBMC an, hingegen nicht in CBMC. Eine Infektion mit *E.coli* bewirkte keine vermehrte VEGF-Menge in CBMC und PBMC.

In isolierten CD14<sup>+</sup> Monozyten, war (11) die HIF-1 $\alpha$  Akkumulation unter Anoxie bei PB CD14<sup>+</sup> zu sehen, nur gering jedoch unter Infektion mit *E.coli*. (12) Die Expression von PD-L1, -L2, CD80 und CD86 zeigte keine wesentlichen Unterschiede zwischen isolierten CB CD14<sup>+</sup> und PB CD14<sup>+</sup> Monozyten. (13) Die VEGF-Akkumulation unter Anoxie konnte bei isolierten PB CD14<sup>+</sup> nicht mehr gezeigt werden.

## 9.2 CBMC akkumulierten kaum HIF-1 $\alpha$ Protein unter Anoxie bei unverändertem HIF-1 $\alpha$ mRNA-Level

Nach Inkubation in Anoxie akkumulierten CBMC signifikant weniger HIF-1 $\alpha$  Protein als PBMC.

Wie bereits von vielen Autoren vorbeschrieben, führt Hypoxie bzw. Anoxie zu einer intrazellulären Akkumulation von HIF-1 $\alpha$  Protein<sup>[29, 75]</sup>. Monozyten-Zelllinien (THP1-Zellen) zeigten im Experiment unter Anoxie von 0,1% Sauerstoff schon nach 30 Minuten eine HIF-1 $\alpha$  Proteinakkumulation im Zellkern<sup>[76]</sup>. In isolierten humanen Monozyten konnte in anderen Studien jedoch erst nach 2 Stunden und ausschließlich im Zytoplasma HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation detektiert werden, in THP-Zellen jedoch auch im Zellkern, letztere reagierten laut Autoren wie Makrophagen<sup>[40]</sup>. Unsere Ergebnisse stehen also im Einklang mit vorbeschriebenen Daten. Wir untersuchten allerdings nicht, ob HIF-1 $\alpha$  im Zytoplasma oder im Zellkern vorhanden war.

CBMC reagierten anders auf Anoxie, ohne HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass schon im intrauterin hypoxischen Milieu sich CBMC an das dortige Sauerstoffmilieu adaptieren. Womöglich halten diese Anpassungsprozesse an und führen auch postnatal zu einer verminderten Reaktion im Sinne einer verminderten HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation auf hypoxische Milieuänderung. Derartige Anpassungsprozesse an langanhaltende Hypoxie wurden von Ginouves et al. an Zelllinien sowie im Mausexperiment untersucht und konnten zeigen, dass es ab einer anhaltenden Hypoxie (1-3% Sauerstoff) von mehr als 24 Stunden zu einer Akkumulation und erhöhten Aktivierung der Prolylhydroxylasen (PHD 1-3) kommt<sup>[77]</sup>. Infolgedessen wird HIF-1 $\alpha$ -Protein wiederum vermehrt der proteasomalen Degradation zugeführt, wohingegen die mRNA-Level von HIF-1 $\alpha$  unverändert bleiben<sup>[77]</sup>. Dies deckt sich mit unseren Daten, dass HIF-1 $\alpha$ -mRNA unter Normoxie und Anoxie nicht signifikant differiert. In Endothelzellen wurde hingegen die mRNA-Menge von HIF-1 $\alpha$  infolge anhaltender Hypoxie (mehr als 3 Stunden) durch intrazelluläres TTP (Tristetraprolin), einem Zinkfingerprotein, reduziert und erreichte nach 24 Stunden weniger als die Hälfte der Ausgangsmenge<sup>[43]</sup>, wobei TTP je nach Phosphorylierungszustand auch zur Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA beitragen kann<sup>[78]</sup>. Möglicherweise werden ebenso wie die zellspezifische Regulation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins auch ihre mRNA zellspezifisch reguliert. Die Herunterregulation von HIF

unter chronischer Hypoxie dient dem Sichern des Zellüberlebens, wie von Ginouves et al. gezeigt werden konnte, und wird vermittelt durch einen (Wieder-)Anstieg intrazellulären Sauerstoffes durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, der zu einer Akkumulation und Überaktivierung der Prolylhydroxylasen führt, also HIF posttranskriptionell beeinflusst<sup>[77]</sup>.

Im Gegensatz zu der verminderten HIF-1 $\alpha$ -Protein-Akkumulation in CBMC (aus intrauteriner Hypoxie in anoxischer Kultur) stellten Ginouves et al. eine wieder erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Protein-Akkumulation unter verstärkt hypoxischen Bedingungen (erst 8%, dann 6% Sauerstoff) in Gehirnzellen von BL6-Mäusen fest<sup>[77]</sup>. Möglicherweise lassen sich diese Daten nicht uneingeschränkt vergleichen, da Ginouves et al. hier an Mauszellen mit Hypoxieszenarien von 24 Stunden experimentierte und unsere CBMC im Rahmen der Gravidität von 9 Monaten schon ihr gesamtes Zelleben und damit deutlich länger unter hypoxischen Bedingungen in vivo lebten. Es ist daher möglich, dass im Rahmen der andauernden Hypoxie weitere Adaptionsprozesse intrazellulär stattfinden, die im Experiment von Ginouves et al. nicht zum Tragen kommen. Weiterhin ist denkbar, dass schon die Monozytenvorläuferzellen, wie Monoblasten, eine andersartige und auf Hypoxie angepasste Stoffwechselaktivität aufweisen (in Anlehnung an Askenase et al. 2015 <sup>[79]</sup>).

Lin et al. untersuchten den Effekt von akuter und chronischer Hypoxie an verschiedenen Tumorzelllinien und kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass HIF-1 $\alpha$  Protein unter chronischer (>24-stündiger) Hypoxie instabil wird<sup>[80]</sup>. Allerdings zeigen Lin et al. eine nicht ausschließlich posttranskriptionelle Regulation der HIF-Proteine, sondern vielmehr eine sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Regulation. So stellten sie in der Tumorzelllinie (BE(2)C) eine eher geringe mRNA-Stabilität von HIF-1 $\alpha$  unter akuter Hypoxie (<24 Stunden) fest und eine stabilere unter chronischer Hypoxie (>24 Stunden). Dementgegen konnten wir in unseren CBMC nach 22 Stunden keine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge detektieren, was dem widerspricht. Andererseits bleibt unklar, ob die von Lin et al. verwendete Tumorzelllinie vergleichbar zu unseren CBMC und der differenten Zeit der Hypoxie ist.

Wir untersuchten in unseren Versuchen nicht, wo in der Zelle sich HIF-1 $\alpha$  akkumuliert. Fangradt et al. konnten zeigen, dass in primären humanen Monozyten sich HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie nach 5 Stunden akkumulierte, allerdings ausschließlich im Zytosol durch eine posttranslationale HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung<sup>[40]</sup>. Dass hierbei HIF-typische Gene

induziert werden, konnte auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (p50) zurückgeführt werden, der unter Hypoxie in den Zellkern gelangte. HIF-1 $\alpha$  benötigt für den Transport aus dem Zytosol in den Zellkern jedoch Proteinkinase C (PKC- $\alpha/\beta_1$ )<sup>[40]</sup>.

### 9.3 CBMC akkumulierten nicht vermehrt HIF-1 $\alpha$ unter *E.coli*-Infektion

Wir konnten zeigen, dass in PBMC durch Infektion mit *E.coli* eine Induktion von HIF-1 $\alpha$  erfolgte, die jedoch in CBMC ausbleibt.

Da HIF-1 $\alpha$  mit dem Ziel, den Energiehaushalt der Zelle aufrecht zu erhalten, in großem Umfang in die Genregulation des Zellstoffwechsels eingreift, erscheint es logisch, dass nicht nur hypoxische Signale HIF-1 $\alpha$  aktivieren, sondern auch andere, die Einfluss auf den Energiehaushalt der Zelle erfordern. Heute sind viele Induktoren des HIF-Signalwegs bekannt, auf Transkriptionsebene beispielsweise ROS (*Reactive Oxygen Species*, Sauerstoffradikale) oder auch Angiotensin II, auf Post-Transkriptionsebene beispielsweise microRNA oder sogenannte *long non-coding RNA*. Auf Translationsebene können andere Stoffwechselwege Einfluss nehmen wie mTOR- oder PI3K-Stoffwechselweg oder der Translationskomplex kann gestört werden. Nicht zuletzt kann auch auf der Posttranslationalen Ebene Einfluss auf den HIF-Signalweg genommen werden wie beispielsweise Phosphorylierung oder Acetylierung des Proteins. Ebenso werden nicht immer dieselben HIF-Zielgene aktiviert, da mannigfaltige weitere Regulationsmechanismen eine zell- und situationsspezifische Steuerung der HIF-Zielgen-Aktivierung ermöglichen<sup>[81]</sup>. Unter diesen Aspekten zeigt sich, dass Immunzellen im Speziellen während Inflammationsprozessen HIF aktivieren, nicht nur, da inflammatorische Bereiche oft hypoxisch sind, sondern auch, weil die jeweilige Zelle einen höheren Energiebedarf für ihre Funktion hat und somit auch unter normoxischen Bedingungen in Inflammation eine HIF-Akkumulation beobachtet werden konnte<sup>[81, 82]</sup>. Zum Beispiel wird HIF-1 $\alpha$  von NF- $\kappa$ B induziert, ein Transkriptionsfaktor der in besonderer Weise mit Inflammationsgenerierung in Verbindung steht<sup>[41]</sup>.

Insbesondere führte LPS in Makrophagen zu vermehrter Glykolyse und Pentose-Phosphat-Weg, was wiederum zu einer HIF-1 $\alpha$  Akkumulation führte<sup>[83-85]</sup>. Somit wurden als Zielgene von HIF wiederum verstärkt glykolytische Enzyme induziert, um

auch unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zelle in kurzer Zeit ausreichend ATP zu produzieren und zudem anfallende Produkte aus der Glykolyse für Wachstum und Proliferation der Zelle nutzen zu können<sup>[86]</sup>. Weiterhin fällt in LPS stimulierten Makrophagen vermehrt Succinat als Nebenprodukt des Citrat-Zyklus an, welches durch kompetitive Bindung Prolylhydroxylasen an der Bindung zu ihrem Substrat, alpha-Ketoglutarat, hemmt und somit HIF-1 $\alpha$  stabilisiert<sup>[87, 88]</sup>. Somit führt LPS über mehrere Wege zu einer vermehrten HIF-1 $\alpha$  Akkumulation in Makrophagen.

Dreschers et al. zeigten, dass neonatale Makrophagen unter inflammatorischen Signalen anders als adulte nicht imstande sind die glykolytischen Enzyme und die Glykolyse verstärkt zu induzieren und zudem der mTOR-Signalweg geringer aktiviert wird<sup>[89]</sup>. Der mTOR-Signalweg führt nachgewiesen zu einer HIF-Aktivierung<sup>[90]</sup>, sodass dies ein weiterer Grund sein könnte, warum neonatale Monozyten/Makrophagen in Inflammation vermindert HIF-1 $\alpha$  aktivieren.

Insgesamt ist die neonatale Zelle und der Organismus damit gegen schwere Schäden durch Pathogene schlechter geschützt; Eine mögliche physiologische Bedeutung könnte darin liegen, dass so einer überschießenden Entzündungsreaktion im Prozess der Besiedlung mit Kommensalen vorgebeugt würde<sup>[89]</sup>. Andere entzündungshemmende Mechanismen, die ausschließlich in der Neonatalzeit zu finden sind, wie z.B. die Akkumulation myeloider Suppressorzellen (MDSC) oder CD71 positiver erythroider Vorläuferzellen könnten ebenfalls für die Unterstützung einer physiologischen Mikrobiomentwicklung wichtig sein<sup>[16]</sup>.

Dass die mRNA-Menge von HIF-1 $\alpha$  nur in PBMC unter Infektion mit *E.coli* ansteigt, wenn auch nicht signifikant, deskriptiv aber eindeutig weniger in CBMC ansteigt, könnte an der verminderten HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung in CBMC liegen, da HIF sich selbst verstärkt durch ein HRE (*Hypoxia-response element*) im Promoter. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass eine weitere Regulation, mutmaßlich mit Einbezug von NF- $\kappa$ B, die Ursache für die geringere HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Menge ist. Eine Untersuchung von NF- $\kappa$ B in neonatalen Monozyten im Rahmen einer neonatalen Sepsis konnte meinen Recherchen nach nicht gefunden werden.

## 9.4 PHDII-Proteinmengen blieben bei erhöhter Genexpression in Anoxie unverändert in CBMC wie in PBMC

Die bedeutendsten HIF-regulierenden Enzyme stellen nach wie vor die Prolylhydroxylasen dar, wobei insbesondere die Prolylhydroxylase II Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$  Untereinheit nimmt.

Wir konnten nicht nachweisen, dass nach 4-stündiger Anoxie die PHDII-Proteinmenge zunimmt, weder in CBMC noch in PBMC. Ginouves et al. hingegen konnten eine Zunahme der PHDII-Menge bei anhaltender Hypoxie mit einem Maximum nach 12 Stunden Hypoxie nachweisen<sup>[77]</sup>, demzufolge ist die Hypoxie nach 4 Stunden vermutlich noch relativ akut, sodass die Herunterregulation von HIF durch PHDII erst später eingeleitet wird. Allerdings zeigten Ginouves et al. auch, dass deutlich stärker als die PHDII-Proteinmenge ihre Aktivität (gemessen an ihrer Hydroxylierungsrate) bei chronischer Hypoxie ansteigt und zwar auch noch länger als nach 12 Stunden Hypoxie<sup>[77]</sup>. Das bedeutet, dass die Enzymaktivität, die unsererseits leider nicht bestimmt wurde, eventuell einen noch entscheidenderen Beitrag zum Phänomen der erneuten HIF-1 $\alpha$  Degradation unter chronischer Hypoxie leistet als die Enzymmenge.

Im Gegensatz zur Proteinmenge von PHDII, die nach 4 Stunden Anoxie nicht angestiegen war, konnten wir zeigen, dass nach 22-stündiger Anoxie die mRNA-Menge von PHDII (EGLN1) sowohl in CBMC als auch in PBMC signifikant erhöht war, was sich mit von Epstein et al. und D'Angelo et al. deckt, die auch nachweisen konnten, dass PHDII in Hypoxie transkriptionell hochreguliert wird<sup>[91, 92]</sup>. Dies ist unter anderem dadurch zu erklären, dass die Prolylhydroxylase II mit ihrem HRE (*Hypoxia-response element*) im Promoter ein Zielgen von HIF ist<sup>[93]</sup>. D'Angelo et al. konnten zeigen, dass insbesondere bei Reoxygenierung die enzymatische Aktivität der PHDII (innerhalb weniger Minuten) zunimmt und vermutlich die Enzymaktivität posttranskriptionell reguliert wird<sup>[92]</sup>.

## 9.5 **Veränderte Monozyten-Subpopulationen unter Infektion mit *E.coli* führten zu einem proinflammatorischeren Setting in CBMC**

Anhand der Einteilung von Monozyten in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten zeigte sich in Normoxie ohne Infektion kein signifikanter Unterschied zwischen CBMC und PBMC in ihrer Subpopulationsaufteilung. Tendenziell war der Anteil klassischer Monozyten bei PBMC in Normoxie ohne Infektion höher als bei CBMC und die Anteile intermediärer und nicht-klassischer Monozyten höher bei CBMC in Normoxie ohne Infektion. Dies entspricht den Ergebnissen von Damasceno et al.<sup>[94]</sup> sowie Murphy et al.<sup>[95]</sup> Auch Doughty et al. kamen zu einem solchen Ergebnis, doch konnten wir nicht nachweisen, dass die intermediären Monozyten die größte Gruppe unter den drei ist<sup>[18]</sup>.

Anders als in der Literatur<sup>[96-98]</sup> zählten unter normoxischen Bedingungen ohne Infektion weniger als 50% der Monozyten zu den klassischen, sowohl bei CBMC als auch PBMC, denn beschrieben sind >90% klassische Monozyten der gesamten Monozytenzahl beim gesunden Erwachsenen. Möglicherweise war der Anteil klassischer Monozyten bei uns geringer aufgrund der vierstündigen Inkubation unter normoxischen Bedingungen, in denen die jeweiligen Monozyten schätzungsweise durch den Kontakt zu Fremdoberflächen wie den Zellkulturschalen eine gewisse Aktivierung erfahren. Ebenso darf der Einfluss des Endothels nicht unterschätzt werden, der *in vitro* wegfällt und damit die natürliche Umgebung (und damit auch die natürlichen Reize wie Zytokine von Endothelzellen etc.) verändert. So nehmen Radzyukevich et al. an, dass klassische Monozyten durch das von Endothelzellen produzierte Interleukin-6 beeinflusst werden<sup>[98]</sup>. Um diesem Unterschied in unseren Versuchen nachzugehen, wäre ein Vergleich zu frisch aufgereinigten Monozyten und deren Subpopulationsbestimmung hilfreich.

Weiterhin muss bei unseren *in vitro* etwas abweichenden Subpopulationsgrößen mitbeachtet werden, dass die Monozytensubpopulationen *in vivo* möglicherweise durch andere Differenzierungsfaktoren beeinflusst werden, so nehmen Tak et al. an, dass im Modell der linearen Reifung vom klassischen über den intermediären hin zum nicht-klassischen Monozyten der letzte Differenzierungsschritt außerhalb des Blutstroms stattfindet<sup>[99]</sup>, was natürlich in der Zellkultur mit der entsprechenden

Umgebung so nicht wiederzugeben ist und damit das Verhältnis der Subpopulationen verändert. Weitere Einflüsse auf die Entwicklung und Funktion der Monozyten in anderen *in-vivo*-Kompartimenten wurden von Askenase et al. beschrieben. Im Mausmodell konnten sie zeigen, dass unter akuter (gastrointestinaler) Infektion Interferon- $\gamma$ -Ausschüttung durch NK-Zellen im Knochenmark das Transkriptom der Monozyten-Progenitorzellen und damit deren Funktion langfristig auch nach Emigration in den Blutstrom ändern kann<sup>[79]</sup>. Auch diese eventuell beim Neugeborenen möglichen Einflüsse auf die Monozytenpopulation und -funktion konnten bei unseren Versuchen nicht berücksichtigt werden.

Unter Infektion mit *E.coli* jedoch bildete sich eine eindeutig andere Verteilung der Monozyten ab. Hierunter erhöhten PBMC ihren Anteil nicht-klassischer Monozyten, CBMC in geringerem Ausmaß, unter anoxischen Infektionsbedingungen war der Anteil an nicht-klassischen Monozyten in CBMC noch immer geringer als in PBMC. Dementsprechend erhöhten CBMC unter Infektion mit *E.coli* jeweils ihren prozentualen Anteil klassischer Monozyten im Gegensatz zu PBMC. Unter der Annahme der linearen Reifung vom klassischen über den intermediären zum nicht-klassischen Monozyten<sup>[60]</sup> bedeutete dies, dass neonatale Monozyten unter Infektion mit *E.coli* nicht in der Lage waren zu reifen (bzw. nicht schnell genug zu reifen).

Skrzeczyńska et al. zeigten den Anstieg intermediärer und nicht-klassischer Monozyten unter Sepsis bei Kindern *in vivo*<sup>[100]</sup>, wobei der Anteil intermediärer Monozyten stärker anstieg, was nicht unseren *in-vitro*-Daten entspricht, hier waren unter Exposition von *E.coli* vorwiegend die klassischen und auch die nicht-klassischen Monozyten angestiegen. Möglicherweise sind hier Unterschiede einerseits der *in-vitro*-Umgebung geschuldet, andererseits auch der Zeitspanne von 4-stündiger Inkubation mit *E.coli* bei uns und den symptomatischen septischen Kindern auf der Intensivstation, die von Skrzeczyńska et al. untersucht wurden. Wie von Radzyukevich et al. gereviewt steigt der Anteil nicht-klassischer Monozyten nach LPS-Injektion im Endotoxinämie-Modell nach 2 Stunden, während der Anteil klassischer Monozyten zu diesem Zeitpunkt einen Tiefpunkt erfährt, wohingegen nach 8 Stunden der Anteil klassischer Monozyten und nach 24 Stunden der Anteil intermediärer Monozyten zunimmt<sup>[98]</sup>. Wir untersuchten die Subpopulationen der Monozyten nach vierstündiger Kultur.

Poehlmann et al. untersuchten erwachsene Sepsispatienten und zeigten den Anstieg des Anteils klassischer und intermediärer Monozyten bei zugleich reduzierter Anzahl nicht-klassischer Monozyten<sup>[101]</sup>, im Gegensatz zu pädiatrischen und neonatalen Sepsispatienten mit erhöhten Anteilen klassischer und nicht-klassischer Monozyten, was wohl am ehesten durch das Patientenalter zu erklären ist. Wir konnten ebenfalls einen prozentualen Anstieg der klassischen Monozyten unter Infektion allerdings bei den neonatalen Monozyten beobachten, den die adulten Monozyten unter Infektion nicht zeigten, wahrscheinlich weil die neonatalen Monozyten einen geringeren Anteil an nicht-klassischen Monozyten unter Infektion bewirken konnten. Eventuell liegt auch hier der Unterschied in der *in-vitro*-Infektion von 4 Stunden im Gegensatz zu den *in vivo* Patienten mit nachgewiesener Sepsis und längerem Pathogenkontakt.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass die Gating-Strategie auf CD14 und CD16 leider differiert zwischen den Forschenden<sup>[98]</sup>, da die Oberflächenmarker-Wechsel in einem Kontinuum stattfinden. Daher werden in jüngerer Zeit andere und mehr Oberflächenmoleküle zur Differenzierung der Subgruppen herangezogen<sup>[98]</sup>. Hinzu kommt die Entdeckung, dass die Monozytensubpopulationen interindividuellen, vermutlich epigenetisch bedingten, Unterschieden unterliegen und es weitere funktionelle Subgruppen unter den Subpopulationen gibt<sup>[60]</sup>.

## 9.6 CBMC regulierten unter Infektion mit *E.coli* CD80/CD86 weniger hoch als PBMC

Unter Infektion mit *E.coli* wurde CD80 auf CBMC geringer exprimiert als auf PBMC, in Anoxie war die Differenz signifikant. Im Zustand ohne Infektion war das CD80 Level jeweils niedrig, auch in Anoxie, und vergleichbar auf CBMC und PBMC. Die isolierten Monozyten zeigten nach 16 bis 20 Stunden zwar ebenfalls eine höhere CD80-Expression unter Infektion mit *E.coli* im Vergleich zum Zustand ohne Infektion, jedoch waren hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Monozyten mehr sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass neonatale Monozyten auf einen Infektionsreiz hin möglicherweise langsamer reagieren als adulte und obgleich somit noch nicht geklärt ist, ob CD80 im jeweiligen Setting co-stimulatorisch oder co-inhibitorisch wirksam wird, die verzögerte Antwort auf einen Erreger bedeutet einen Vorteil für die sich teilenden Bakterien.

Hikita et al. konnten ebenso wie wir höhere CD80-MFI-Werte unter LPS-Stimulation detektieren, allerdings war der Anstieg von CD80-MFI in neonatalen Monozyten nach 6-stündiger Stimulation signifikant und der Anstieg ausgehend vom Grundniveau höher als in adulten Monozyten, die absoluten Werte nach Stimulation dann vergleichbar mit den Werten adulter Monozyten<sup>[102]</sup>. Ohne Stimulation war CD80 auf neonatalen Monozyten geringer exprimiert als auf adulten, was bei unseren Daten ungefähr auf ähnlichem Niveau war. Jedoch separierten Hikita et al. die Monozyten mit anti-CD14-magnetischen *Beads*, was diese eventuell aktiviert haben könnte, wohingegen wir zunächst die gesamte mononukleäre Zellpopulation betrachteten und im zweiten Schritt negativ selektierte CD14+ Monozyten untersuchten.

Dreschers et al. zeigten auch eine signifikant geringere prozentuale CD80-Expression in neonatalen verglichen mit adulten Makrophagen nach Interferon- $\gamma$ -Polarisation<sup>[103]</sup>.

CD80 als costimulatorisches Molekül des T-Zell-Rezeptors der B7-Familie (B7-1) kann nicht nur durch Bindung an CD28 T-Zell-stimulierend wirken, sondern kann durch Bindung an CTLA-4, das mit CD28 um die Bindung konkurriert, auch eine Hemmung der T-Zell-Proliferation bewirken und durch Signalkaskaden im Monozyten als der Antigen-präsentierenden Zelle die Induktion vonIDO bewirken, das wiederum immunsupprimierend wirkt<sup>[104]</sup>. Grozdics et al. konnten zeigen, dass in Nabelschnurblut eine erhöhte Anzahl CTLA-4-exprimierender CD4+ T-Zellen vorkommt und dies in Zusammenschau mit der höheren Affinität und Avidität von CD80 zu CTLA-4 im Vergleich zu CD28 für eine eher immunsupprimierende Funktion von CD80 in Nabelschnurblut führt, vermutlich aufgrund der höheren Antigenpräsentation (im Rahmen der Kolonisation) bei Neugeborenen, wie die Autoren vermuten<sup>[104]</sup>. Auch Sansom et al. sieht CD80 als den Hauptliganden von CTLA-4 an<sup>[63]</sup>. Möglicherweise bietet dies auch eine Erklärung, warum CD80 auf CBMC unter Infektion weniger stark hochreguliert wird als auf PBMC nach den ersten 4 Stunden der Infektion, da zu Beginn der Infektion eine Immunsuppression immunologisch für den Organismus nicht zielführend wäre.

Interessanterweise ist heute bekannt, dass auch CTLA-4 direkt von HIF-1 $\alpha$  beeinflusst wird<sup>[105]</sup>. Wenn also unter HIF-Einfluss mehr CTLA-4 exprimiert wird auf T-Zellen, wird CD80 zusätzlich zur höheren Affinität mehr an CTLA-4 binden als an CD28, letztendlich also eher einen immunsuppressiven Effekt haben.

Weitere immunsuppressive Effekte von CD80 sind bekannt durch Bindung an PD-L1, einem weiteren Bindungspartner von CD80<sup>[106]</sup>. In einem Review von Sansom und Walker wird die Funktion dieser inhibitorischen Signale für die T-Zell-Aktivität diskutiert, da die CD80-PD-L1 Bindung auf derselben Zelle stattfindet und damit zwar die Affinität dieses Komplexes zu CD28 im Vergleich zum CD80 Homodimer nicht beeinflusst, jedoch die Affinität zu CTLA-4 (mit ursprünglich stärkerer Affinität zum CD80 Homodimer) schwächt und letztendlich PD-L1 damit CTLA-4 regulieren könnte<sup>[62]</sup>. Angesichts der Tatsache, dass PD-L1 unter HIF-Einfluss hochreguliert wird, bedeutete dies, dass somit auch mehr CD80-PD-L1-Dimere auf Monozyten und anderen Antigen-präsentierenden Zellen entstehen würden, damit eine (aufgrund ebenfalls vermehrt exprimiertem CTLA-4 auf T-Zellen) vermehrte jedoch schwächere Bindung zu CTLA-4 entstünde und CD80 vermutlich seltener CD28 binden würde. Die tatsächlichen funktionellen Konsequenzen dieser Betrachtung sind hochspekulativ, da die weiteren Faktoren wie PD1/PD-L2 und CD86/CTLA-4 bzw. CD86/CD28 in diesem Szenario gar nicht beleuchtet werden, eventuelle andere Faktoren noch unbekannt sind. Daran wird jedoch deutlich, dass die ursprünglich bekannten funktionellen Effekte bestimmter co-stimulatorischer Moleküle je nach Situation differenziert betrachtet werden müssen.

CD86 wurde in Normoxie sowohl ohne als auch mit Infektion mit *E.coli* nach 4 Stunden signifikant geringer auf CBMC exprimiert als auf PBMC. Diese Unterschiede waren in Anoxie nicht mehr vorhanden, hier exprimierten PBMC genauso "wenig" CD86 wie CBMC. Die CD14 positiven isolierten Monozyten hingegen unterschieden sich nach 16 bis 20 Stunden kaum in ihrer CD86-Expression, es scheint insbesondere unter Anoxie einen Anstieg mit Infektion von *E.coli* gegeben zu haben, doch dieser war nicht signifikant.

In einem humanen Endotoxämie-Modell konnten Tak et al. zeigen, dass in den untersuchten 8 Stunden nach Injektion von LPS intermediäre und nicht-klassische Monozyten geringer CD86 exprimierten, klassische zeigten weder Anstieg noch Abfall von CD86<sup>[107]</sup>. In unseren Messungen kam es zu keinem Abfall von CD86 auf CBMC oder PBMC unter Infektion mit *E.coli*, jedoch war die CD86-Expression unter Anoxie geringer als in Normoxie vor allem in PBMC. Die CD86-Level auf CBMC blieben quasi unverändert. Möglicherweise konnte bei uns kein Abfall von CD86 detektiert werden,

da wir die gesamten mononukleären Zellen betrachteten und zudem nach 4 Stunden und nicht nach 8 Stunden.

Neonatale Monozyten wurden von El Sehmawy et al. in den ersten 3 Tagen der neonatalen Sepsis (mit positiver Blutkultur) untersucht und sie fanden eine erhöhte Prozentzahl CD86-exprimierender Monozyten (in Früh- und Reifgeborenen) sowie einen erhöhten CD86-MFI<sup>[108]</sup>. Unsere Daten zeigten keine Änderungen von CD86-MFI auf CBMC und lediglich kaum CD86-MFI-Hochregulation von CB CD14 positiven Monozyten nach Infektion mit *E.coli* nach 16 bis 20 Stunden. Der prozentuale Monozytenanteil, der CD86 exprimierte, wurde von uns nicht untersucht. Ein weiterer Unterschied war, dass die meisten Fälle neonataler Sepsis durch *Klebsiella* spp. hervorgerufen wurden und nur ein geringer Teil durch *E.coli*.

Die verminderte Expression von CD86 auf neonatalen Makrophagen im Vergleich zu adulten durch Dreschers et al.<sup>[103]</sup> deckt sich mit unserem Ergebnis von neonatalen Monozyten, die in Normoxie ebenfalls signifikant weniger CD86 exprimierten als adulte Monozyten.

Das bedeutet, dass CD86 als wichtiges co-stimulatorisches/co-inhibitorisches Molekül antigenpräsentierender Zellen auf neonatalen Monozyten beeinträchtigt ist.

### **9.7 CBMC regulierten unter Infektion mit *E.coli* PD-L2 nicht in gleichem Maße hoch wie PBMC, PD-L1 wurde nur minimal erhöht unter Infektion mit *E.coli***

Die funktionellen Auswirkungen von Sauerstoffpartialänderung und Infektion wollten wir untersuchen anhand der Co-Inhibition bzw. Co-Stimulation von T-Zellen durch Monozyten, die Monozyten eigene Interleukin-Produktion und die Akkumulation von Effektor-Enzymen.

Das co-inhibitorische Molekül PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*) wirkt als Ligand unter anderem für den Rezeptor PD-1 (*Programmed Death-1*), der beispielsweise auf T-Zellen exprimiert wird, und bei Bindung Signale zur (T-Zell-)Apoptose bzw. Anergie abgibt, also immunsuppressiv wirkt. PD-L1 wird direkt von HIF-1 $\alpha$  hochreguliert, da das PD-L1-Gen ein HRE im Promoter trägt<sup>[81, 82]</sup>.

Dementgegen stehen unsere Ergebnisse, die sowohl auf CBMC wie auch auf PBMC unter Anoxie kein vermehrtes PD-L1 zeigten. Ein wesentlicher Grund, warum PD-L1 in unseren Experimenten unter Anoxie nicht anstieg, dürfte wohl die kurze Zeitspanne von nur 4 Stunden sein, da Noman et al. und auch Barsoum et al. minimal 24 Stunden Hypoxie erprobten<sup>[109, 110]</sup>. Allerdings wäre dann zu erwarten gewesen, dass in den isolierten CD14 positiven Monozyten nach 16-20 Stunden Anoxie vermehrt PD-L1 exprimiert werden müsste. Hier führte die Anoxie jedoch nicht zu vermehrtem PD-L1, jedoch die Infektion mit *E.coli*, wenn auch ohne Signifikanz. Dieser Effekt war etwas stärker in PB- als in CB-CD14 positiven Monozyten ausgeprägt, auch hier kein signifikanter Unterschied. Eine mögliche Erklärung liegt in der nicht überprüften Hypoxie des Kulturmediums (siehe Kapitel 9.11), da eventuell im Zellkulturmedium nicht die Anoxie erreicht wurde wie in der umgebenden Luft. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass zur PD-L1-Expression weitere Stimuli notwendig sind, wie der Kontakt zu T-Zellen. So konnten Mimura et al zeigen, dass PD-L1 auf Tumorzellen durch Interferon- $\gamma$  von T-Zellen hochreguliert werden<sup>[111]</sup>. Galbraith et al. konnten eine Hochregulation von PD-L1 auf Monozyten nachweisen, was durch LPS noch verstärkt wurde – allerdings hatte dies keine verminderte T-Zell-Funktion zur Folge <sup>[112]</sup>. Die Autoren mutmaßen, dass Interferon- $\gamma$  TNF- $\alpha$  hochreguliert und dieses wiederum PD-L1-Hochregulation bewirkt.

PD-L2 als zweiter Ligand von PD-1 ist ebenfalls bekannt als T-Zell hemmender Einfluss, wichtig unter anderem für die Entwicklung einer Immuntoleranz wie beispielsweise oraler Immuntoleranz<sup>[113]</sup>.

In unseren Versuchen stieg PD-L2 unter Infektion mit *E.coli* an, auf CBMC jedoch weniger als auf PBMC. Anoxie hatte wenig Einfluss, hier wurden lediglich die Unterschiede von CBMC und PBMC unter Infektion deutlicher. Auf isolierten CD14 positiven Monozyten nach 16 bis 20 Stunden nivellierten sich die Unterschiede, es gab einen leichten PD-L2-Anstieg unter Infektion mit *E.coli*, hierbei jedoch kaum Unterschiede zwischen Normoxie und Anoxie und quasi keine Unterschiede zwischen Neonaten und Erwachsenen.

Die erhöhte PD-L2-Expriemierung unter Inflammation deckt sich mit den Ergebnissen von Xiong et al., die eine Hochregulation von PD-L2 auf Monozyten von Patienten mit

Rheumatoider Arthritis nachweisen konnten. Diese transmembranöse PD-L2-Zunahme korrelierte sogar mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie mit den CrP-Werten der Patienten<sup>[114]</sup>. Tatsächlich wurde der PD-L2/PD-1 Interaktion nicht nur immunsuppressive Funktion im Sinne einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung und Immuntoleranz zugeschrieben<sup>[65, 113]</sup>, sondern es wurden durch PD-L2 auch T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion im Sinne einer TH1-Immunantwort beschrieben<sup>[115]</sup>, wobei Wang et al. diese Effekte am ehesten auf andere Bindungspartner als PD-1 zurückführt<sup>[116]</sup>.

Um die unterschiedlichen PD-L2-Level auf CBMC und PBMC unter Infektion einzuordnen, muss auch in Betracht gezogen werden, dass es neue Erkenntnisse zur T-Zell-Funktion von Neonaten und Erwachsenen gibt. So konnte nachgewiesen werden, dass neonatale T-Zellen anderen Progenitor-Zellen entspringen als adulte T-Zellen und sich auch Transkriptom und Epigenetik deutlich unterscheiden<sup>[117]</sup>. Neonatale T-Zellen wurden als eine andere T-Zell-Population beschrieben, deren Funktion teils unabhängig von T-Zell-Rezeptoren ist, die unter nicht-bedrohlichen Situationen Toleranz ermöglichen, jedoch ebenso auf Pathogene und Inflammationssignale hin zu einer raschen Immunantwort ähnlich des angeborenen Immunsystems fähig sind<sup>[117]</sup>. Demzufolge kann nicht generell eine funktionelle Konsequenz im Sinne einer verminderten T-Zell-Aktivierung von der geringeren PD-L2-Expression auf neonatalen mononukleären Zellen in Infektion abgeleitet werden. Es ist sowohl möglich, dass PBMC mit erhöhter PD-L2-Expression eine überschießende T-Zell-Aktivierung verhindern, die in CBMC fehlt, wie auch, dass eine zeitliche Komponente eine Rolle spielt und PD-L2 sekundär hochreguliert wird, wie auch, dass eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung über PD-L2 in neonatalen T-Zellen nicht von Vorteil ist, da neonatale T-Zellen anders agieren.

## **9.8 Die Produktion von Interleukin-1 $\beta$ , -6 und -8 war in CBMC und PBMC vergleichbar**

Die Interleukin-1 $\beta$ -, -6- und -8-Produktion war unter Infektion mit *E.coli* sowohl bei CBMC als auch PBMC höher als ohne Infektion. Dies galt für Normoxie wie für Anoxie. Hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen CBMC und PBMC oder zwischen Normoxie und Anoxie. Insgesamt war die Interleukin-6 und -8-Akkumulation

vergleichbar in CBMC wie auch in PBMC, die Interleukin-1 $\beta$ -Produktion ebenfalls, nur in Normoxie ohne Infektion schien diese in CBMC etwas niedriger zu sein als in PBMC. Iliodromiti et al. fassten zusammen, dass Monozyten Reifgeborener und sogar Monozyten Frühgeborener nicht weniger IL-1 $\beta$  und IL-6 produzierende Monozyten vorweisen, lediglich unter Stimulation mit LPS gibt es weniger IL-6 produzierende Monozyten bei Frühgeborenen, nicht jedoch bei Reifgeborenen<sup>[118]</sup>. Auch unsere Daten von Reifgeborenen zeigten keine verminderte IL-6-Akkumulation (im Vergleich zu Erwachsenen) auch unter Stimulation mit *E.coli*, ein Vergleich zu Frühgeborenen war uns leider nicht möglich.

Schultz et al. hingegen konnten zeigen, dass Reifgeborene sogar mehr IL-6 und IL-8 produzierende Monozyten besaßen als Erwachsene<sup>[119]</sup>. Unsere Daten ergaben, dass die Monozyten reifer Neonaten nicht mehr IL-6 oder IL-8 oder gar IL-1 $\beta$  akkumulierten als adulte Monozyten (auch nach Stimulation mit *E.coli*), die Prozentzahl Interleukin-tragender Monozyten hatten wir nicht berechnet.

Insgesamt zeigt sich jedoch, dass Monozyten Neugeborener in der Lage sind in nicht vermindertem Maße pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren und wie Iliodromiti et al. erwähnte, einen nicht spezifischen pro-inflammatorischen Aktivitätszustand dabei zu erhalten<sup>[118]</sup>. Als erste Abwehrreaktion gegen Pathogene ist dies durchaus hilfreich, doch eine zu hohe oder zu langanhaltende Zytokinproduktion kann schwere Folgen für den Organismus haben, so werden beispielsweise erhöhte Interleukin-8-Spiegel bei Frühgeborenen von Sullivan et al. mit Schäden der weißen Substanz zum Zeitpunkt des Geburtstermins in Verbindung gebracht<sup>[120]</sup>.

## 9.9 CBMC regulierten unter Infektion mit *E.coli*IDO nicht hoch

In PBMC waren *E.coli* unabhängig von Normoxie oder Anoxie starke Induktoren für die intrazelluläre Akkumulation von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), CBMC hingegen akkumulierten signifikant weniger IDO unter Infektion mit *E.coli* in Normoxie wie in Anoxie.

Auch Tattevin et al. beschrieben LPS als Induktoren für IDO in Monozyten und fanden heraus, dass die IDO-Akkumulation durch LPS NF- $\kappa$ B abhängig ist im Gegensatz zur NF- $\kappa$ B unabhängigen IDO-Akkumulation nach Stimulation mit IFN $\gamma$ <sup>[121]</sup>. NF- $\kappa$ B wiederum kann auch unabhängig von Hypoxie HIF aktivieren<sup>[41]</sup>. Wenn nun CBMC –

wie bereits oben beschrieben – in Infektion vermindert HIF aktivieren, kann dies eventuell durch eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivität erklärbar sein und auch die verminderte NF- $\kappa$ B-abhängigeIDO-Akkumulation von CBMC unter Infektion erklären.

Betrachtet man die bislang bekannten Funktionen vonIDO, die einerseits immunsupprimierend wirken, unter anderem durch Hemmung der T-Zell-Aktivität und -Proliferation, Entwicklung regulatorischer T-Zellen, und andererseits Pathogene wie Bakterien schädigend wirken, unter anderem durch ROS-Produktion und den Abbau von Tryptophan<sup>[67]</sup>, so wird klar, dass durch eine verminderteIDO-Expression in CBMC unter Infektion diese eine geringere Kapazität zur Bakterienabwehr aufweisen und andererseits Signale fehlen die Inflammation wieder einzudämmen. In Sepsispatienten stellten CD14 positive Monozyten die Hauptressource vonIDO dar, die IFN $\gamma$  und NF- $\kappa$ B-unabhängig war und aber erhöhteIDO-Level mit erhöhter Morbidität und Mortalität einherging<sup>[121]</sup>. Aus dieser Sicht ist eine verminderteIDO-Akkumulation in CBMC möglicherweise wiederum von Vorteil, jedoch wäre zu untersuchen, ob neonatale Monozyten *in vivo* unter SepsisbedingungenIDO hochregulierten.

DassIDO einen wichtigen Faktor der feto-maternalen Toleranz darstellt durch erhöhte intrauterineIDO-Aktivität (gemessen am Kynurenin/Tryptophan-Quotienten in Nabelschnurblut) wird durch eine erhöhteIDO-Aktivität plazentar erklärt<sup>[104]</sup>. Denn Grozdics et al. konnten auf aktivierten Monozyten aus CBMC ebenso wie wir geringere MFI vonIDO nachweisen als auf aktivierten Monozyten aus PBMC, die Aktivierung wurde jedoch durch die CD11-Positivität detektiert und nicht durch induzierte Inflammation<sup>[104]</sup>. Die Anzahl der aktivierten Monozyten bei Grozdics et al., dieIDO exprimierten, war in CBMC und PBMC jedoch vergleichbar<sup>[104]</sup>. Möglicherweise kompensieren die mütterlichen Zellen dieIDO-„Defizienz“ der neonatalen Immunzellen *in utero*. Postnatal kommt es dann aufIDO-induzierende Signale wie LPS bzw. in unserem Falle *E.coli* weiterhin zu keiner relevantenIDO-Hochregulation.

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass nach Stimulation mit GBS CBMC und PBMC vergleichbare MengenIDO akkumulierten<sup>[122]</sup>, was darauf schließen lässt, dassIDO je nach Stimulanz unterschiedlich reguliert wird.

## 9.10 VEGF war in CBMC unter Anoxie nicht signifikant erhöht, unter Infektion mit *E.coli* weder in CBMC noch in PBMC

VEGF ist eines der bekanntesten Zielgene von HIF und insbesondere in der Entwicklung aber auch im Erwachsenenalter bei der Bildung von Gefäßen – wie der Name verrät – beteiligt, wobei Hypoxie über den HIF-Signalweg der wiederum bekannteste Stimulator für VEGF ist<sup>[123]</sup>. So konnten auch wir nachweisen, dass PBMC unter Anoxie vermehrt VEGF bildeten und sezernierten. Der Anstieg von VEGF im Überstand von CBMC war allerdings nicht signifikant unter Anoxie. Hierfür kommen mehrere Hypothesen in Betracht: Entweder HIF-1 $\alpha$  wird unter Anoxie in CBMC nicht im selben Maße hochreguliert, wie oben via Western Blot gezeigt, und dies wiederum ist der Grund für die verminderte VEGF-Akkumulation unter Anoxie. Oder aber die Messung des VEGF(A)-Gehalts im Überstand tritt zu kurz und andere VEGF-Isoformen (VEGF-B, -C, -D oder andere) sind in diesem Alter bzw. Entwicklungsstadium mehr aktiv unter Anoxie als VEGF(A). So konnten Ng et al. im Mausmodell beweisen, dass die Expression der VEGF-Isoformen in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie auch in verschiedenen Organsystemen im adulten Organismus stark variieren<sup>[124]</sup>. Daher können unsere Experimente nur Aussage über VEGF(A) geben, die anderen Isoformen wurden nicht berücksichtigt. Es bleibt unklar, welche VEGF-Isoformen in der humanen Ontogenese in welcher Zusammensetzung eine Rolle spielen. Zugleich muss der extrazellulär im Überstand gemessene VEGF-Gehalt nicht mit dem intrazellulären übereinstimmen. So fanden Hoeres et al. heraus, dass Monozyten imstande sind, zusätzlich zu den membranständigen VEGF-Rezeptoren auch lösliche VEGF-Rezeptoren zu sezernieren, die den VEGF-Gehalt extrazellulär durch Bindung verringern und somit auch deren Wirkung an anderen Rezeptoren bzw. Zellen<sup>[125]</sup>.

Interessanterweise variierte die Menge des löslichen VEGF-Rezeptors bei Hoeres et al. unter den Monozytensubpopulationen, sodass isolierte klassische CD14 positive Monozyten neben den membranständig exprimierten VEGF-Rezeptoren auf Monozyten vermehrt löslichen VEGFR-1 sezernierten und infolgedessen deutlich verminderte VEGF(A)-Mengen im Überstand aufwiesen<sup>[125]</sup>. Dies bildet eine mögliche Erklärung unserer Beobachtungen, dass auch bei uns die isolierten klassischen CD14

positiven Monozyten unter Anoxie nicht mehr verstärkt VEGF(A) im Überstand aufwiesen.

Im Gegensatz zu vielen Vorberichten, nach denen Monozyten (bzw. Makrophagen) nach LPS-Stimulation vermehrt VEGF produzieren<sup>[126-128]</sup>, konnten wir unter Infektion mit *E.coli* keine vermehrten VEGF-Konzentrationen in den Überständen der infizierten Monozyten detektieren. Eine zeitliche Komponente ist unwahrscheinlich, da die LPS-induzierte VEGF-Konzentration nach 24-48 Stunden erhöht war<sup>[127]</sup>, wir unsere Zellen bis zu 22 Stunden inkubiert hatten und nach dieser Zeit eine VEGF-Akkumulation hätte sichtbar sein müssen. So wiesen Glaser et al. eine erhöhte VEGF-Konzentration in Überständen von neonatalen Monozyten nach 24-stündiger LPS-Stimulation<sup>[128]</sup>. Itaya et al. inkubierten ihre Makrophagen mehrere Tage mit LPS und konnten nach 48 Stunden einen VEGF-Anstieg erkennen, der zeit- und LPS-dosisabhängig weitere 3 Tage anstieg<sup>[126]</sup>.

Andere mögliche Erklärungsansätze gehen unter anderem auf den bereits oben erwähnten löslichen VEGF-Rezeptor zurück, möglicherweise produzieren *E.coli* selbst oder aber induziert durch die Infektion die Monozyten vermehrt löslichen VEGF-Rezeptor, der durch Bindung die VEGF-Konzentration senkt. Unsere Ergebnisse unterscheiden sich darin, dass wir als Stimulus ganze *E.coli* verwendeten und nicht LPS. Hajighasemi et al. zeigten unter anderem, dass verschiedene Leukämie-Zelllinien auf LPS unterschiedlich reagieren, so produzierten U937-Leukämiezellen unabhängig von LPS beträchtliche VEGF-Mengen<sup>[129]</sup>.

Eine vermehrte Apoptose nach Phagozytose von *E.coli* insbesondere von PBMC muss auch in Betracht gezogen werden, wie in Kapitel 9.12 eingehender betrachtet wird. Wie unsere Arbeitsgruppe vor einigen Jahren zeigen konnte, gehen PB Monozyten nach Phagozytose von *E.coli* vermehrt in Apoptose im Vergleich zu CB Monozyten<sup>[130]</sup>, was bedeutet, dass möglicherweise PBMC bzw. PB Monozyten unter Infektion mit *E.coli* pro Zelle letztendlich doch mehr VEGF produzieren würden im Vergleich zu CBMC bzw. CB Monozyten, jedoch nach 16 bis 22 Stunden eventuell zu viele der adulten Zellen apoptotisch geworden sind. Hierzu müsste eine Propidiumiodid-Färbung oder Annexin V-Färbung der Zellen nach denselben 16 bis 22 Stunden durchgeführt werden, um tote bzw. apoptotische Zellen zu detektieren.

## 9.11 Schwierigkeiten der Standardisierung von Hypoxie/Anoxie

In einem Forschungsprojekt, in dem es um einen Vergleich zwischen Zellreaktionen unter Normoxie und Hypoxie gehen soll, erscheint es selbstverständlich die Begriffe klar zu definieren. Die meisten Publikationen in diesem Feld sprechen von Hypoxie, wenn die umgebende Gasphase für ihre Zellen oder Gewebe 1%<sup>[25, 131, 132]</sup> oder 2%<sup>[92]</sup> Sauerstoff enthält, z.T. wird auch von 0,5%<sup>[40, 46, 76]</sup> Sauerstoff berichtet (Zitationen sind beispielhaft). Als Normoxie hingegen wird meist die gewöhnliche Inkubator-Umgebung betrachtet, in der Regel mit definierten 5% CO<sub>2</sub> und 100% Feuchtigkeit bei 37°C.

Betrachtet man den Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) in *In-vivo*-Gewebe, so wird klar, dass dieser ganz unterschiedlich und dennoch physiologisch sein kann. Im Alveolarepithel der Lunge ist dieser deutlich höher als im avaskulären Teil der Linse oder des Nucleus pulposus der Bandscheibe. Prinzipiell kann man bezüglich der Situation *in vivo* sagen, dass man von Hypoxie spricht, wenn die Sauerstoffzufuhr nicht mehr den Bedarf abdeckt, wenn also Angebot und Nachfrage nach Sauerstoff aus dem Gleichgewicht kommen. Da über den Sauerstoffbedarf der jeweiligen Zellen oder Gewebe in der jeweiligen Laborkonstellation wenig bekannt ist, gibt es dazu keine klar definierten Werte oder Tabellen. Außer den oben beschriebenen Konventionen von 1-2% Sauerstoff im umgebenden (Gas-)Medium, ist weiterhin bekannt, dass Zellen sich an den pO<sub>2</sub> ihrer Umgebung adaptieren können<sup>[77, 133]</sup>. Daher ist eine absolute Definition von Normoxie oder Hypoxie nicht möglich bzw. muss in den jeweiligen Bezug gesetzt werden<sup>[134, 135]</sup>. Da die meisten physiologischen Änderungen im Zell-Metabolismus jedoch frühzeitig vor dem Erreichen einer potenziell bedrohlich niedrigen Sauerstoffkonzentration von der Zelle erkannt werden, kann auch bei Änderungen von Sauerstoffkonzentrationen, die eine Veränderung im Metabolismus der Zelle hervorrufen wie beispielsweise veränderte HIF-1 $\alpha$ -Konzentrationen, von Hypoxie gesprochen werden<sup>[134]</sup>.

Der große Unterschied unserer *in vitro* Experimente zu den Verhältnissen *in vivo* ist die Tatsache, dass im arteriellen menschlichen Blut >98% des Sauerstoffs an Protein, genauer gesagt Hämoglobin, gebunden vorliegt<sup>[134]</sup>. Zirkulierende Monozyten sind daher im generellen Blutstrom an Sauerstoffpartialdrücke von mehr als 40 mmHg gewöhnt<sup>[40]</sup>. Im ersten Schritt unserer Blutaufbereitung werden sämtliche Erythrozyten per Dichtegradientenzentrifugation jedoch aussortiert. Damit wird das Gleichgewicht

zwischen Sauerstoffverbrauch der Zellen und der Sauerstoffanreicherung in der Umgebung, die durch die Reserve Hämoglobin bei gesunden physiologischen Verhältnissen aufrechterhalten wird, gestört.

In allen *in vitro* Experimenten hängt die Sauerstoffversorgung der Zellen allein vom physikalisch gelösten Sauerstoff im Medium ab. Dieser wiederum ist abhängig vom  $pO_2$  der Gasphase über dem Medium, der Löslichkeit des Sauerstoffs im Medium sowie der Diffusionsstrecke des Gases in der Flüssigkeit.

Die Löslichkeit eines Gases in Flüssigkeit wird vom Henry-Gesetz beschrieben: Die gelösten Gasteilchen in der Flüssigkeit sind proportional zum Gaspartialdruck darüber<sup>[136]</sup>. Dies wiederum bedeutet, dass in größeren Höhen weniger Gasteilchen in der Flüssigkeit gelöst werden, wie auf Höhe des Meeresspiegels. In unserem Fall liegt das Labor ungefähr 355m über NormalNull, was einem Druck (ungeachtet des Wettereinflusses) von etwa 97 kPa (730mmHg) entspricht. Im Inkubator werden 100% Luftfeuchtigkeit angestrebt, was bei 37°C einem Wasserdampfdruck von etwa 47mmHg entspricht. Die 5%  $CO_2$  entsprechen in unserem Labor demnach einem Partialdruck von 36,5mmHg. Letzteres und der Wasserdampfdruck werden von den insgesamt 730mmHg Luftdruck abgezogen (entsprechend dem Gesetz von Dalton<sup>[137]</sup>), um dann die 20,9% Sauerstoff in unserem Inkubator zu ermitteln. Dieser liegt demnach bei etwa 135 mmHg, was einer wahren Sauerstoffkonzentration von ungefähr 18,5% statt den bekannten 21% (die sich auf trockene Luft beziehen) entspricht (Rechnung entsprechend <sup>[134]</sup>).

Weiterhin geht in die Formel von Henry die sog. Henry-Konstante ein, die von Ionen und gelösten Proteinen, sowie der Temperatur beeinflusst wird<sup>[137]</sup>. Der Ionengehalt im Nährmedium, sowie der Proteingehalt durch zugesetzte 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) soll die Verhältnisse des Blutplasmas nachahmen. Im Inkubator beträgt die Temperatur 37°C und soll ebenfalls normothermen *In-vivo*-Verhältnissen nahekommen. Jedoch wird das Blut während unserer Aufbereitung zunächst bei 20°C, dann 10°C und schließlich 4°C zentrifugiert. Je geringer die Temperatur, desto mehr Sauerstoff kann sich physikalisch in Flüssigkeit lösen. Dahingehend ist die Gefahr zu beachten, dass Zellen durch Hyperoxie geschädigt werden können bis hin zu Apoptose-induzierenden Signalwegen<sup>[138]</sup>.

Den wohl eindrücklichsten Unterschied zwischen der *In-vivo*-Situation und der *In-vitro*-Situation stellt die Diffusionsstrecke dar. Diese entspricht im Experiment der Füllhöhe der Zellkulturplatten unter der Annahme, dass sich die Zellen der Schwerkraft folgend und ohne mechanisches Rühren oder Schütteln am Boden der Zellkulturplatte befinden<sup>[134]</sup>. Leider haben wir diesen Parameter nicht standardmäßig beachtet und dokumentiert, wir nehmen an, dass es sich um eine Füllhöhe zwischen 3 und 5 mm handelte. Diese Strecke muss von den Sauerstoffmolekülen durch Diffusion überwunden werden, jedoch wird Diffusion ab einer Strecke von ca. 100-200 µm ineffektiv, sofern keine Durchmischung der Flüssigkeit stattfindet. Dies bedeutet, dass unter diesen Bedingungen davon auszugehen ist, dass es zu einer perizellulären Hypoxie kommt, auch in „normoxischen“ Inkubator-Gasverhältnissen, zumal die Zellen selbst Sauerstoff verbrauchen.

In der Infektionssituation mit *E.coli* verbrauchen zudem die Bakterien Sauerstoff und durch die Inflammationsreaktion ist zunächst von erhöhtem Zellmetabolismus, demnach erhöhtem Sauerstoffbedarf der Zellen, auszugehen. Perizellulär dürfte somit in der Inflammation (wie auch im entzündeten Gewebe) durch den Mehrverbrauch eine hypoxischere Situation entstehen.

Wir haben in unseren Versuchen anfangs versucht die Hypoxie in einer Hypoxie-Werkbank zu simulieren, die im Gasgemisch 2% Sauerstoff und 5% CO<sub>2</sub> enthielt, die Wasserdampfsättigung sollte laut Hersteller gesättigt sein (jedoch ohne Messung der Letzteren). Zudem spielte wohl eine Rolle, dass die Zellen zu dieser Werkbank in ein anderes Labor gefahren werden mussten und zur Messung wieder zurück, was selbst auf Eis gelagert eine zu lange Zeit der Reoxygenierung bedeutet. Letztendlich konnten keine signifikanten Ergebnisse unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den „Normoxie“-Proben im üblichen Inkubator erzielt werden. Validere Messungen ergaben die Proben in einem luftdichten Behälter, der in den Inkubator gestellt wurde und mittels AnaeroGen™-Beutel innerhalb einer Stunde <0,1% Sauerstoff enthielt (laut Beschreibung des Herstellers). Dies bedeutet auch, dass innerhalb des Behälters keine wasserdampfgesättigte Luft enthalten war und auch der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebungsluft und nicht die Inkubator-Bedingungen herrschten. Hierbei kam es jedoch zu keiner wesentlichen Zeitverzögerung im Vergleich zu den Normoxie-Proben. Wenger et al. weisen auch darauf hin, dass jedes Mal, wenn die Inkubator-Tür geöffnet wird, es anschließend Minuten bis zu Stunden dauern kann, bis wieder die volle

Wasserdampfsättigung, 5% CO<sub>2</sub> und die korrekte Temperatur hergestellt sind<sup>[134]</sup>, was zur Reinigung der Zellkultur von *E.coli* bzw. der Hinzugabe von Antibiotikum nötig war. Dennoch wurde von uns nach der Konvention die Zeit der „Hypoxie“ ab dem Zeitpunkt der Einbringung in den Inkubator gemessen.

Eine direkte Messung des Sauerstoffgehalts im Zellmedium nahe der Zellen (am Boden der Zellkulturplatten) wäre wünschenswert gewesen entweder mit einem amperometrischen Sensor (auch bekannt als Clark-Elektrode)<sup>[139]</sup> oder einem potentiometrischen Sensor (der die pH-Änderung misst)<sup>[140]</sup>. Um den Sauerstoffgehalt des Zellkulturmediums dem des umgebenden Gasgemisches anzupassen, hätte das Zellkulturmedium steril in der Hypoxiewerkbank „ausgegast“ werden müssen, zeitgleich hätte dann Zellkulturmedium steril unter den Bedingungen des üblichen Inkubators ebenso behandelt werden müssen, was so aufgrund fehlender Sterilität im Inkubator nicht möglich wäre. Zudem wäre eine Möglichkeit, schneller und effektiver Hypoxie im Zellkulturmedium herzustellen die Verwendung einer Kobaltchlorid-Lösung (bspw. 100µM) gewesen<sup>[141]</sup>.

Zusammenfassend ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten, dass aufgrund mangelnder technischer Möglichkeiten nie die tatsächliche Sauerstoffkonzentration im Medium perizellulär gemessen wurde, dass wir eine möglichst geringe und einheitliche Füllhöhe der Zellkulturplatten nicht berücksichtigt hatten, dass die Zellen während der Phase des Aufreinigens abgekühlt und vor Trennung von den Erythrozyten möglicherweise eine kurzzeitige Hyperoxie erfahren haben, dass auch unter „normoxischen“ Bedingungen insbesondere unter Infektion mit *E.coli* eine gewisse perizelluläre Hypoxie nicht auszuschließen ist, dass im „Anoxie“-Behälter die Wasserdampfsättigung sowie der CO<sub>2</sub>-Gehalt nicht mit dem Inkubator übereinstimmte und zwar auf zügiges Ernten der Zellen nach Inkubation geachtet wurde, jedoch auch eine Enzymaktivität von Prolylhydroxylasen selbst nach Zellyse stattfindet<sup>[28]</sup>.

## 9.12 Limitationen der Ergebnisse

Neben den genannten Einschränkungen der Hypoxie/Anoxie-Versuche (Kapitel 9.11) durch die technischen, physikalischen und biologischen Gegebenheiten sind weitere Limitationen unserer Versuche zu bedenken.

In meinen Versuchen wurde die Vitalität der Zellen unter den verschiedenen Kulturbedingungen nicht getestet. Die Apoptoserate bzw. der prozentuale Anteil toter Zellen nach Setzen von PBMC in Zellkultur ohne weitere Stimuli war bei Pignata et al. in der Kontrollgruppe gesunder Kinder (10 Monate bis 12 Jahre) nach 72 Stunden gering mit 2,33 +/-0,41% Propidium-Iodid aufnehmender Zellen<sup>[142]</sup>. Eine vermehrte Apoptose von CBMC und PBMC nach 4 Stunden Anoxie konnte auch in unserer Arbeitsgruppe durch Kai Liu ausgeschlossen werden<sup>[143]</sup>, jedoch konnte unsere Arbeitsgruppe vor einigen Jahren auch zeigen, dass PB Monozyten nach Phagozytose von *E.coli* und Kultivierung für 24 Stunden eine erhöhte Apoptoserate zeigen im Gegensatz zu CB Monozyten (positiv selektiert)<sup>[130]</sup>. Es ist also davon auszugehen, dass in den 4-Stunden-Experimenten in Normoxie und Anoxie keine relevanten Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen adulten und neonatalen mononukleären Zellen bestehen, womöglich auch nicht in den über-Nacht-Experimenten mit 16 bis 22 Stunden Normoxie oder Anoxie. Jedoch ist es relativ wahrscheinlich, dass unter Infektion mit *E.coli* insbesondere bei den über-Nacht-Experimenten deutlich mehr adulte Zellen apoptotisch wurden als neonatale.

Weitere große unbekannte Parameter neben unklaren Sauerstoffleveln im Zellkulturmedium und der Anzahl apoptotischer Zellen bringt die Anonymität der Proben mit sich. Zwar versuchten wir Nabelschnurblut von offensichtlichen präpartalen Entzündungsgeschehnissen auszuschließen (wie grünes Fruchtwasser, bekanntes Amnioninfektionssyndrom etc.), jedoch wären weitere Informationen von Interesse wie beispielsweise Grunderkrankungen, Nikotin-Abusus, Medikamenteneinnahme der Schwangeren und intrauterine Wachstumsverzögerungen, bekannte Fehlbildungen oder genetische Erkrankungen des Neugeborenen wie beispielsweise Trisomie 21<sup>[144]</sup>. Der Ethikantrag, der dieser Arbeit zugrunde liegt, lässt jedoch nur eine anonyme Verwendung von Nabelschnurblut zu.

Eine weitere kritische Betrachtung betrifft die Wahl des *Housekeeping Genes* für die qPCR. Leider zeigte sich in meinen qPCR-Versuchen eine Schwankung des gewählten *Housekeeping Genes* RPL37A von mehr als 1-2 Zyklen und ist damit als solches nicht gut geeignet. Zudem wäre eine Vergleichbarkeit von Western Blot-Ergebnissen mit qPCR-Ergebnissen valider mit einem gleichen *Housekeeping Protein* und *Housekeeping Gene*, von mir wurde für den Western Blot GAPDH verwendet.

Weiterhin zeigte sich eine Abweichung der RPL37A-DNA-Menge von CBMC und PBMC. Im Mittel kam die Fluoreszenz bei CBMC um 1,73 Zyklen später als in PBMC, das bedeutet, dass in CBMC unter allen Bedingungen weniger RPL37A-DNA-Menge vorhanden war. Dieser Effekt wurde durch das Rechnen mit den Differenzen zwischen Zielgenen und Housekeeping-Gen relativiert.

Die Auswahl des RPL37A-Gens als *Housekeeping Gene* für unsere qPCR entstand in Verbindung mit einer Publikation von Maeß et al. über geeignete Referenz-Gene für die *real time* PCR in Monozyten/Makrophagen<sup>[74]</sup>. Maeß et al. befassten sich mit THP1-Zellen und wir uns mit primären Immunzellen verschiedener Individuen. Deshalb und aufgrund der genannten Ungenauigkeiten von RPL37A in CBMC und PBMC ist nachträglich diese Auswahl zu überdenken. Piehler et al. konnten zeigen, dass die qPCR-Ergebnisse LPS-stimulierter Monozyten je nach ausgewähltem Referenz-Gen schwanken<sup>[145]</sup> und empfehlen eine gut bedachte Auswahl. In den letzten Jahren kam man immer mehr davon ab, qPCR-Ergebnisse nur auf ein *Housekeeping Gene* zu beziehen, da die Schwankungen der Ergebnisse zu groß sind. Beispielsweise wäre bei einer erneuten Versuchsreihe in unserem Experiment die Suche eines Sets von Referenz-Genen mithilfe von Äquivalenz-Tests geeignet<sup>[146]</sup>.

### 9.13 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse zur HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation und Genexpression von neonatalen mononukleären Zellen und ihren Reaktionen auf Anoxie sowie auf Infektion mit *E. coli*.

Die gezeigte verminderte HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation in Anoxie und Infektion mit *E. coli* von neonatalen mononukleären Zellen kann als Erklärungsgrundlage für die teils verzögerte und überschießende Inflammationsreaktion Neugeborener dienen und damit die Anfälligkeit einer Neugeborenenensepsis mitbegründen. Unsere Daten können leider keine Kausalität beweisen, die einen Therapieansatz einer HIF-Aktivierung von außen als möglichen Schutz vor einer Neugeboreneninfektion zulassen würde. Zudem können unsere Daten nicht zeigen, dass der postnatal plötzlich stark ansteigende Sauerstoffpartialdruck eine deutlich veränderte Immunreaktion der mononukleären Zellen hervorruft. Dennoch mögen die neuen Erkenntnisse helfen, die Infektanfälligkeit Neugeborener besser zu verstehen.

---

Für eine wissenschaftliche Vollständigkeit müssten den hier vorgelegten Versuchen noch weitere Versuche folgen. Um die Frage zu beantworten, ob HIF-1 $\alpha$ -Defizienz in neonatalen mononukleären Zellen maßgeblich an einer erhöhten Infektanfälligkeit des Neugeborenen beteiligt ist, müssten neonatale mononukleäre Zellen nach Induktion des HIF-Signalwegs erneut auf Reaktion einer Infektion getestet werden, konkret, ob dann die Zytokinproduktion, T-Zell-Aktivierung und -Hemmung, ROS-Produktion oder Expression von Effektor-Enzymen (um nur einige Versuche zu Immunkompetenz und -regulation zu nennen) denen adulter mononukleärer Zellen gleichen. Von Interesse wäre auch die Kinetik der HIF-1 $\alpha$ -Regulation in Monozyten sowie die Aktivitätsraten der Prolylhydroxylasen. Im Infektionsmodell sollte aufgrund der engen funktionellen Verflechtungen der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B mitberücksichtigt werden.

Von hohem klinischem Interesse wäre die Untersuchung von frühgeborenen Monozyten und ihrer Reaktion auf Hypoxie und Infektion, die möglicherweise von denen reifer Neonaten abweicht. Hier ginge es in den Bereich der Single Cell Omics aufgrund ethisch noch vertretbarer kleiner Probengrößen.

Weiterhin müssten neben Monozyten auch die anderen Zellpopulationen in Betracht gezogen werden, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Granulozyten (neutrophile Granulozyten wurden von unserer Arbeitsgruppe untersucht<sup>[143]</sup>) und auch Stammzellen (CD34+), die im Blut Neugeborener verhältnismäßig vermehrt vorkommen. Die Funktion von MDSC jedenfalls wurde von unserer Arbeitsgruppe schon umfassend beleuchtet<sup>[147-153]</sup> (beispielhafte Zitationsauswahl).

## 10 Zusammenfassung

Die Neonatale Sepsis ist eine der wichtigsten Ursachen für neonatale Morbidität und Mortalität. Das Immunsystem des Neugeborenen muss vor der Geburt Toleranz gegenüber dem maternalen Organismus vermitteln und mit der Geburt zu der Aufgabe der Pathogenabwehr und gleichzeitigen Toleranz der Besiedlung durch Kommensale wechseln. Wie dieser Funktionswechsel ausgelöst und vollzogen wird, ist bislang nicht vollständig geklärt. Diese Arbeit ist der Frage nachgegangen, ob eine plötzliche Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes im Blut Neugeborener, wie sie mit den ersten Atemzügen stattfindet, mit einer Aktivierung bzw. Anpassung der Reaktion des angeborenen Immunsystems einhergeht. Hierzu wurde in einem Anoxie-Kultursystem ein bereits etabliertes *in-vitro*-Infektionsmodell mit *Escherichia coli* (*E.coli*) untersucht. Insbesondere wurde die Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) analysiert.

Aus Nabelschnurblut reifer Neugeborener und peripherem venösem Blut gesunder Erwachsener wurden mononukleäre Zellen isoliert und diese oder mittels magnetic activated cell sorting (MACS) weiter isolierte CD14+ Monozyten unter Normoxie und Anoxie mit *E.coli* infiziert. Die Proteinakkumulation von HIF-1 $\alpha$  und der Prolylhydroxylase II (PHDII) wurde mittels Westernblot ermittelt, die relativen mRNA-Mengen mittels real-time-PCR. In Monozyten wurden co-stimulatorische/co-inhibitorische Checkpointmoleküle für die T-Zell-Aktivierung, Zytokine und Effektor-Enzyme durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Expression eines der HIF-Zielgene, des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), wurde mittels ELISA untersucht.

Wir konnten unter anderem zeigen, dass in Anoxie CBMC signifikant weniger HIF-1 $\alpha$  akkumulierten als PBMC, was nicht von der Proteinmenge der Prolylhydroxylase II verursacht wurde. Die mRNA-Mengen spiegelten Reaktionen zur Wiederanpassung an ein Ausgangsniveau, das heißt HIF-1 $\alpha$ -mRNA wurde nicht verstärkt gebildet, aber EGLN1-mRNA, sowohl in CBMC als auch PBMC. Passend zum HIF-1 $\alpha$ -Gehalt der Zellen, wurde unter Anoxie von CBMC weniger VEGF sezerniert als von PBMC.

Nach Infektion mit *E.coli* akkumulierten CBMC signifikant weniger HIF-1 $\alpha$  als PBMC, was sich auf mRNA-Ebene widerspiegelte.

Die Funktion proinflammatorische Zytokine zu sezernieren war in CBMC im Vergleich zu PBMC uneingeschränkt. Co-stimulatorische/co-inhibitorische Oberflächenmoleküle

(CD80, CD86, PD-L1 und PD-L2) wurden vom Sauerstofflevel nicht wesentlich beeinflusst, lediglich PD-L2 war in Anoxie geringer auf CBMC exprimiert, ebenso Indolamin-2,3-Dioxygenase in Infektion.

Die Monozytensubpopulationen blieben unter Anoxie ähnlich, unter Infektion zeigten CBMC ein proinflammatorischeres Setting als PBMC.

Die aus intrauterin hypoxischem Milieu stammenden CBMC unterliegen vermutlich einer Adaptation an Hypoxie, sodass sie auf hypoxische bzw. anoxische Stimuli geringer mit einer HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation antworten, auch eingeschränkt unter Infektion mit *E.coli*, obwohl Hypoxie in infizierten Arealen einen wichtigen Stimulus für Immunzellen darstellt. Aus unseren Versuchen lässt sich ableiten, dass diese Adaptation an Hypoxie mehr als die postnatal erhöhte Sauerstoffsättigung einen Einfluss auf die neonatale Immunreaktion hat.

In unseren *in-vitro*-Versuchen sind neonatale mononukleäre Zellen dennoch in uneingeschränktem Maße fähig zu einer proinflammatorischen Antwort mit eingeschränkten regulatorischen Fähigkeiten. Diese Merkmale erklären teilweise die Anfälligkeit und die Folgeschäden neonataler Infektionen. Die Reaktion der angeborenen Immunität Frühgeborener dürfte noch etwas drastischer ausfallen.

## 11 Literaturverzeichnis

1. Fleischmann C, Reichert F, Cassini A, Horner R, Harder T, Markwart R, et al. Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2021;106(8):745-52.
2. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379(9832):2151-61.
3. Köstlin-Gille N, Härtel C, Haug C, Göpel W, Zemlin M, Müller A, et al. Epidemiology of Early and Late Onset Neonatal Sepsis in Very Low Birthweight Infants: Data From the German Neonatal Network. *Pediatr Infect Dis J*. 2021;40(3):255-9.
4. Wynn JL. Defining neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2016;28(2):135-40.
5. Sewell E, Roberts J, Mukhopadhyay S. Association of Infection in Neonates and Long-Term Neurodevelopmental Outcome. *Clin Perinatol*. 2021;48(2):251-61.
6. Jung E, Lee BS. Late-Onset Sepsis as a Risk Factor for Bronchopulmonary Dysplasia in Extremely Low Birth Weight Infants: A Nationwide Cohort Study. *Sci Rep*. 2019;9(1):15448.
7. Glaser K, Hartel C, Klingenberg C, Herting E, Fortmann MI, Speer CP, et al. Neonatal Sepsis Episodes and Retinopathy of Prematurity in Very Preterm Infants. *JAMA Netw Open*. 2024;7(7):e2423933.
8. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018;6(3):223-30.
9. Stoll BJ, Puopolo KM, Hansen NI, Sanchez PJ, Bell EF, Carlo WA, et al. Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of *Escherichia coli*, and the Need for Novel Prevention Strategies. *JAMA Pediatr*. 2020;174(7):e200593.
10. Mayor-Lynn K, Gonzalez-Quintero VH, O'Sullivan MJ, Hartstein AI, Roger S, Tamayo M. Comparison of early-onset neonatal sepsis caused by *Escherichia coli* and group B *Streptococcus*. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(5):1437-9.
11. Doenhardt M, Seipolt B, Mense L, Winkler JL, Thurmer A, Rudiger M, et al. Neonatal and young infant sepsis by Group B *Streptococci* and *Escherichia coli*: a single-center retrospective analysis in Germany-GBS screening implementation gaps and reduction in antibiotic resistance. *Eur J Pediatr*. 2020;179(11):1769-77.
12. Firth MA, Shewen PE, Hodgins DC. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim Health Res Rev*. 2005;6(2):143-58.
13. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol*. 2006;118(2-3):137-44.

14. De Biasi S, Neroni A, Nasi M, Lo Tartaro D, Borella R, Gibellini L, et al. Healthy preterm newborns: Altered innate immunity and impaired monocyte function. *Eur J Immunol.* 2023;53(5):e2250224.
15. Boly TJ, Bermick JR. Maternal-fetal tolerance: Not just a uterine affair. *J Leukoc Biol.* 2022;111(3):515-7.
16. Kostlin-Gille N, Gille C. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period. *Front Immunol.* 2020;11:584712.
17. Rackaityte E, Halkias J. Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Front Immunol.* 2020;11:588.
18. Doughty C, Oppermann L, Hartmann N-U, Dreschers S, Gille C, Orlikowsky T. Monocytes in Neonatal Bacterial Sepsis: Think Tank or Workhorse? *BioChem.* 2022;2(1):27-42.
19. Mackay CA, Nathan EA, Porter MC, Shrestha D, Kohan R, Strunk T. Epidemiology and Outcomes of Neonatal Sepsis: Experience from a Tertiary Australian NICU. *Neonatology.* 2024;121(6):703-14.
20. Henry CJ, Semova G, Barnes E, Cotter I, Devers T, Rafeae A, et al. Neonatal sepsis: a systematic review of core outcomes from randomised clinical trials. *Pediatric Research.* 2022;91(4):735-42.
21. Morton SU, Brodsky D. Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clin Perinatol.* 2016;43(3):395-407.
22. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sanchez-Illana A, Nunez-Ramiro A, Kuligowski J, Chafer-Pericas C, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* 2017;12:674-81.
23. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem.* 1996;271(50):32253-9.
24. Wolff M, Jelkmann W, Dunst J, Depping R. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1beta) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(4):849-58.
25. Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 2007;18(12):4691-7.
26. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-8.
27. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32.
28. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5516):468-72.

29. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510-4.
30. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):12969-73.
31. Wiesener MS, Maxwell PH. HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe? *Ann Med*. 2003;35(3):183-90.
32. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996;271(51):32529-37.
33. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*. 2002;295(5556):858-61.
34. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):1-15.
35. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*. 2001;21(12):3995-4004.
36. Dehne N, Hintereder G, Brune B. High glucose concentrations attenuate hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression and signaling in non-tumor cells. *Exp Cell Res*. 2010;316(7):1179-89.
37. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23111-5.
38. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. 2005;2005(306):re12.
39. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem*. 1997;378(7):609-16.
40. Fangradt M, Hahne M, Gaber T, Strehl C, Rauch R, Hoff P, et al. Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):R181.
41. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J*. 2016;283(3):413-24.
42. Bandarra D, Biddlestone J, Mudie S, Muller HA, Rocha S. HIF-1 $\alpha$  restricts NF-kappaB-dependent gene expression to control innate immunity signals. *Dis Model Mech*. 2015;8(2):169-81.
43. Chamboredon S, Ciais D, Desroches-Castan A, Savi P, Bono F, Feige JJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2011;22(18):3366-78.

44. Crosson L, Kroes RA, Moskal JR, Linsenmeier RA. Time Course of Hypoxia Inducible Factor-1 alpha (HIF-1) mRNA and Protein Levels in Rat Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005;46(13):5172-.
45. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol*. 1998;274(2):L212-9.
46. Elbarghati L, Murdoch C, Lewis CE. Effects of hypoxia on transcription factor expression in human monocytes and macrophages. *Immunobiology*. 2008;213(9):899-908.
47. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH)2015. p. 161-7.
48. Shaikh RA, Zhong JH, Lyu MJ, Lin S, Keskin D, Zhang GL, et al. Classification of Five Cell Types from PBMC Samples using Single Cell Transcriptomics and Artificial Neural Networks. *IEEE Int C Bioinform*. 2019:2207-13.
49. Schroeder JT, Bieneman AP. Isolation of Human Basophils. *Curr Protoc Immunol*. 2016;112:7.24.1-7..8.
50. El Hokayem J, Cukier HN, Dykxhoorn DM. Blood Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, Challenges and the Road Ahead. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2016;6(5).
51. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*. 1996;81(5):404-9.
52. Prabhu SB, Rathore DK, Nair D, Chaudhary A, Raza S, Kanodia P, et al. Comparison of Human Neonatal and Adult Blood Leukocyte Subset Composition Phenotypes. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162242.
53. Paloczi K. Immunophenotypic and functional characterization of human umbilical cord blood mononuclear cells. *Leukemia*. 1999;13 Suppl 1:S87-9.
54. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol*. 2020;37:101759.
55. Coillard A, Segura E. In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front Immunol*. 2019;10:1907.
56. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(1):52-60.
57. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5:514.
58. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49(4):595-613.

59. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol.* 2021;51(12):2708-3145.
60. Williams H, Mack C, Baraz R, Marimuthu R, Naralashetty S, Li S, et al. Monocyte Differentiation and Heterogeneity: Inter-Subset and Interindividual Differences. *Int J Mol Sci.* 2023;24(10).
61. Quinello C, Silveira-Lessa AL, Ceccon ME, Cianciarullo MA, Carneiro-Sampaio M, Palmeira P. Phenotypic differences in leucocyte populations among healthy preterm and full-term newborns. *Scand J Immunol.* 2014;80(1):57-70.
62. Sansom DM, Walker LSK. Dimers Aren't Forever: CD80 Breaks up with PD-L1. *Immunity.* 2019;51(6):972-4.
63. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 2003;24(6):314-9.
64. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027-34.
65. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261-8.
66. Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res.* 1995;74(4):1057-65.
67. Schmidt SV, Schultze JL. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Front Immunol.* 2014;5:384.
68. Schultz-Burton MD, Meier C, Freeman S, Kearney P, Boulanger B, Chang P, et al. Peripheral monocyte arginase overexpression in human systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Journal of the American College of Surgeons.* 2005;201(3):S29.
69. Byrne A, Reen DJ. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol.* 2002;168(4):1968-77.
70. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
71. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:7.
72. Boyum A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. *Lymphology.* 1977;10(2):71-6.
73. Inc. AB. Four Parameter Logistic (4PL) Curve Calculator 2025 [updated 2025-03-10. Available from: <https://www.aatbio.com/tools/four-parameter-logistic-4pl-curve-regression-online-calculator>.

74. Maess MB, Sendelbach S, Lorkowski S. Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. *BMC Mol Biol.* 2010;11:90.
75. Mazure NM, Brahim-Horn MC, Berta MA, Benizri E, Bilton RL, Dayan F, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):971-80.
76. Winning S, Splettstoesser F, Fandrey J, Frede S. Acute hypoxia induces HIF-independent monocyte adhesion to endothelial cells through increased intercellular adhesion molecule-1 expression: the role of hypoxic inhibition of prolyl hydroxylase activity for the induction of NF-kappa B. *J Immunol.* 2010;185(3):1786-93.
77. Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(12):4745-50.
78. Föhling M, Persson AB, Klinger B, Benko E, Steege A, Kasim M, et al. Multilevel regulation of HIF-1 signaling by TTP. *Mol Biol Cell.* 2012;23(20):4129-41.
79. Askenase MH, Han SJ, Byrd AL, Morais da Fonseca D, Bouladoux N, Wilhelm C, et al. Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity.* 2015;42(6):1130-42.
80. Lin Q, Cong X, Yun Z. Differential hypoxic regulation of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha. *Mol Cancer Res.* 2011;9(6):757-65.
81. Taylor CT, Scholz CC. The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(9):573-87.
82. McGettrick AF, O'Neill LAJ. The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab.* 2020;32(4):524-36.
83. Wang T, Liu H, Lian G, Zhang SY, Wang X, Jiang C. HIF1alpha-Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9029327.
84. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature.* 2013;496(7444):238-42.
85. Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol.* 2007;178(12):7516-9.
86. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):553-65.
87. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 2005;7(1):77-85.
88. Wen H, Ting JP. Agitation by suffocation: how hypoxia activates innate immunity via the Warburg effect. *Cell Metab.* 2013;17(6):814-5.

89. Dreschers S, Ohl K, Lehrke M, Mollmann J, Denecke B, Costa I, et al. Impaired cellular energy metabolism in cord blood macrophages contributes to abortive response toward inflammatory threats. *Nat Commun.* 2019;10(1):1685.
90. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20534-43.
91. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107(1):43-54.
92. D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C. Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38183-7.
93. Metzen E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J.* 2005;387(Pt 3):711-7.
94. Damasceno D, Teodosio C, van den Bossche WBL, Perez-Andres M, Arriba-Mendez S, Munoz-Bellvis L, et al. Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(1):320-3 e6.
95. Murphy FJ, Reen DJ. Differential expression of function-related antigens on newborn and adult monocyte subpopulations. *Immunology.* 1996;89(4):587-91.
96. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.* 2014;289(1-2):135-9.
97. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol.* 2007;82(2):244-52.
98. Radzyukevich YV, Kosyakova NI, Prokhorenko IR. Participation of Monocyte Subpopulations in Progression of Experimental Endotoxemia (EE) and Systemic Inflammation. *J Immunol Res.* 2021;2021:1762584.
99. Tak T, Drylewicz J, Conemans L, de Boer RJ, Koenderman L, Borghans JAM, et al. Circulatory and maturation kinetics of human monocyte subsets in vivo. *Blood.* 2017;130(12):1474-7.
100. Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol.* 2002;55(6):629-38.
101. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care.* 2009;13(4):R119.
102. Hikita N, Cho Y, Tachibana D, Hamazaki T, Koyama M, Tokuhara D. Cell surface antigens of neonatal monocytes are selectively impaired in basal expression, but hyperresponsive to lipopolysaccharide and zymosan. *J Reprod Immunol.* 2019;136:102614.

103. Dreschers S, Ohi K, Schulte N, Tenbrock K, Orlikowsky TW. Impaired functional capacity of polarised neonatal macrophages. *Sci Rep.* 2020;10(1):624.
104. Grozdics E, Berta L, Gyarmati B, Veres G, Zadori D, Szalardy L, et al. B7 costimulation and intracellular indoleamine 2,3-dioxygenase expression in umbilical cord blood and adult peripheral blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(10):1659-65.
105. Doedens AL, Phan AT, Stradner MH, Fujimoto JK, Nguyen JV, Yang E, et al. Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol.* 2013;14(11):1173-82.
106. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
107. Tak T, van Groenendael R, Pickkers P, Koenderman L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun.* 2017;9(5):464-74.
108. El Sehmawy AA, Abdul-Mohymen AM, Seliem N, Elamir RY, Ibrahim HF, Mahmoud NA, et al. Study of Monocyte Subsets and Their Surface Expression of CD86 and Serum IL-17 Compared to Serum Procalcitonin as Markers of Early Neonatal Sepsis. *Infect Drug Resist.* 2021;14:5375-82.
109. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med.* 2014;211(5):781-90.
110. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res.* 2014;74(3):665-74.
111. Mimura K, Teh JL, Okayama H, Shiraishi K, Kua LF, Koh V, et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(1):43-53.
112. Galbraith NJ, Walker SP, Gardner SA, Bishop C, Galandiuk S, Polk HC, Jr. Interferon-gamma increases monocyte PD-L1 but does not diminish T-cell activation. *Cell Immunol.* 2020;357:104197.
113. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(31):11695-700.
114. Xiong J, Yang J, Sun Y, Chen Y, Guo Y, Liu C, et al. Dysregulated PD-L2 is correlated with disease activity and inflammation in rheumatoid arthritis. *Immunogenetics.* 2023;75(5):425-31.
115. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001;193(7):839-46.
116. Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med.* 2003;197(9):1083-91.
117. Rudd BD. Neonatal T Cells: A Reinterpretation. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:229-47.

118. Iliodromiti Z, Anastasiadis A, Varras M, Pappa KI, Siristatidis C, Bakoulas V, et al. Monocyte function in the fetus and the preterm neonate: immaturity combined with functional impairment. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:753752.
119. Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Moller JC, Bucsky P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res.* 2002;51(3):317-22.
120. Sullivan G, Galdi P, Cabezas MB, Borbye-Lorenzen N, Stoye DQ, Lamb GJ, et al. Interleukin-8 dysregulation is implicated in brain dysmaturation following preterm birth. *Brain Behav Immun.* 2020;90:311-8.
121. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, Bescher N, Mourcin F, et al. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis.* 2010;201(6):956-66.
122. Molnar K, Riedel H, Schwarz J, Dietz S, Spring B, Haag L, et al. Group B streptococci infection model shows decreased regulatory capacity of cord blood cells. *Pediatr Res.* 2022;92(5):1407-16.
123. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1117-33.
124. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D'Amore PA. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn.* 2001;220(2):112-21.
125. Hoeres T, Wilhelm M, Smetak M, Holzmann E, Schulze-Tanzil G, Birkmann J. Immune cells regulate VEGF signalling via release of VEGF and antagonistic soluble VEGF receptor-1. *Clin Exp Immunol.* 2018;192(1):54-67.
126. Itaya H, Imaizumi T, Yoshida H, Koyama M, Suzuki S, Satoh K. Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):171-6.
127. Kim CO, Huh AJ, Kim MS, Chin BS, Han SH, Choi SH, et al. LPS-induced vascular endothelial growth factor expression in rat lung pericytes. *Shock.* 2008;30(1):92-7.
128. Glaser K, Silwedel C, Waaga-Gasser AM, Henrich B, Fehrholz M, Claus H, et al. Ureaplasma isolates differentially modulate growth factors and cell adhesion molecules in human neonatal and adult monocytes. *Cytokine.* 2018;105:45-8.
129. Hajjghasemi F, Gheini MH. Lipopolysaccharide Effect on Vascular Endothelial Factor and Matrix Metalloproteinases in Leukemic Cell Lines In vitro. *Iran J Cancer Prev.* 2015;8(3):e2327.
130. Leiber A, Graf B, Spring B, Rudner J, Kostlin N, Orlikowsky TW, et al. Neonatal monocytes express antiapoptotic pattern of Bcl-2 proteins and show diminished apoptosis upon infection with Escherichia coli. *Pediatr Res.* 2014;76(2):142-9.
131. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992;12(12):5447-54.

132. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):4089-96.
133. Stiehl DP, Wirthner R, Koditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem.* 2006;281(33):23482-91.
134. Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl).* 2015;3:35-43.
135. Place TL, Domann FE, Case AJ. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:311-22.
136. Avishay DM TK. Henry's Law: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Updated 2023 Jan 29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544301/>.
137. Chandan G CM. Gas Laws and Clinical Application. Treasure Island (FL) Updated 2023 Aug 28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546592/>.
138. Romashko J, 3rd, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, et al. MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(8):978-93.
139. Davis PD, Parbrook GD, Kenny GNC. CHAPTER 18 - Oxygen Measurement. In: Davis PD, Parbrook GD, Kenny GNC, editors. *Basic Physics and Measurement in Anaesthesia (Fourth Edition)*: Butterworth-Heinemann; 1995. p. 235-49.
140. Meruva RK, Meyerhoff ME. Catheter-type sensor for potentiometric monitoring of oxygen, pH and carbon dioxide. *Biosensors and Bioelectronics.* 1998;13(2):201-12.
141. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp.* 2011(54).
142. Pignata C, Fiore M, de Filippo S, Cavalcanti M, Gaetaniello L, Scotese I. Apoptosis as a mechanism of peripheral blood mononuclear cell death after measles and varicella-zoster virus infections in children. *Pediatr Res.* 1998;43(1):77-83.
143. Liu K. The effect of anoxia on functions of neonatal monocytes and neutrophils: Eberhard Karls Universität Tübingen; 2021.
144. Bordon Y. Immune dysregulation in Down syndrome. *Nat Rev Immunol.* 2023;23(4):201.
145. Piehler AP, Grimholt RM, Ovstebo R, Berg JP. Gene expression results in lipopolysaccharide-stimulated monocytes depend significantly on the choice of reference genes. *BMC Immunol.* 2010;11:21.
146. Curis E, Nepost C, Grillault Laroche D, Courtin C, Laplanche JL, Etain B, et al. Selecting reference genes in RT-qPCR based on equivalence tests: a network based approach. *Sci Rep.* 2019;9(1):16231.
147. Köstlin-Gille N, Gille C. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period. *Front Immunol.* 2020;11:584712.

148. Kostlin N, Kugel H, Spring B, Leiber A, Marme A, Henes M, et al. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur J Immunol.* 2014;44(9):2582-91.
149. Kostlin N, Vogelmann M, Spring B, Schwarz J, Feucht J, Hartel C, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells from human cord blood modulate T-helper cell response towards an anti-inflammatory phenotype. *Immunology.* 2017;152(1):89-101.
150. Kostlin N, Schoetensack C, Schwarz J, Spring B, Marme A, Goelz R, et al. 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.* 2018;9:1098.
151. Schwarz J, Scheckenbach V, Kugel H, Spring B, Pagel J, Hartel C, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period. *Clin Exp Immunol.* 2018;191(3):328-37.
152. Dietz S, Schwarz J, Vogelmann M, Spring B, Molnar K, Orlikowsky TW, et al. Cord blood granulocytic myeloid-derived suppressor cells impair monocyte T cell stimulatory capacity and response to bacterial stimulation. *Pediatr Res.* 2019;86(5):608-15.
153. Schwarz J, Rühle J, Stephan K, Dietz S, Geißert J, Schoppmeier U, et al. Targeted deletion of HIF-1 $\alpha$  in myeloid cells of neonatal mice: decreased accumulation of myeloid-derived suppressor cells and altered microbiome. *European Journal of Immunology.* 2023;53.

## 12 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätskinderklinik Tübingen, Abteilung IV Neonatologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr.med. Christian Gille durchgeführt.

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

Nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr.rer.nat. Bärbel Spring) und durch Mitarbeiter der AG Schneidawind (Hildegard Keppeler, Dr.rer.nat. Kathy-Ann Secker) wurden sämtliche Versuche von mir durchgeführt. Frau Dr.rer.nat. Bärbel Spring unterstützte mich bei der Etablierung von Versuchsmethoden.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Herrn Prof. Dr.med. Christian Gille durch mich.

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

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

Tübingen, den 31.07.2025

Unterschrift

\_\_\_\_\_

Christiane Busch

## 13 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Christiane Schlegel, Kai Liu, Bärbel Spring, Stefanie Dietz, Christian F. Poets, Hannes Hudalla, Trim Lajqi, Natascha Köstlin-Gille, Christian Gille

„Decreased expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in cord blood monocytes under anoxia“

in Pediatric Research von SpringerNature, 29.07.2022, Band 93, S. 870-877

## 14 Danksagung

Herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr.med. Christian Gille für die wissenschaftliche Neugier, die er in mir geweckt hat, für die gute Betreuung, Zusammenarbeit und für die spannenden Diskussionen. Ein ebenso großer Dank gilt Dr.rer.nat. Bärbel Spring für die Einführung in die Laborarbeit, die gute Arbeitsatmosphäre, die wunderbare Betreuung, Unterstützung und Zusammenarbeit.

Prof. Dr.med. Natascha Köstlin-Gille danke ich herzlich insbesondere für die Hilfe bei der Veröffentlichung des Papers.

Für die Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre sowie Rat und Tat geht ein großer Dank an die gesamte Arbeitsgruppe, allen voran Dr.rer.nat. Stefanie Dietz-Ziegler.

Herzlich danken möchte ich der AG Schneidawind, im Speziellen Hildegard Keppeler und Dr.rer.nat. Kathy-Ann Secker-Grob für die Einweisung, Hilfsbereitschaft, Beratung und Unterstützung, sowie Nutzung der Laboreinrichtung für die Durchführung der Real-Time PCR. Herzlichen Dank der AG Koch aus der Frauenklinik Tübingen und Herrn Schmidt der Genetik Tübingen für die Mitnutzung der Laborgeräte und -einrichtung, einschließlich des FACS-Geräts und der Western-Blot-Geräte. Herzlichen Dank Prof. Dr.rer.nat. Gerd Klein für die Hilfsbereitschaft und Mitnutzung der Laboreinrichtung im „Waldhörnle“. Herzlichen Dank der AG Mirakaj, insbesondere Frau Hoch-Gutbrod, für die Hilfsbereitschaft und Mitnutzung sowie Einweisung in die Arbeit mit der Hypoxiebank.

Für die Annahme als Stipendiatin und die finanzielle Unterstützung des Projektes danke ich dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF).

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Eltern, die eingewilligt haben unsere Forschung mit Nabelschnurblut zu unterstützen.

Herzlichen Dank allen Bekannten und Freunden für die großzügige Bereitschaft als Kontrollgruppe Blut zu spenden, um meine Doktorarbeit zu ermöglichen.

Von Herzen danke ich meiner Familie für die große Unterstützung und Motivation für meine Doktorarbeit, den Rückhalt auch während schwieriger Phasen und während der gesamten Studienzeit.