

Aus der Universitäts-Kinderklinik der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

**Phänotypische und funktionelle
Charakterisierung von CD4⁺CD25⁺
“regulatorischen T-Zellen aus dem
Nabelschnurblut**

INAGURAL – DISSERTATION

Zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

Vorgelegt 2006

Von Gonza Balbina NGOUMOU
Geboren in Osnabrück

Dekan: Prof. Dr. Peters
1. Gutachter: PD Dr. M. Kopp
2. Gutachter: PD Dr. C. Schempp

Jahr der Promotion 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Immunologische Mechanismen der allergischen Sensibilisierung	5
1.2 Immunologische Situation des Neugeborenen	6
1.3 TH1/TH2-Balance: Antigen-Präsentierende Zellen	8
1.4 TH1/TH2-Balance: Zytokine	9
1.5 TH1/TH2-Balance: Regulatorische T-Zellen	11
1.6 Fragestellung	13
2. Methoden	14
2.1 Rekrutierung der Probandenpopulation	14
2.2 Gewinnung von Nabelschnurblut	15
2.3 Isolation von mononuklären Zellen über Dichtezentrifugation	15
2.4 Separation der CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T-Zellen	18
2.5 Proliferationsassay	24
2.6 Kulturansätze zur Quantifizierung von Zytokinen mittels ELISA	25
2.7 Durchflusszytometrie	27
2.8 Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Isolation CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T-Zellen: Reinheit, Ausbeute	31
3.2 Proliferationsantwort CD4 ⁺ /CD25 ⁺ Zellen	43
3.3 Zytokinexpression CD4 ⁺ /CD25 ⁺ Zellen	44
3.4 Oberflächenmarker CD4 ⁺ /CD25 ⁺ Zellen	47
4. Diskussion	49
4.1. Methodische Aspekte bei der Isolation CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T-Zellen	52
4.2. Proliferationsantwort CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T-Zellen	53
4.3. Zytokinproduktion CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T-Zellen	54
4.4. Oberflächenmarker von CD4 ⁺ /CD25 ⁺ T-Zellen	57
4.5. Ausblick	60
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64
7. Anhang	71

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Antigen presenting cells= antigen-präsentierende Zellen
BLG	Betalactoglobulin (Kuhmilchprotein)
CD	Cluster of differentiation
Ci	Curie
Cpm	Counts per minutes
DC	Dendritische Zelle
CBMC	Cord blood mononuclear cells (mononukleäre Nabelschnurblutzellen)
Der p 1	Dermatophagoides pteronyssinus = Majorallergen der Hausstaubmilbe
DMSO	Di-metyl-sulf-oxid
ELISA	Enzym-linked-immuno-Assay
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FEIA	Fluoro-Enzyme-Immuno-Assay
FSC	Vorwärtsstreuulich (Durchflusszytometrie)
IEMA	Immuno-Enzym-Metrischer-Assay
IFN γ	Interferon γ
Ig E	Immunglobulin der Klasse E
IL	Interleukin
MAF	Makrophagen-aktivierender Faktor
ML	Magnettrennungs-Lumineszens-Immuno-Assay
MPS	Monozytäres-Phagozyten-System
NK	Natürliche Killerzelle
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweißprotein)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen aus peripherem Blut)
PBS	Phosphor buffert saline
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Assay
RPMI	Kulturmedium, enthält : Penicillin / Streptomycin / L – Glutamin / FCS
SI	Stimulationsindex
SK	Spearman Korrelations-Koeffizient
SSC	Seitwärtsstreuulich (Durchflusszytometrie)
SSW	Schwangerschaftswoche
TH	T-Helferzelle
UCC	Ultra culture medium complete

1. Einleitung

Die Häufigkeit allergischer Erkrankungen im Kindesalter hat in den vergangenen Jahrzehnten in den Industrienationen zugenommen (Taylor 1984, Ninan 1992, Rimpelä 1995, Ring 2000). Die Prävalenz des Asthma bronchiale bei Kindern und Jugendlichen beträgt in Deutschland circa 10%, der allergischen Rhinitis 15% und für das atopische Ekzem (Atopisches Ekzem Dermatitis Syndrom AEDS) 13% (ISAAC 1998). Atopischen Krankheitsbildern liegt oft eine allergische Sensibilisierung zu Grunde. Erwachsene in Mitteleuropa reagieren bei der Allergietestung am häufigsten gegen Gräserpollen (12,7%), Hausstaubmilben (8,9%) und Birkenpollen (7,9%) (Wüthrich 1995). In einer Population von 1470 Kindern im Alter von 6-8 Jahren wurde in Süddeutschland eine Sensibilisierungs-Prävalenz von 10,3% gegenüber Hausstaubmilbenallergen (Der p) gefolgt von Gräserpollen (9,8%), dem Hausstaubmilbenallergen *D. farinae* (7,8%), Katzenepithel (7,1%), Birkepollen (5,9%), Hundepithel (3,1%) und Haselpollen (3,0%) beobachtet (Kopp 1995).

1.1. Immunologische Mechanismen der allergischen Sensibilisierung

Die Differenzierung von $CD4^+$ T-Helferzellen (TH) in TH2 Zellen und deren Produktion der Zytokine IL-4 und IL-13 stellen die ersten Schritte für die spätere IgE-Bildung dar (Renz 1995). Nach der Sekretion bindet allergenspezifisches IgE an Rezeptoren, insbesondere an den hochaffinen IgE-Rezeptor ($Fc\epsilon RI$) auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Ein erneuter Allergenkontakt führt bei sensibilisierten Patienten zu einer Kreuzvernetzung zweier IgE-Moleküle und damit zur Freisetzung von Mediatoren, die für die klinische Symptomatik der Typ I – Reaktion verantwortlich sind. Die zelluläre Interaktion in der Entwicklung der IgE-vermittelten Immunantwort ist in Abbildung 1.1 schematisch zusammengefaßt.

1.2 Immunologische Situation des Neugeborenen

Für das Verständnis der frühen Mechanismen bei der Allergieentstehung ist entscheidend, daß alle Neugeborenen bei Geburt zunächst ein TH2 Zytokinmuster aufweisen (Prescott 1999, Kopp 2001). Bereits während der Schwangerschaft ist sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen eine Verschiebung der T-Helferzellpopulation der Mutter mit einer vermehrten Produktion der TH2-Zytokine und einer gegenläufig verminderten Produktion der TH1-Zytokine zu beobachten (Wegmann 1993, Piccinni1996). Dieser Mechanismus ist sinnvoll, da eine zytotoxische TH1-Immunantwort Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert und damit für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ungünstig ist. Im Tierversuch führt die Gabe von IL-2 und IFN- γ zu einer gesteigerten Abortrate. Auch beim Menschen gibt es Evidenz dafür, daß sich eine TH1-Immunität ungünstig auf den Verlauf der Schwangerschaft auswirken kann. So wurde bei Frauen mit einer erhöhten Spontanabortrate im Vergleich zu Frauen mit normalem Schwangerschaftsverlauf eine erhöhte Konzentration an TH1-Zytokinen gefunden (Makhseed 1999, Raghupathy 2001).

Die mütterliche TH-2-dominierte Zytokinproduktion übt wahrscheinlich einen Einfluß auf die fetale Immunreaktivität in Richtung TH-2 –Zytokinproduktion aus (Herz 2000). Offenbar bildet sich das initiale TH-2-Zytokinmuster bei Neonaten, die keine Atopie entwickeln, während der ersten zwei Lebensjahre zurück. Im Gegensatz dazu persistiert in verstärkter Weise bei solchen Neonaten das initiale TH-2 Zytokinmuster über den 18. Lebensmonat hinaus, die in diesem Zeitraum eine atopische Erkrankung entwickeln (Prescott 1997, Prescott 1999).

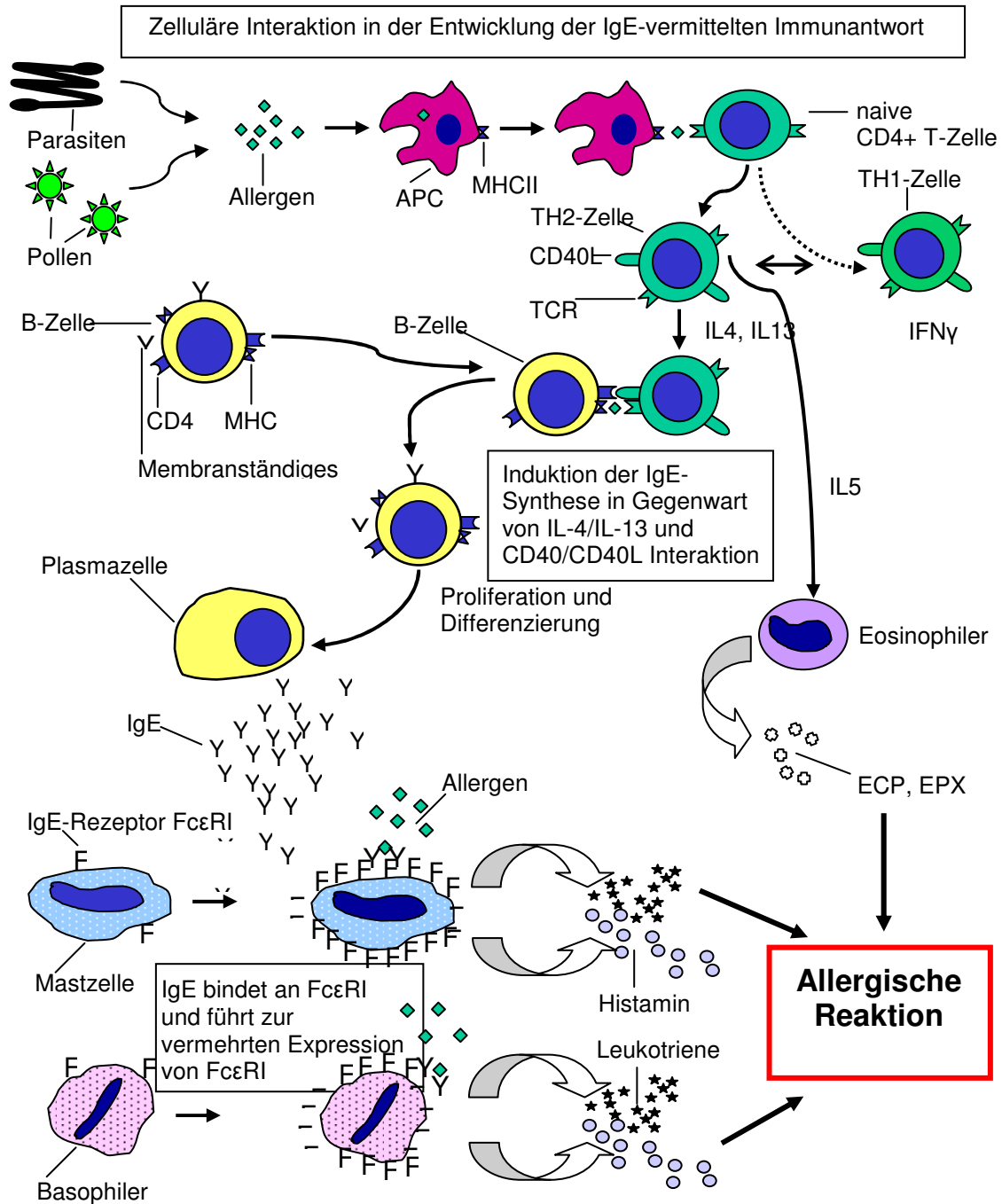


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der wichtigsten zellulären Interaktionen bei der Ausbildung der IgE-assoziierten Immunantwort [modifiziert nach Leonard 1999].

Bisher ist es jedoch nicht gelungen, eindeutige Zytokinmuster bei Geburt zu definieren, die einen Vorhersagewert für eine spätere Sensibilisierung oder die Entwicklung einer atopischen Erkrankung haben. Beschrieben sind Assoziationen von erniedrigten Konzentrationen des TH-1 Zytokins Interferon- γ (Rinas 1993, Tang 1994, Kondo N 1998) sowie erhöhte Konzentrationen des TH-2 Zytokins IL-13 im Nabelschnurblut mit einem erhöhten Atopie-Risiko (Ohshima 2002, Lange 2003). Die Ausprägung des TH2-Zytokinmusters und dessen Persistenz über die ersten Lebensjahre muß jedoch als Initialgeschehen in der Pathogenese atopischer Erkrankungen betrachtet werden. Damit stellt sich die Frage, welche Faktoren in Richtung einer TH1- oder TH2-Antwort polarisieren.

1.3 TH1/TH2-Balance: Antigen-Präsentierende Zellen

In den letzten Jahren ist dabei intensiv die Rolle der Antigen-präsentierenden Zellen, insbesondere der Dendritischen Zellen (DZ) untersucht worden. DZ als funktionell potenteste APZ sind entscheidend für die Induktion der primären Immunantwort und die Initiierung der T-Zell-Immunität in-vivo verantwortlich (Nowak 1999). Für DZ wird angenommen, daß in Abhängigkeit spezifischer Vorläuferzellen unterschiedliche Subtypen existieren, die sich u.a. in der Expression von Oberflächenmarkern (u.a. Expression des CD11c Integrins) unterscheiden. Dabei induzieren die sogenannten DZ1-Zellen eine TH1-Immunantwort, wohingegen DZ2 eine TH2-Immunantwort induzieren (Kapsenberg 1999).

DZ haben eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung naiver CD4⁺ T Zellen und CD8⁺ T-Zellen. Das Erkennen von MHC-Peptid Komplexen auf DZ durch antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TZR) stellt das „Signal 1“ der DZ-T-Zell Interaktion dar. Im weiteren ist das „Signal 2“ zur Unterhaltung der T-Zell-Aktivierung

nötig, wobei es sich um die Interaktion zwischen kostimulatorischen Molekülen, die von DZ exprimiert werden und ihren Liganden auf der T-Zell Oberfläche handelt.

In Abhängigkeit von der DZ Subpopulation werden verschiedene Zytokine produziert welche bestimmen, ob anschließend eine TH-1- oder die TH-2-Antwort generiert wird („Signal 3“). Beim Menschen polarisieren $CD11c^+$ DZ (DZ1) naive T-Helfer-Zellen vornehmlich in Richtung eines TH-1-Profiles, wohingegen $CD11c^-$ DZ (DZ2) die T-Zelle vor allem zur Produktion und Freisetzung von TH-2-typischen Zytokinen stimulieren (Macatonia 1995). Der DZ kommt jedoch nicht nur eine regulative Funktion bei der Festlegung der TH1 oder TH2-Zellantwort zu, sondern sie sind möglicherweise auch für die Ausprägung regulatorischer T-Zellen mit verantwortlich (Jonuleit 2001b). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine repetitive Stimulation von naiven $CD4^+$ T-Zellen mit allogenen, immaturren DZ zur Differenzierung von T-Zellen mit den unten beschriebenen regulatorischen Eigenschaften (Treg) führt (Jonuleit 2000).

1.4 TH1/TH2-Balance: Zytokine

Die regulatorischen Mechanismen, die für das Zustandekommen und die Balance des TH1/TH2-Zytokinmilieus verantwortlich sind, werden jedoch nicht ausschließlich von der Interaktion von T-Zellen mit APZ gesteuert. Zunächst wurde die Regulation von unterschiedlichen $CD4^+$ T-Zellen den verschiedenen T-Zellsubpopulationen selbst zugeschrieben. Demnach üben TH1- bzw. TH2-Klonen gegenseitig einen negativen Regulationseffekt aufeinander aus. Hierfür spricht, daß $IFN-\gamma$ als klassischer Vertreter eines TH1-Zytokins das Wachstum von TH2-Klonen hemmt (Gajewski 1988). Umgekehrt wurde das TH-2-Zytokin IL-10 als Inhibitor der TH-1-Zytokine beschrieben (Fiorentino 1989).

In den vergangenen Jahren wurden weitere Zytokine identifiziert, die einen regulativen Einfluß auf die T-Zellantwort ausüben. Hierzu zählt Interleukin-18, ursprünglich als IFN- γ induzierender Faktor beschrieben (Okamura 1995). Bereits im Nabelschnurblut läßt sich IL-18 auf Proteinebene nachweisen (Pacora 2000, Ngoumou 2004). Erhöhte IL-18 Konzentrationen finden sich im Rahmen der Neugeborenenensepsis aber auch jenseits des Neugeborenenalters bei viralen und bakteriellen Infektionen (Sareneva 1998, Pirhonen 1999, Vankayalapati 2000). IL-18 hat neben der Funktion als IFN- γ induzierender Faktor auch das Potential, die Produktion von IL-13 von NK-Zellen und T-Zellen zu stimulieren (Hoshino 1999). Tierexperimentelle Daten zeigen, daß IL-18 unabhängig von allergenen Stimuli zu einer erhöhten IgE Produktion führt. Bei Erwachsenen mit Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis fand man erhöhte IL-18 Konzentrationen (El-Mezzein 2001, Tanaka 2001). Diese Daten weisen darauf hin, daß IL-18 eine kritische immunmodulatorische Rolle im Rahmen der allergischen Sensibilisierung zukommt. Auch bei Neonaten konnte gezeigt werden, daß in einem in-vitro-Modell IL-18 einen signifikanten Anstieg der IFN- γ Konzentration nach Stimulation mit dem Mitogen Phytohämagglutinin und dem Kuhmilchprotein BLG bewirkt. Unter identischen Kulturbedingungen wurde jedoch keine vermehrte IL-13 Freisetzung beobachtet (Ngoumou 2004). Offenbar ist IL-18 im Nabelschnurblut ein potenter Induktor einer TH1 Immunantwort. Möglicherweise besteht die Funktion von IL-18 bei Neugeborenen insbesondere in der Induktion der IFN- γ Synthese. Dies würde bedeuten, daß IL-18 für die Ausbildung einer TH1 Antwort während der ersten Lebensjahre eine zentrale Rolle zukommt (Ngoumou 2004).

Neben IL-18 greifen auch andere Zytokine wie IL-12 und IL-10 regulativ in die TH1/TH2 Balance ein. Für die Polarisierung der T-Zellantwort stellt sich die Frage, ob sich Zellpopulationen charakterisieren lassen, die z.B. durch den Einfluß von

Zytokinen oder durch direkten T-T-Zell-Kontakt einen regulativen Einfluß auf T-Zellen ausüben.

1.5 TH1/TH2-Balance: Regulatorische T-Zellen

Vor wenigen Jahren gelang es zunächst Sakaguchi und Mitarbeitern, eine eigene Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen im Mausmodell mit regulatorischen Eigenschaften zu charakterisieren (Sakaguchi 1995). Diese CD4⁺ Subpopulation weist nur eine geringe Fähigkeit zur Proliferation auf und ist in der Lage, hohe Konzentrationen an IL-10 aber kaum IL-2 und kein IL-4 zu produzieren. Die als T-regulatory Cells 1 bezeichneten Zellen verhindern darüber hinaus eine antigen-spezifische Proliferation von CD4⁺ Zellen und verhindern im Mausmodell die Entwicklung einer Colitis ulcerosa (Groux 1997).

Nachdem zunächst im Tiermodell eine Subpopulation von CD4⁺T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben wurde, konnten Jonuleit und Enk aus peripherem Blut beim Menschen eine Population von CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften (T_{reg}) isolieren (Jonuleit 2001a). Diese T-Zellen exprimieren die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25⁺) sowie CD45RO, Histokompatibilitäts-Leukozyten-Antigen (HLA-) DR und das intrazelluläre zytotoxische T Lymphozyten-Assoziierte Antigen 4 (CTLA-4). Diese Zellen expandieren nicht nach Stimulation und unterdrücken die Expansion von konventionellen T-Zellen. Darüber hinaus produzieren sie offenbar kein IL-2, IL-4 oder TGF- β sondern lediglich IL-10.

Die Elimination von T_{reg} im Tiermodell führt zur Induktion von Autoimmunerkrankungen, wie u.a. einer Autoimmungastritis oder -thyroiditis (Sakaguchi 1995). Offenbar ist die Suppression der autoreaktiven T-Zellantwort eine herausragende Aufgabe von CD4⁺/CD25⁺ T_{reg} (Sakaguchi 1996).

Für die allergische Entzündungsreaktion ist entscheidend, daß T_{reg} auch im Asthma-Mausmodell eine regulative Funktion aufweisen. So sind in Ovalbumin- (OVA) sensibilisierte Mäuse transferierte IL-10 produzierende $CD4^+$ T-Zellen in-vivo in der Lage, die Entwicklung einer bronchialen Hyperreaktivität zu verhindern. In-vitro verhindern diese Zellen die Proliferation OVA-spezifischer T-Zellen. Diese inhibitorischen Effekte von T_{reg} lassen sich durch Zugabe von anti-IL-10 abschwächen. Die Autoren leiten aus diesen Befunden die Hypothese ab, daß T_{reg} maßgeblich an der Toleranzentwicklung gegenüber Allergenen in den Atemwegen beteiligt sind (Akbari 2002).

Die Peripartalzeit ist eine besonders interessante Phase um diese eine $CD4^+/CD25^+$ T-Zell-Subpopulation weiter phänotypisch und funktionell zu charakterisieren: Wie oben beschrieben, lassen sich bereits bei Geburt unterschiedliche TH-Populationen identifizieren, deren Polarisierung hypothetisch unter dem Einfluß regulatorischer T-Zellen stehen könnte. Möglicherweise kommt dieser neu beschriebenen Subpopulation von T-Zellen damit nicht nur in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantations-immunologie eine entscheidende Rolle zu. T_{reg} spielen hypothetisch auch bei der Auseinandersetzung mit einer Reihe von Antigenen, die über Inhalation oder Ingestion aufgenommen werden eine entscheidende Rolle, indem sie eine chronische Aktivierung des Immunsystems mit entsprechender Entzündungsreaktion regulieren.

1.6 Fragestellung

Auf dem Hintergrund der oben dargestellten Arbeiten ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

- 1) Lassen sich CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen im Nabelschnurblut isolieren?
- 2) Welche Methode eignet sich hierbei am besten?
- 3) Welchen Anteil haben CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen im Nabelschnurblut?
- 4) Proliferieren CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen im Nabelschnurblut nach Stimulation mit allergenspezifischen bzw. allergenunspezifischen Stimuli? Unterscheiden sich CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen hierbei von mononukleären Zellen?
- 5) Welche Zytokine produzieren CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen im Nabelschnurblut?

2. Methoden

2.1 Rekrutierung der Probandenpopulation

Die Rekrutierung der Studienpopulation erfolgte über die geburtshilflichen Kliniken in Freiburg. Die Eltern wurden über die Freiwilligkeit der Teilnahme informiert und um ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Untersuchung und an den Blutentnahmen gebeten. Für die vorliegende Untersuchung lag ein positives Ethikvotum der Universitätsklinik Freiburg vor.

Zur Aufnahme der Familie in die Untersuchung sollten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Bereitschaft von Vater und Mutter zur Durchführung der Blutentnahmen.
- Vorliegende Einverständniserklärung zur Gewinnung und Verarbeitung der Nabelschnurblutprobe.
- Unkomplizierte Schwangerschaft und unkomplizierte termingerechte Geburt.

Da eine homogene Population von gesunden Neonaten rekrutiert werden sollte, wurden folgende Ausschlußkriterien vor Studienbeginn definiert, die potentiell die T-Zell-Reaktivität beeinflussen:

- Frühgeborene vor Vollendung der 37. Gestationswoche, Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht (< 2500g) (Steinborn 1999)
- Kinder mit Neugeboreneninfektionen, Beatmungspflichtigkeit, Stoffwechselstörungen und schweren Organfehlbildungen (z.B. Herzfehler, Spaltfehlbildungen), Chromosomenaberrationen (Berner 1998, Coalson 1999, Steinborn 1999).

- mütterliche Erkrankung während der Schwangerschaft (Gestosen, Eklampsie, Infektionen) (Gratacos 1998)
- Z.n. Sterilitätsbehandlung oder Hormonbehandlung (Piccinni 1996)
- chronische Grunderkrankung der Mutter (Autoimmunerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Vaskulitiden, Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, M. Crohn, Colitis ulcerosa etc.) (Niessner 1995), Neoplasien (Economou 1988), chronische Entzündungen (u.a. HIV (Dallalio 1999), chronische Hepatitis (Bertoletti 1997), etc.)
- Alkoholabusus (Cao 1998)
- Einnahme von Corticoiden während der Schwangerschaft (Kavelaars 1999).

2.2 Gewinnung von Nabelschnurblut

Wir entnehmen das Nabelschnurblut aus der Placenta maximal 30 Minuten nach der Geburt. Das Abnahme System besteht aus einem Blutbeutel (150 ml Abnahmebeutel mit 30 ml NaCl), der durch ein Schlauchsystem mit einer Nadel verbunden ist. Zur Heparinisierung spritzen wir vor der NSB-Entnahme 2 ml Canusal[®](steriles Natrium-Heparin; 100 IE/ml; CP Pharmaceuticals Ltd Wrexham, UK) in Beutel und Schlauchsystem herein. Die Nabelschnurgefäße werden steril punktiert. Durch den Höhenunterschied von der in einem Abnahmegeßel befindlichen Plazenta und den Entnahmebeuteln wird ein Gefälle aufgebaut. Es konnten auf diese Weise minimal 30 bis maximal 70 ml Placentarestblut gewonnen werden.

2.3 Isolation von mononuklären Zellen über Dichtezentrifugation

Die Isolierung von Zellen ist der erste Schritt, um Untersuchungen zur Zellfunktion durchführen zu können. Eine effiziente Art zur Separation von Blutzellen ist die Zelltrennung mittels Dichtezentrifugation. Bei der Dichtezentrifugation werden die

Zellen während der Zentrifugation in dem Dichtebereich stabilisiert, der ihrer eigenen Dichte entspricht. Als wässrige Lösungen mit erhöhter Dichte können Saccharoselösungen dienen. Die Dichte der in Frage kommenden mononukleären Zellen, d.h. vorwiegend von Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten variiert in Abhängigkeit von der Species, der Organherkunft, dem Differenzierungs- und Aktivierungsgrad zwischen 1.04 und 1.14 g/ml. Das menschliche Plasma hat eine Dichte von etwa 1.03 g/ml. Die mononukleären Zellen stabilisieren sich unter Anwendung eines entsprechenden Gradienten bei etwa folgenden Dichten:

Monozyten und Lymphozyten ~ 1.08 g/ml

Neutrophile ~ 1.12 g/ml

Neutrophile und Eosinophile ~ 1.13 g/ml

Eosinophile ~ 1.14 g/ml

Um diese Zellen sauber voneinander zu trennen, wäre die relativ aufwendige Herstellung eines kontinuierlichen bzw. mehrfach gestuften Gradienten nötig. Um lediglich Monozyten und Lymphozyten von den übrigen Blutzellen zu trennen, kann ein einfacher, diskontinuierlicher, einstufiger Gradient verwendet werden: Die Trennlösung wird auf der Basis von Ficoll hergestellt. Dies ist ein neutrales, hochverzweigtes, hydrophiles Polymer aus

Saccharose mit einem Molekulargewicht von etwa 400 000 Dalton. Die entsprechende Dichte, Osmolarität und der pH werden durch Zugabe von Natriumdiatrizoat ($C_{11}H_{8}I_3N_2O_4Na$) eingestellt. Für die Isolation von Lymphozyten aus Blut sind optimierte Trennlösungen mit der Dichte 1.077 g/ml kommerziell erhältlich. Diese Trennlösung wird sehr vorsichtig mit verdünntem, heparinisiertem Blut überschichtet. Während der Zentrifugation erfolgt die Auftrennung der Zellpopulationen in diesem Gradienten. Während die leichten Thrombozyten in der Plasmaphase verbleiben, reichern sich die Lymphozyten und Monozyten in der

weißlich erscheinenden Phase zwischen Plasma und Ficoll (Interphase) an. Die Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren durch die Ficollschicht und bilden das sogenannte Pellet ("Klümpchen" am Gefäßboden). Die Interphase kann mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgezogen werden. Die Zellpopulation wird anschließend noch 2 Mal mit PBS gewaschen, um Ficollreste abzutrennen.

Damit der Erfolg und die Ausbeute der Separation dokumentiert werden können, wird anschliessend eine Vitalfärbung mit Hilfe der Trypanblaumethode durchgeführt. Trypanblau dringt durch die geschädigte Zellmembran toter Zellen und färbt diese selektiv an, während die lebenden Zellen ungefärbt bleiben. Mit einer Zählkammer nach Neubauer kann der Anteil lebender und toter Zellen ermittelt werden. Die Zählkammer weist 4 Großquadrate mit einer Fläche von 1 mm^2 auf, die in 16 kleinere Quadrate eingeteilt sind. Das Deckglas liegt genau 0.1 mm über der Fläche auf und schließt so über einem Großquadrat (GQ) ein Volumen von 0.1 mm^3 ($= 0.1 \text{ } \mu\text{l}$) ein. Um die Zellkonzentration pro ml ($1000 \text{ } \mu\text{l}$) zu bestimmen, muß die in dem Großquadrat ermittelte Zellzahl mit 10^4 multipliziert werden. Die Verdünnung durch die Zugabe von Trypanblau oder andere Vorverdünnungen müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt ($50 \text{ } \mu\text{l}$ Zellsuspension + $50 \text{ } \mu\text{l}$ Trypanblau), wird die Zellkonzentration folgendermaßen errechnet:

$$\text{Mittelwert pro GQ} \times 10^4 \times 2 = \text{Zellen pro ml}$$

Die Separation von mononukleären Zellen mit Hilfe der Gradientenzentrifugation dient als Vorbereitung für weitere Schritte, wie die Markierung der Lymphozyten mit Antikörpern für die weitere Reinigung der Zellfraktionen (z.B. mit Antikörpern an magnetic beads).

2.4 Separation der CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen

Im folgenden werden die unterschiedlichen Methoden beschrieben, die zur Separation CD4⁺/CD25⁺ Zellen angewandt wurden. Dabei wurde zunächst die CD4⁺ Zellpopulation nach den unten beschriebenen Verfahren isoliert, in einem zweiten Schritt dann die CD25⁺ Zellpopulation. In einigen Vorversuchen wurde diese Reihenfolge umgekehrt, allerdings wurde hier eine derart schlechte Ausbeute und Reinheit der CD4⁺/CD25⁺ Zielpopulation erreicht, daß diese Herangehensweise nicht weiter verfolgt wurde.

Isolierung der CD4⁺-Zellen mittels AutoMacs

Die gewonnenen mononukleären Zellen werden mit FITC-Anti-CD4-Antikörpern markiert (für 1×10^7 Zellen in 100 µl Puffer, 10 µl FITC-AK; Inkubation bei 2 – 8°C für 20 Min). Anschließend erfolgt die Markierung mit Anti-FITC-MACS-Antikörper (10 µl MACS-Antikörper für 1×10^7 Zellen in 100 µl Puffer; Inkubation für 15 Min. bei 6° C). Nach 2 Waschschritten werden die Zellen im AutoMacs sortiert. Dabei bleiben die CD4⁺-Zellen in der Magnetsäule hängen und werden anschließend eluiert. Die Magnete werden anschließend durch MACS-Release Reagent und MACS-Stop Reagent entfernt. Dafür werden die positiv magnetisch markierten Zellen mit 20 µl MACS MultiSort Release Reagent pro ml Zellsuspension für 10 Min bei 6-12°C inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift wird die Reaktion mit 30 µl MACS MultiSort Stop Reagent für 1×10^7 Zellen gestoppt. Die Zellen können nun dem zweiten Isolierungsschritt unterzogen werden.

Isolierung der CD25⁺-Zellen mittels AutoMacs

Die CD4⁺-Zellpopulation wird mit Anti-CD25-Microbeads (10 µl MACS-Antikörper für 1 x 10⁷ Zellen in 100µl Puffer; Inkubation für 15 Min. bei 6°C) inkubiert. Nach 2 Waschschritten werden die Zellen im AutoMacs in Magnet-markierte CD25⁺ und nicht magnetische CD25⁻-Zellen sortiert.

Isolierung der CD4⁺-Zellen mittels HandMacs

Das Isolationsprinzip ist das gleiche. Die nicht CD4⁺-Zellen (B-Zellen, Monocyten, NK-Zellen, Zytotoxische T-Zellen, dendritische Zellen, Erythrozyten-Vorläuferzellen, Thrombozyten und basophile Granulozyten) werden durch einen Hapten-konjugierten Antikörper-Cocktail (CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, und CD56) markiert. Anschließend werden die markierten Zellen an einen Magnet-markierten monoklonalen Anti-Haptenantikörper gekoppelt und im magnetischen Feld einer magnetischen Zell-Isolationssäule (LS MACS-column) zurückgehalten, während die nicht magnetmarkierten CD4⁺-Zellen durchfließen und für weitere Experimente verwendet werden können.

Im folgenden soll das genaue Protokoll beschrieben werden:

Alle Angaben gelten für eine Zellzahl von 1x10⁷ Zellen.

Es werden benötigt:

- 20 µl Hapten Antibody-Cocktail (MACS CD4⁺ T Cell Isolation Kit, human, Order No. 130-053-101, Miltenyi Biotec)
- 20µl Anti-Hapten Microbeads (MACS CD4⁺ T Cell Isolation Kit, human, Order No. 130-053-101, Miltenyi Biotec)
- Puffer (PBS + 0,5%FCS + 5mM EDTA; pH 7,2)
- Magnetic separator MiniMACS, LS Separation Columns (MACS, Miltenyi Biotec)

Die über Dichtezentrifugation isolierten mononuklären Zellen werden zunächst mit Puffer gewaschen. Es folgt die Markierung mit dem Hapten Antikörper-Cocktail: das Zellpellet wird in 80 µl Puffer + 20 µl Hapten AK-Cocktail aufgelöst, gut gemischt und für 10 Minuten bei 6 bis 12 °C inkubiert. Die Zellen werden anschließend zwei Mal mit Puffer gewaschen und zentrifugiert (Zentrifugeneinstellung: 8 Min, 1300rpm, 4 °C). Nun erfolgt die Markierung mit Anti-Hapten-Microbeads. Die Zellen werden in 80 µl Puffer und 20 µl Anti-Hapten-Microbeads aufgenommen. Die Inkubationszeit beträgt 15 Minuten bei 6 bis 12 °C. Es folgt ein Waschschrift mit Zentrifugation. Nachdem der Überstand dekantiert wurde werden die Zellen in 500 µl Puffer aufgenommen und durch die MACS-column gegeben.

Die magnetische Säule und der Präseparationsfilter müssen vorher adäquat präpariert werden durch Spülen mit 3 ml Puffer.

Die Zellsuspension wird nun über die Säule gegeben. Anschließend sollte mit 3 x 3 ml Puffer nachgespült werden. Dann wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die CD4⁻ Zellen können elektiv mit 3,5 ml Puffer eluiert werden. Die Zellen werden zentrifugiert, in Medium aufgenommen und die Zellzahl wird unter dem Mikroskop, wie oben beschrieben, bestimmt.

Die Reinheit der Zellen kann mittels FACS-Analyse ermittelt und für weitere Experimente und Untersuchungen verwendet werden.

Isolierung der CD25⁺-Zellen mittels HandMACS

Hier werden die CD25⁺-Zellen mit einem Magnet-gekoppelten CD25-Antikörper (CD25 Microbeads) markiert und anschließend über eine magnetische Säule gegeben. Das ausführliche Protokoll sieht wie folgt aus:

Benötigte Materialien:

- 20 µl CD25-Microbeads (Order No. 130-090-445, MACS, Miltenyi Biotec)

- Puffer (PBS + 0,5%FCS + 5mM EDTA; pH 7,2)
- Magnetic separator MiniMACS, MS Separation Columns (MACS, Miltenyi Biotec)
- Diese Angaben sind für 1×10^7 CD4⁺-Zellen gültig

Die isolierten CD4⁺-Zellen werden in 80 µl Puffer und 20 µl CD25 Microbeads für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden anschließend ein Mal gewaschen und zentrifugiert und in 500 µl Puffer aufgenommen. Wie oben bereits beschrieben werden die Zellen über die magnetische Säule gegeben. Während die markierten CD25⁺-Zellen im Magnetfeld hängen bleiben, fließen die CD25⁻ Zellen durch die Säule durch.

Die Zellen werden mikroskopisch gezählt und über FACS-Analyse wird die Reinheit bestimmt.

Isolierung der CD4⁺-Zellen mittels Dynabeads[®]

Eine weitere Möglichkeit der CD4-Zellisolierung besteht in der Depletion oder negativen Selektion aller nicht CD4⁺-T-Helferzellen. Diese Zellpopulation, die kein CD4 exprimiert umfasst zytotoxische T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten, Thrombozyten, Erythrozyten-Vorläuferzellen und Natürliche Killerzellen. Dabei werden diese durch einen Antikörper-Cocktail (auch Antibody-Mix bestehend aus: CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, HLA DR und CD56 *oder* CD14, CD56 , CD8 und CD19 mit optionalem CD45RA micro-Antibody), markiert. Diese Antikörper werden wiederum mit Magneten (Dynabeads[®]) markiert. Die Zellen werden anschließend in ein magnetisches Feld (DynaL MPC[®]) gestellt. Die unmagnetischen Zellen bleiben in Lösung und werden eluiert, während die magnetmarkierten Zellen an die Magnet-nahe Wand des Röhrchens wandern.

Folgende Beschreibung gilt für eine Menge von 1×10^7 mononukleäre Zellen.

Es werden benötigt:

- 100 µl Dynabead[®] (CD4 Negative Isolation Kit, Prod.No.: 113.17 from Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway)
- 20 µl Antibodymix[®] (CD4 Negative Isolation Kit, Prod.No.: 113.17 from Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway)
- 20 µl FCS
- Puffer (PBS + 0,1% FCS); (PBS Dubelcco's, GIBCO[™])
- Dynal MPC[®] - 1 (Dynal[®], Oslo, Norway)

Zunächst werden die magnetischen Antikörper („magnetic beads“) gewaschen, d.h. das Reagenzröhrchen wird mit Puffer aufgefüllt und in einen Magneten gestellt. Die „beads“ wandern zur magnetischen Seite und der Überstand kann vorsichtig abgenommen werden. Die magnetischen Antikörper werden anschließend in 100 µl Puffer aufgenommen. 1×10^7 mononukleäre Zellen werden dann ebenfalls in 100 µl Puffer aufgenommen und mit 20 µl FCS und 20 µl Antibodymix für 10 Minuten bei 4° Celsius inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschrift mit Puffer wird das gut resuspendierte Zellpellet in 0,9 ml Puffer aufgenommen. Die Hälfte der magnetischen Antikörper (magnetic beads) (50 µl) wird dazu gegeben (das gesamte Volumen für 1×10^7 Zellen + magnetic beads soll 1 ml betragen). Nun werden Zellen und magnetische Antikörper für 15 Minuten auf einem Rolator bei 20°C inkubiert. Anschließend wird das Reagenzröhrchen in den Magneten gestellt und die mit magnetischen Antikörper markierten Zellen wandern automatisch zu der magnetischen Seite des Reagenzröhrchen. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und in ein neues steriles Reagenzröhrchen überführt. Die restlichen magnetischen Antikörper werden zugegeben und die Prozedur wird wiederholt.

Der abgezogene Überstand enthält die CD4⁺-Zellen. Die Reinheit dieser Zellen kann mittels FACS-Analyse ermittelt werden und die Zellen werden für weitere spezifische Isolationsschritte oder Kulturansätze verwendet.

Isolierung der CD25⁺-Zellen mittels Dynabeads®

Analog zur negativen Zellisolierung bei der CD4⁺-Zellisolierung mittels Dynabeads®, werden die Zellen mit CD25-Dynabeads® markiert und in ein starkes Magnetfeld (Dynal MPC®) gestellt. Die markierten Zellen wandern zur magnetischen Seite während alle nicht markierten Zellen in Lösung bleiben. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette entfernt um die mit Magneten markierten Zellen nicht aufzuwirbeln. Die Zellen werden anschließend gewaschen und erneut in den Magneten gestellt. Zum Schluß werden sie in 100 µl Medium (UCC) pro 1×10^7 Zellen resuspendiert.

Den resuspendierten Zellen wird nun 10 µl / 1×10^7 eingesetzten CD25-Dynabeads® DETACHaBEAD® (DETACHaBEAD® CD4/CD8, Prod.No. 125.04, Dynal Biotec, Oslo, Norway) dazu gegeben. Die Inkubation erfolgt bei leichtem Schütteln und Drehen für 45 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die markierten Zellen werden erneut in ein Magnetfeld gestellt. Erneut wandern die mit magnetischen Antikörpern markierten Zellen zur Magnetwand. Aber diesmal ohne die CD25⁺-Zellen, denn diese wurden durch die DETACHaBEAD von den Magneten gelöst. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und die Zellen werden 2 Mal mit Medium gewaschen.

Zuletzt erfolgt die Zellzählung, die FACS-Analyse zur Bestimmung der Reinheit und anschließend werden die Zellen für funktionelle Tests eingesetzt.

2.5 Proliferationsassay

Die CD4⁺/CD25⁺ und CBMC Zellen werden in unterschiedlichen Verhältnissen zu einander eingesetzt. Für die Proliferationsmessung werden die Zellen mit 50 000 und 25 000 Zellen pro Well in einer 96 Wellplatte, in 3-facher Ausführung in Kultur gesetzt. Die Zellen werden mit 20 U/Well Interleukin 2 (IL-2) stimuliert und reine Zellsuspension dient als Negativkontrolle. Die optimale Inkubationsdauer beträgt 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ / 95% O₂ (Kopp 2000).

Nach 7 Tagen Inkubation wird den Zellen 0,4 µCi / Well (entspricht 0,4 µl der Stocklösung in einer Verdünnung von 1:50) steriles radioaktivmarkiertes Thymidin (³H-Thymidin) zugegeben und erneut für 16 h bei 37°C und 5% CO₂ / 95% O₂ inkubiert. Beabsichtigt wird hiermit der Einbau von ³H-Thymidin in das Erbmateriale der sich vermehrenden Zellen. Die anschließend gemessene Radioaktivität ist proportional zur Zellvermehrung. Nach 16 h Inkubation werden die Zellen entweder direkt geerntet oder bei -20° C tiefgefroren um den Einbau von radioaktivem Material in die Zellen zu stoppen. Das Ernten („harvesten“) der Zellen erfolgte dann nach Auftauen der Zellen.

Hierzu stand das Cell Harvester System zur Verfügung, bei dem mittels einer Unterdruck-Saugvorrichtung und destilliertem Wasser der Inhalt der je 96 wells auf einen ebenfalls 96-well großen Filter gebracht werden kann. Die Zell-Kultur-Platten wurden einen Tag vorher zum Auftauen aus dem Gefrierschrank genommen und das Harvester System zu Beginn gründlich durchgespült. Anschließend wurden die Filterplatten vor der Messung über Nacht getrocknet.

Um die optimale Strahlungsdetektion zu gewährleisten, mussten die Filterplatten mit der für den β-Counter vorgesehenen Szintillationsflüssigkeit für getrocknete Filter - in diesem Fall Mikroszint O - betropft werden. Dazu wurde zunächst der Plattenboden mit einem dafür vorgesehenem Klebepapier abgedichtet, um ein Versickern der

Flüssigkeit zu verhindern. Nachdem in jedes well 20 µl der Szintillationsflüssigkeit pipettiert worden waren, wurde schließlich auch die Filteroberfläche mit einem durchsichtigem Klebefilm versehen. Nun konnten die Filter durch den β -Counter geschickt und dessen Ergebnisse ausgedruckt werden. Für die weitere Datenanalyse wurden jeweils Mittelwerte der erhaltenen Counts pro Minute (cpm) aus den drei Stimulationsansätzen errechnet.

Der Stimulationsindex (SI) wird aus der Ratio spezifisch stimulierter und unstimulierter Zellen errechnet ($SI = \text{cpm stimulierter Zellen} / \text{cpm unstimulierter Zellen}$). Ein $SI > 2$ wird allgemein definiert als eine positive Proliferationsantwort auf einen Stimulus (Kopp 2000).

2.6 Kulturansätze zur Quantifizierung von Zytokinen mittels ELISA

Isolierte $CD4^+CD25^+$ und CBMC wurden für die Stimulationsansätze im Verhältniss 1:1 und 1:4 eingesetzt. Die Zellsuspensionen werden in einer 96 Wellplatte mit 100 000 Zellen / well in 2-facher Ausführung mit Phythämagglutinin (PHA, 4 µg/well) als unspezifisches Mitogen und Betalactoglobulin (BLG, 5 µg/well) als allergenspezifischer Stimulus und Medium alleine als Negativkontrolle stimuliert.

Die Überstände (120 – 150 ml) werden nach 48 h bei Stimulation mit PHA und nach 5 Tagen bei Stimulation mit BLG abgezogen und zunächst eingefroren. Später werden unterschiedliche Zytokine (IL-10, TGF- β , IL-13, IFN- γ) mittels ELISA bestimmt.

Der „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) wird in der Regel angewendet um einen Stoff (im ng/ml- oder pg/ml-Bereich) quantitativ in einer Lösung (z.B. Serum, Urin oder Kultur-Überstände) zu bestimmen. Wir interessierten uns für die

Konzentration folgender Zytokine in den Überständen der stimulierten Zellen: IL-10, IL-13, TGF- β und Interferon-gamma (IFN- γ).

Benötigte Materialien:

- Eine ELISA 96 well Platte (mit Flachem Boden)
- „Capture Antibody“ (Anti-humane monoklonale Antikörper)
- „Detection Antibody“ (biotinylierte anti-humane monoklonale Antikörper)
- Enzym Reagent („Avidine horseradish peroxidase conjugate“)
- Standards (der zu bestimmende Stoff, rekombinant human, in bekannten Konzentrationen)
- Coating buffer (0,1 M Carbonate, pH 9,5, 8,40g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃)
- Assay Diluent (PBS mit 10% FCS, pH 7,0)
- Wasch Puffer (PBS mit 0,05%Tween-20)
- Substratlösung (Tetramethylbenzidine = TMB und Hydrogen Peroxide)

Zunächst werden die Löcher der ELISA-Platte, mit je 100 μ l Capture Antibody (in Coating Buffer verdünnt) beschichtet. Die Platte wird über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die unfixierten Antikörper heraus gewaschen worden sind werden die freien Bindungsräume mit Assay Diluent blockiert (Inkubation mit 100 μ l Assay diluent pro well für 1 h bei Raumtemperatur). Die Platte wird erneut gewaschen.

Jetzt werden die Standards und Proben zugegeben, 100 μ l /well. Bei zu hohen Konzentrationen sollten die Proben mit Assay diluent verdünnt werden. Die Platte wird erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Als nächstes wird die Platte drei mal gewaschen um die nicht gebundenen Anteile des zu messenden Stoffes heraus zu waschen. Es folgt die Markierung des bereits gebundenen zumessenden Stoffes mit einem Enzym-gebundenen Antikörper (Detection Antikörper + Enzym Reagent, 100 μ l/well, für 1 h bei Raumtemperatur). Nach einem letzten Waschsritt wird 100 μ l Substrat pro Well zugegeben, es erfolgt

eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Das Substrat wird vom Enzym gespalten und ändert dadurch seine Farbe. Die Substratspaltung wird nach 30 Minuten durch Zugabe der Stop-Lösung unterbrochen.

Als letzter Schritt wird die Absorption bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Je größer die Absorption, desto mehr Substrat wurde vom gebundenen Enzym gespalten, desto mehr zu messenden Stoff befindet sich in der Lösung.

Um die genaue Stoffkonzentration zu bestimmen werden die Absorptionswerte der bekannten Standardkonzentrationen zu einer Standardkurve zusammengefügt. Aus den neu bestimmten Absorptionen wird die korrespondierende Stoffkonzentration durch Vergleich mit der Standardkurve bestimmt.

2.7 Durchflusszytometrie

In einem Durchflusszytometer wird eine Zellsuspension durch einen Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm geführt. Die Zellen reflektieren in Abhängigkeit vom Zelltyp, den ausgesandten Laserstrahl mit unterschiedlicher Deviation und Wellenlänge zurück. Diese Veränderungen werden von speziellen Detektoren gemessen. Auf diese Weise können mehrere Parameter einer Zelle erfasst werden:

- Die Größe der Zelle, gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichtes (Vorwärtsstreulicht = Kanal FSC)
- Die relative Granularität oder innere Komplexität der Zelle; hier werden Lichtbrechung und Reflexion in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen (Seitwärtsstreulicht = Kanal SSC)
- Die spezifische Fluoreszenz und die relative Fluoreszenzintensität, nachdem die Zelle mit

unterschiedlichen Fluorochromen markiert wurde (Kanal FL1, 2, 3).

Diese optischen Signale werden anschließend in elektronische Signale umgewandelt, digitalisiert und dem Computer zur Analyse übermittelt.

Fluorochrome

Zur Fluoreszenzmessung werden die Zellen mit Fluorochromen markiert. Diese absorbieren die Energie des einfallenden Laserlichtes (= absorbiertes Licht; λ_0), die als Schwingungsenergie und Wärme wieder frei gelassen wird. Es entsteht ein Lichtstrahl mit einer geringeren Energie (= emittiertes Licht mit größerer Wellenlänge; $\lambda_1 > \lambda_0$).

Jedes Fluorochrom hat sein Absorptionsspektrum (Wellenlängenspektrum des einfallenden Lichtes, das absorbiert werden kann) und sein Emissionsspektrum (Wellenlängenspektrum der emittierten Lichtstrahlen). Die gebräuchlichsten Fluorochrome sind:

- Fluorescein isothiocyanat (FITC): Molekular Gewicht = 389 Daltons; Absorptionsmaximum bei 495 nm; Einfallendes Licht von einer Wellenlänge von 488 nm führt zu einer maximalen Fluoreszenz-Emission um 520 nm.
- Phycoerythrin (PE): Molekular Gewicht = 240 kDa; Absorptionsmaximum bei 564 nm;
- Peridin Chlorophyll Protein (PerCP): Molekular Gewicht = 35 kDa; Einfallendes Licht von 488 nm Wellenlänge führt zu einer maximalen Fluoreszenz-Emission um 490 nm.
- PerCP-Cy 5.5: Combination von PerCP mit einem Cyanine dye (Cy5.5). Absorptions-Maximum bei 490 nm; Einfallendes Licht von 488 nm Wellenlänge führt zu einer maximalen Fluoreszenz-Emission von 694 nm.

PerCP transferiert die Fluoreszenz-Energie auf das Cyanine-Molekül, welches mit einer höheren Wellenlänge fluoresziert.

In unseren Untersuchungen wurden die Farbstoffe FITC und PE verwendet. Die Zellen, die mit 3 Farben gefärbt werden sollten, wurden zunächst mit einem spezifischen biotinylierten Antikörper markiert und anschließend mit Cy-Chrom-markiertem Streptavidin inkubiert. (BD Cy-Chrom = PE-Cy5).

Zellfärbungen

Die zu analysierenden Oberflächenmarker (CD4, CD25, CD3, HLA DR, CD45R0) der Zellen werden mit den unterschiedlichen Fluorochromen markiert.

Insgesamt werden pro Färbung 100 000 Zellen eingesetzt. Zunächst werden 5 µl CD4-Biotin und 5 µl Mouse-IgG1-Biotin als Kontrolle zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen werden die Zellen bei 4 bis 6 °C im dunkeln für 15 bis 20 Minuten inkubiert. Es folgt ein Waschritt mit PBS mit anschließender Zentrifugation (Zentrifugeneinstellung: 1300 rpm, 4 °C, 6 Min.). Anschließend wird zunächst 2 µl Streptavidin (Cy-Chrom) in alle Röhrchen mit Biotin gefärbten Zellen zugegeben. Dann werden die Zellen mit den restlichen Fluorochromen markiert: 10 µl PE (CD3, HLA DR, CD45R0); 10 µl CD25-FITC. Erneut werden die Zellen für 15 bis 20 Min. bei 4 bis 6 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erneutes Waschen und Zentrifugation. Nun können die Zellen im Durchflußzytometer auf Größe, Granularität und Fluoreszenz durch Fluorochrom-markierte Oberflächenmarker untersucht werden. Die durchflußzytometrische Untersuchung wurde mit einem FACSCalibur™-Durchflußzytometer (BD) durchgeführt. Das Programm BD CellQuest™ Pro wurde zur Messung und Analyse der Daten verwendet.

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des SAS-Programmes vorgenommen.

Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Testes berechnet und der p-Wert angegeben.

3. Ergebnisse

Es wurden insgesamt Nabelschnurblutproben von 42 Neonaten für die unterschiedlichen Experimente gewonnen. Dabei galt es zunächst zu zeigen, ob sich $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen im Nabelschnurblut isolieren lassen und welche Methode sich hierbei am besten eignen. Nach diesen umfangreichen methodischen Experimenten sollten darüber hinaus $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen im Nabelschnurblut funktionell und phänotypisch charakterisiert werden.

3.1 Isolation $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen: Reinheit, Ausbeute

Im ersten Teil der durchgeführten Experimente wurden unterschiedliche Verfahren der Zellseparation angewandt, um dabei Ausbeute und Reinheit der regulatorischen T-Zellen zu vergleichen. Die verschiedenen labortechnischen Herangehensweisen wurden im Methodenkapitel geschildert.

Die ermittelten Zellzahlen der über Ficoll-Separation isolierten mononukleären Zellen aus den Nabelschnurblutproben (CBMC), der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der $CD4^+$ Zellen und der $CD4^+/CD25^+$ Zellen sowie die Zellzahlen und Reinheit der „regulatorischen“ ($CD4^+/CD25^+$) T-Zellen sind in Abbildung 3.1.1. bis 3.1.9 angegeben. Die real isolierte Anzahl der $CD4^+/CD25^+$ Zellen wurde mit dem durchflußzytometrisch ermittelten initialen Anteil der $CD4^+/CD25^+$ Zellen in der CBMC-Probe verglichen. Als „Ausbeute“ wird der Anteil der real isolierten $CD4^+/CD25^+$ an der durchflußzytometrisch quantifizierten Gesamtzahl der $CD4^+/CD25^+$ Zellen, ausgedrückt in Prozent, definiert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil der $CD4^+CD25^+$ „regulatorischen“ T-Zellen im Nabelschnurblut bei gesunden Neugeborenen im Median 4.6 % (Range 1.5 – 9.8%) beträgt.

Es zeigt sich, daß bei der Anreicherung der CD4⁺/CD25⁺ Zellen insgesamt ein hoher Zellzahlverlust hinzunehmen war. Die im Median höchste Ausbeute wurde nach Isolation der CD4⁺-T-Zellen über AutoMacs und anschließender Isolation der CD25⁺ mittels „Dyna-System“ erreicht, sie lag bei 20,7%. Die zweitbeste Ausbeute wurde erreicht, wenn beide Anreicherungsschritte mit Hand-Macs durchgeführt wurden (Ausbeute: 14,9 %). Es folgen die Isolation mittels Dynabeads (für die CD4⁺) und Hand-Macs (für die CD25⁺) mit einer Gesamtausbeute von 11 % und die doppelte Anreicherung mittels AutoMacs in der Reihenfolge CD25/CD4 (Ausbeute: 8,4 %). Die Ausbeute war nach doppelter Anreicherung mittels AutoMacs in der Reihenfolge CD4⁺/CD25⁺ mit 5 % am niedrigsten.

Der Verlust an CD4⁺CD25⁺ Zellen ist bei allen Isolierungsmethoden beim ersten Anreicherungsschritt (Isolierung der CD4⁺ Zellen) höher als beim zweiten Anreicherungsschritt (Isolierung der CD4⁺/CD25⁺ Zellen).

Beim ersten Anreicherungsschritt zeigt die Isolierung der CD4⁺-Zellen mittels Dynabeads mit im Mittel 69,4 % die höchste Ausbeute gefolgt von der Anreicherung über HandMACS (Ausbeute: 46,4 %). Die niedrigste Ausbeute wird nach Isolierung der CD4⁺-Zellen über AutoMacs erreicht: Ausbeute 14,3 %.

Bei dem zweiten Anreicherungsschritt zeigt die Methode der Isolierung der CD25⁺ Zellen aus der CD4⁺ Zellpopulation mittels AutoMacs mit im Mittel 44,5 % eine höhere Ausbeutungsrate als die Anreicherung mittels HandMACS (mittlere Ausbeute: 38,2 %). In der Tabelle 3.1. ist die Zellausbeute der unterschiedlichen Methoden im einzelnen dargestellt.

Neben der Ausbeute der CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen stellt die Reinheit der isolierten Population ein wichtiges Qualitätskriterium für die weiteren Untersuchungsschritte dar. Bei der Isolation von CD4⁺ Zellen mittels Dynabeads wurde eine Reinheit von 96

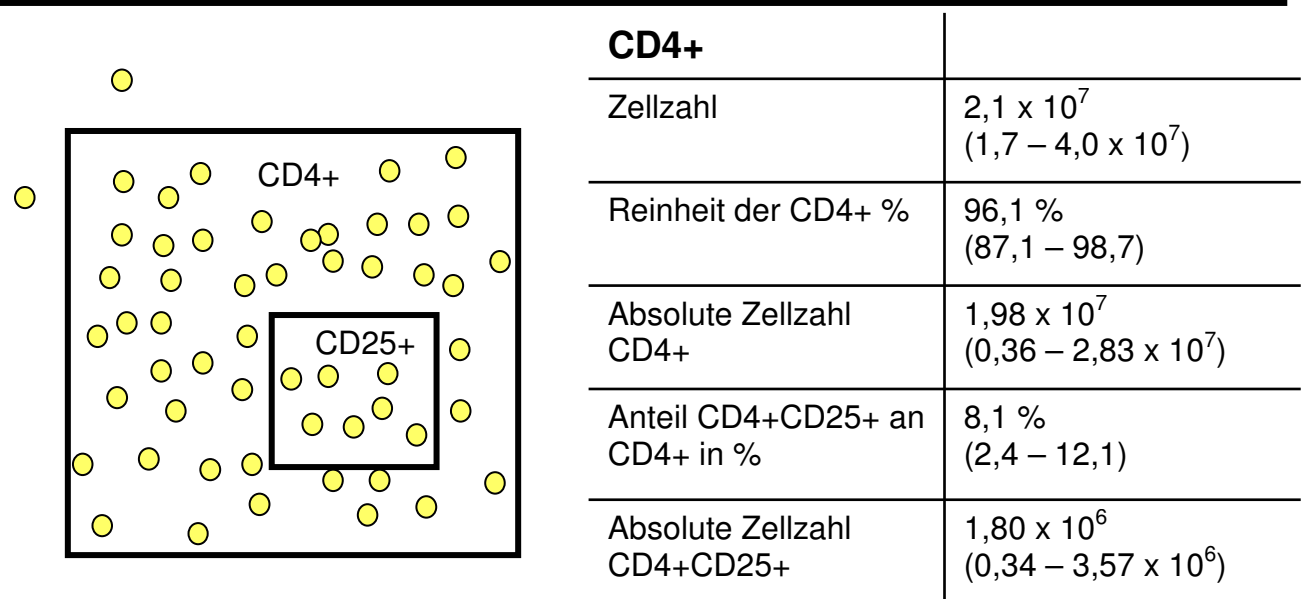
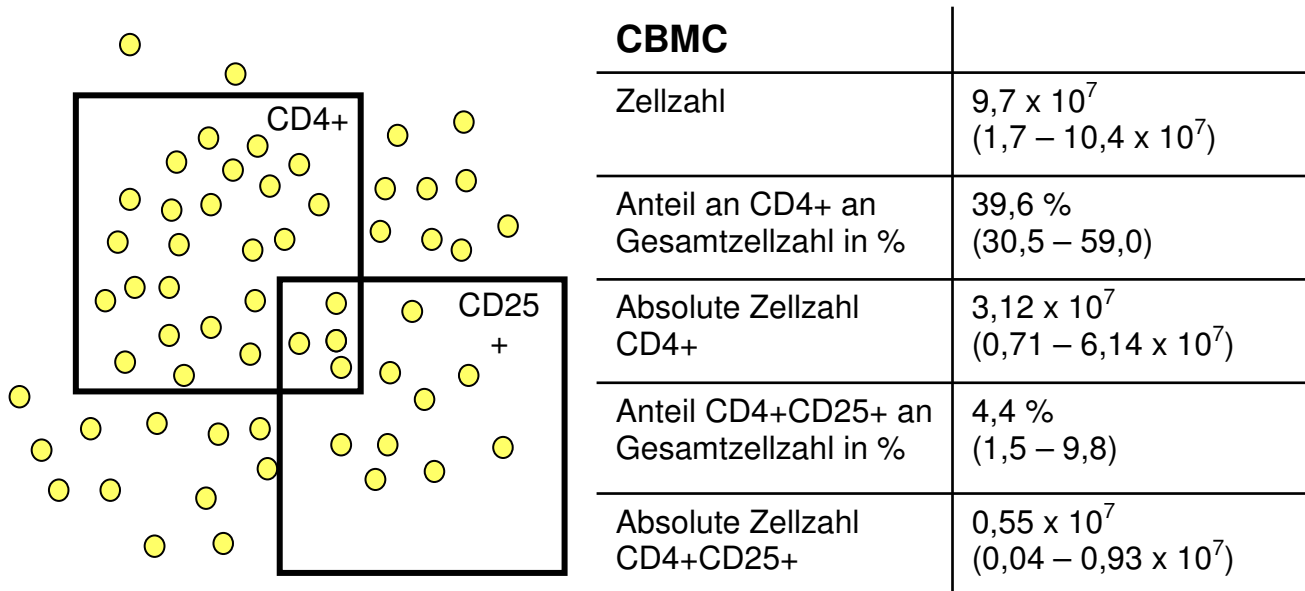
% erzielt (Abbildung 3.1.1. und 3.1.3). Bei der Isolation von CD4⁺ Zellen mittels Hand-Macs wurde eine Reinheit von 92.7 % erzielt (Abbildung 3.1.5).

Nach dem zweiten Anreicherungs-schritt lag die Reinheit der CD4⁺/CD25⁺ Zellen im Median knapp über 70%. Die höchste Reinheit konnte mit dem AutoMacs erzielt werden (Median 82%, Range 33 – 96%). Allerdings lag hier die Zellausbeute bei lediglich 5%.

	CD25 Auto/ CD4 Auto	CD4 Auto/ CD25 Auto	CD4 Dynal/ CD25 Auto	CD4 Dynal/ CD25 Hand	CD4 Hand/ CD25 Hand
1. Anreicherungs- schritt (CD4⁺)		14,3 %	76,6 %	62,3 %	46,4 %
2. Anreicherungs- schritt (CD25⁺)		34,4 %	53,7 %	41,4 %	34,9 %
Gesamtausbeute der CD4⁺CD25⁺- Zellen	8,4 %	5,0 %	20,7 %	11,0 %	14,9 %

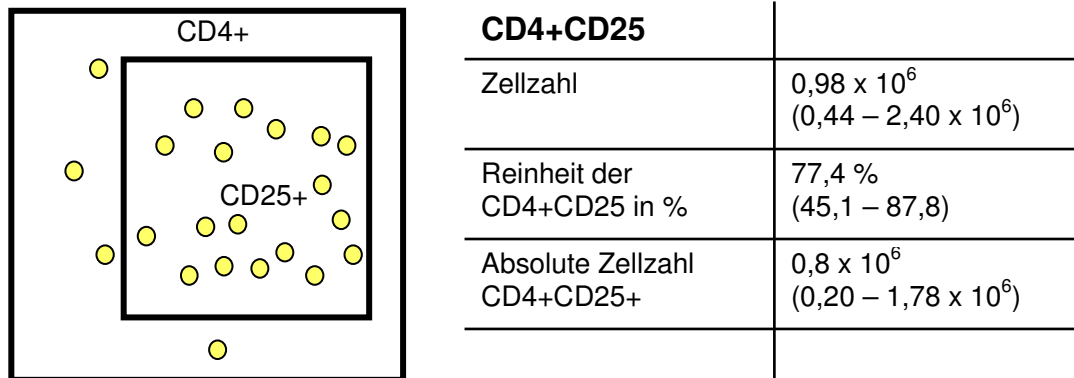
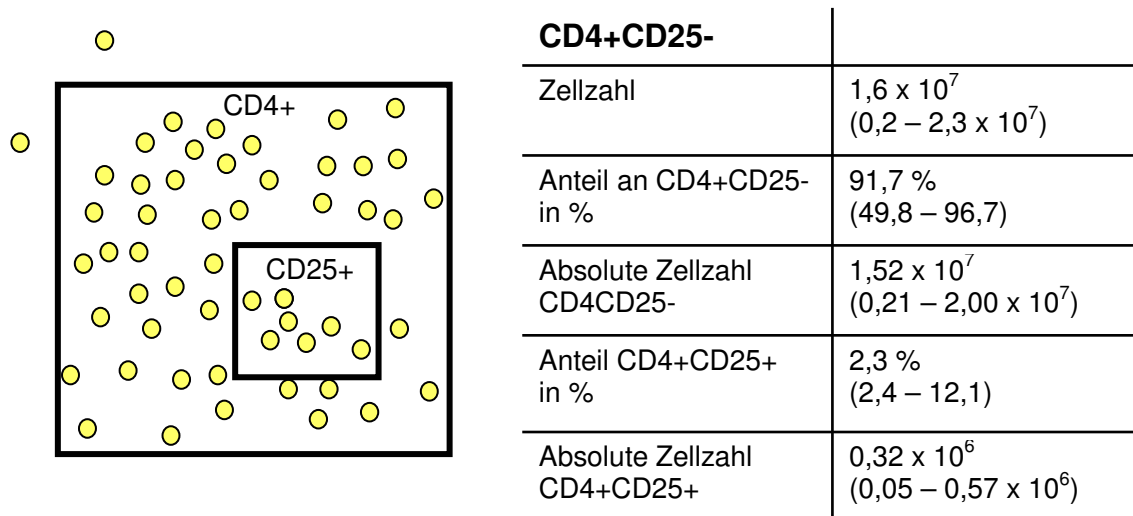
Tabelle 3.1: Medianwerte der Ausbeute der einzelnen Isolierungsschritte und Gesamtausbeute der CD4⁺/D25⁺ Zellen in den unterschiedlichen Anreicherungsverfahren.

Bei der Isolierung in der Reihenfolge CD4⁺/D25⁺ mittels AutoMacs wurden keine reinen CD4⁺ Zellen isoliert. Daher ist bei dieser Methode die Gesamtausbeute dargestellt.

Methode: CD4+-Isolierung mittels Dynal-System / CD25+-Isolierung mittels Automacs


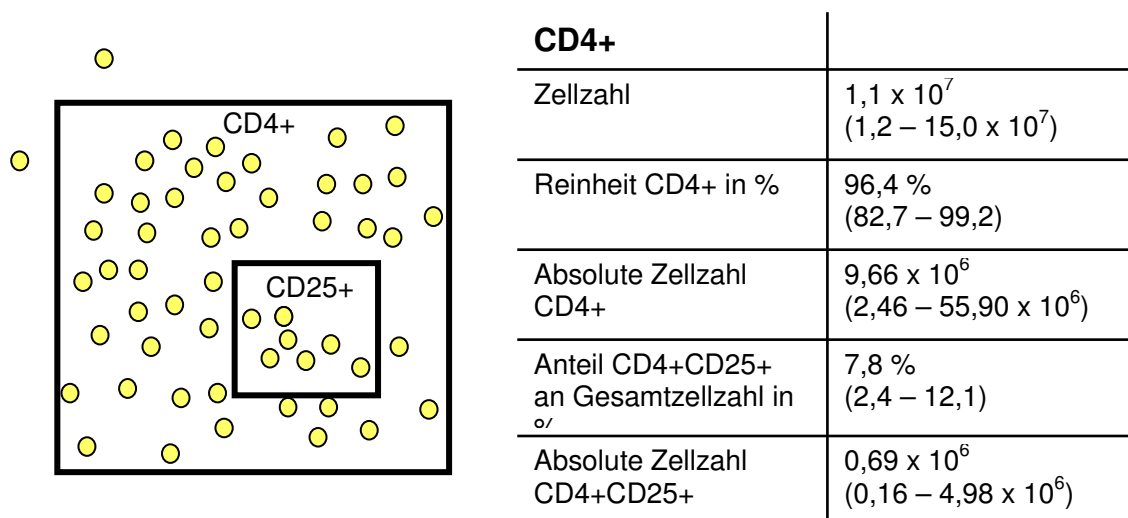
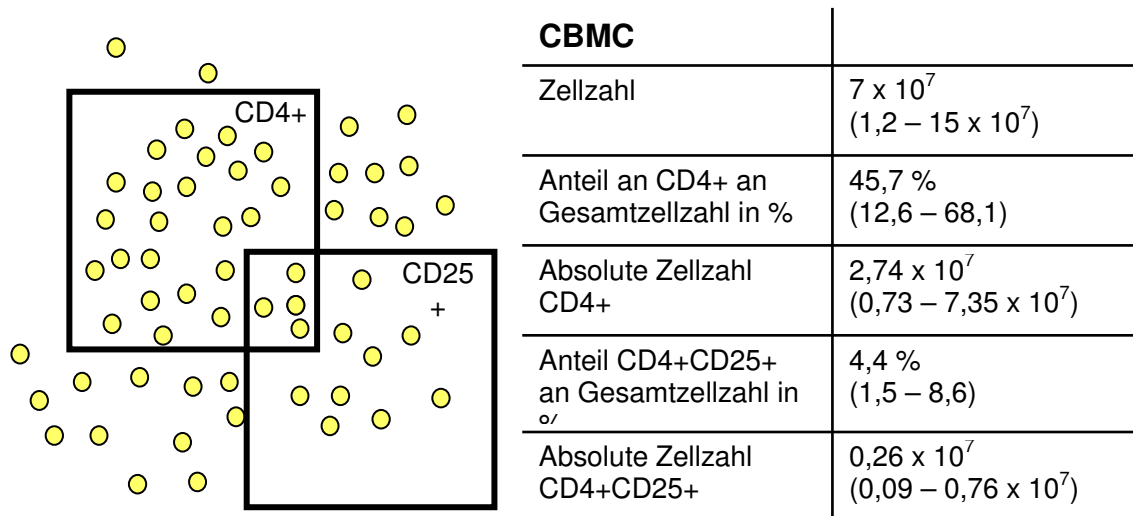
Ausbeute CD4+ (kalkuliert aus dem Mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+ Zellen der CBMC): 76,6 %

Abbildung 3.1.1: A) Zellzahlen der mittels Ficoll-Separation isolierten mononukleären Zellen aus den Nabelschnurblutproben (CBMC) und der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der CD4+ Zellen sowie der CD4+CD25+ Zellen (oben). B) Im unteren Teil der Abbildung ist die Zellzahl und Reinheit der isolierten CD4+ Zellen angegeben sowie der im FACS ermittelte Anteil der CD4+CD25+ Zellen. Die Anzahl der Versuche betrug n=6

Methode: CD4+-Isolierung mittels Dynal-System / CD25+-Isolierung mittels Automacs


Ausbeute CD4+CD25+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+CD25+ Zellen der CBMC): 20,7 %

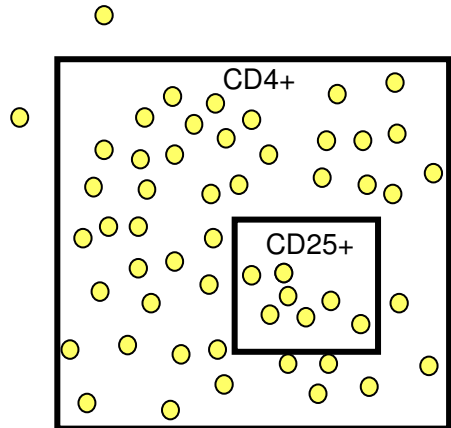
Abbildung 3.1.2: A) Zellzahlen und Reinheit der „Negativfraktion“ (CD4+CD25- T-Zellen; oben) B) Sowie Zellzahlen und Reinheit der „regulatorischen“ (CD4+CD25+ T-Zellen (unten). Die Anzahl der Versuche betrug n=6

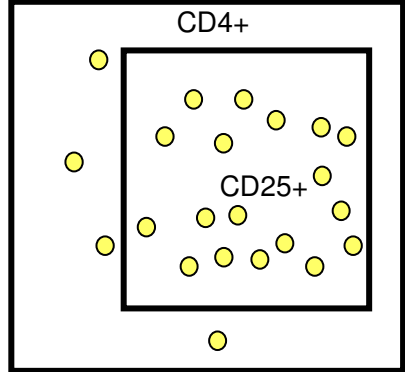
Methode: CD4+-Isolierung mittels Dynal-System / CD25+-Isolierung mittels Handmacs


Ausbeute CD4+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+ Zellen der CBMC): 62,3 %

Abbildung 3.1.3: A) Zellzahlen der mittels Ficoll-Separation isolierten CBMC und der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der CD4+ Zellen sowie der CD4+CD25+ Zellen (oben) B) Im unteren Teil der Abbildung ist die Zellzahl und Reinheit der isolierten CD4+ Zellen angegeben sowie der im FACS ermittelte Anteil der CD4+CD25+ Zellen. Die Anzahl der Versuche betrug n=22

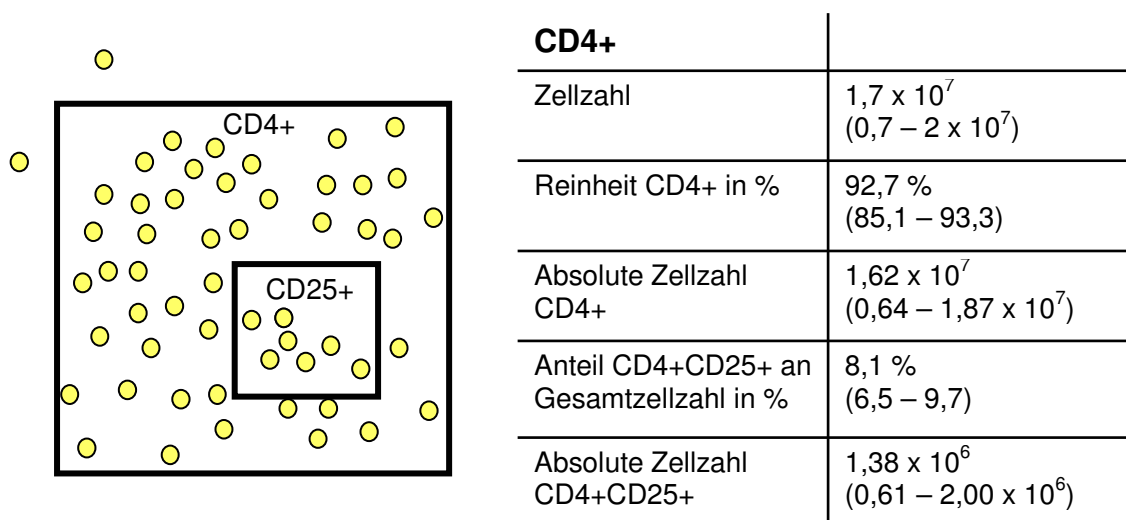
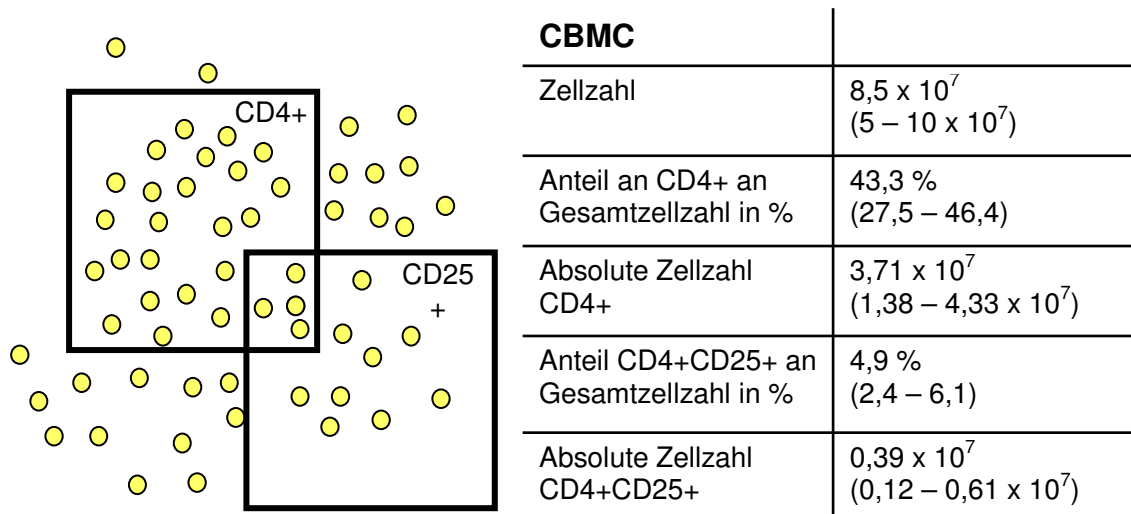
Methode: CD4+-Isolierung mittels Dynal-System / CD25+-Isolierung mittels Handmacs

	CD4+CD25-	
	Zellzahl	$0,7 \times 10^7$ ($0,05 - 6,6 \times 10^7$)
	Reinheit CD4+CD25- in %	88,3 % (33,3 – 95,3)
	Absolute Zellzahl CD4+CD25-	$5,92 \times 10^6$ ($0,50 - 58,8 \times 10^6$)
	Anteil CD4+CD25+ an Gesamtzellzahl in %	4,3 % (0,8 – 10,7)
Absolute Zellzahl CD4+CD25+	$0,30 \times 10^6$ ($0,02 - 4,03 \times 10^6$)	

	CD4+CD25	
	Zellzahl	$0,3 \times 10^6$ ($0,05 - 5,4 \times 10^6$)
	Reinheit der CD4+CD25 in %	72,6 % (43,9 – 91,5)
	Absolute Zellzahl CD4+CD25+	$0,17 \times 10^6$ ($0,02 - 3,53 \times 10^6$)

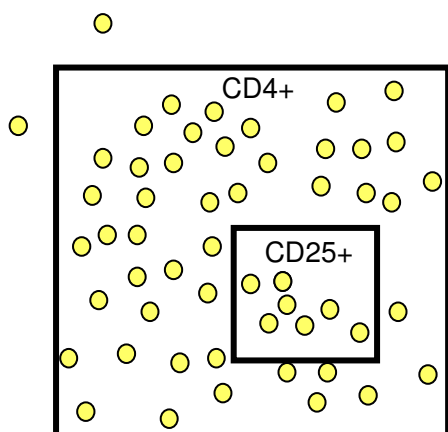
Ausbeute CD4+CD25+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+CD25+ Zellen der CBMC): 11,0 %

Abbildung 3.1.4: A) Zellzahlen und Reinheit der „Negativfraktion“ (CD4+CD25- T-Zellen; oben) B) sowie Zellzahlen und Reinheit der „regulatorischen“ T-Zellen (unten). Die Anzahl der Versuche betrug n=22

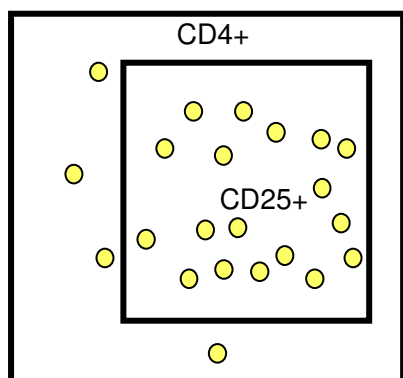
Methode: CD4+-Isolierung mittels Handmacs / CD25+-Isolierung mittels Handmacs


Ausbeute CD4+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+ Zellen der CBMC): 46,4 %

Abbildung 3.1.5: A) Zellzahlen der mittels Ficoll-Separation isolierten CBMC und der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der CD4+ Zellen sowie der CD4+CD25+ Zellen (oben) B) Im unteren Teil der Abbildung ist die Zellzahl und Reinheit der isolierten CD4+ Zellen angegeben sowie der im FACS ermittelte Anteil der CD4+CD25+ Zellen. Die Anzahl der Versuche betrug n=4

Methode: CD4+-Isolierung mittels Handmacs / CD25+-Isolierung mittels Handmacs


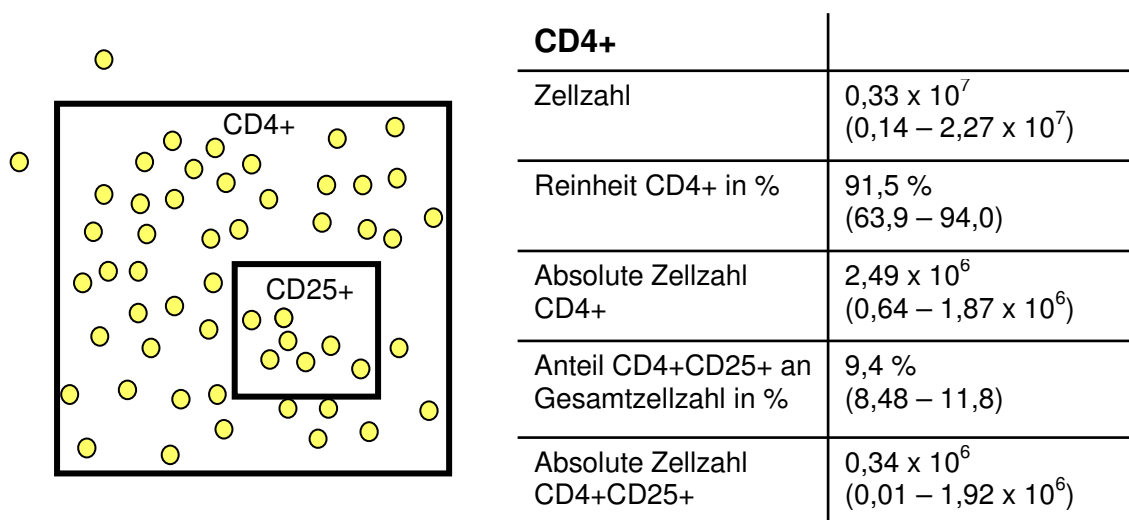
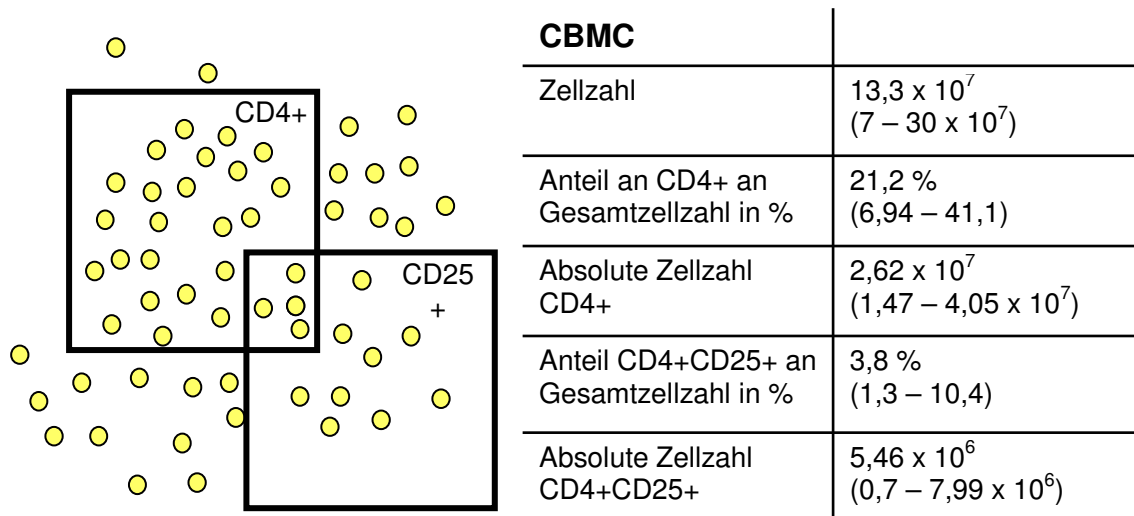
CD4+CD25-	
Zellzahl	$0,8 \times 10^7$ ($0,1 - 1,4 \times 10^7$)
Reinheit CD4+CD25- in %	91,1 % (81,1 – 90,4)
Absolute Zellzahl CD4+CD25-	$7,38 \times 10^6$ ($0,99 - 12,9 \times 10^6$)
Anteil CD4+CD25+ an Gesamtzellzahl in %	1,1 % (0,2 – 1,7)
Absolute Zellzahl CD4+CD25+	$0,04 \times 10^6$ ($0,01 - 0,24 \times 10^6$)



CD4+CD25	
Zellzahl	$0,6 \times 10^6$ ($0,3 - 0,8 \times 10^6$)
Reinheit der CD4+CD25 in %	74,4 % (71,4 – 87,3)
Absolute Zellzahl CD4+CD25+	$0,50 \times 10^6$ ($0,19 - 0,58 \times 10^6$)

Ausbeute CD4+CD25+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+CD25+ Zellen der CBMC): 14,9 %

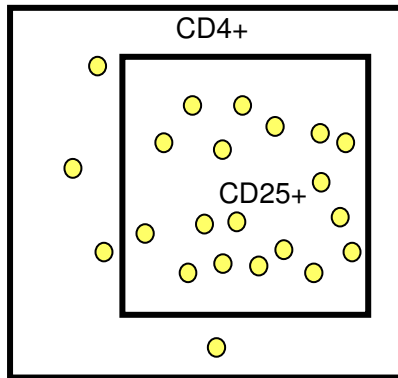
Abbildung 3.1.6: A) Zellzahlen und Reinheit der „Negativfraktion“ (CD4+CD25- T-Zellen; oben) B) sowie Zellzahlen und Reinheit der „regulatorischen“ T-Zellen (unten). Die Anzahl der Versuche betrug n=4

Methode: CD4+-Isolierung mittels Automacs / CD25+-Isolierung mittels Automacs

Ausbeute CD4+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+ Zellen der CBMC): 14,3 %

Abbildung 3.1.5: A) Zellzahlen der mittels Ficoll-Separation isolierten CBMC und der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der CD4+ Zellen sowie der CD4+CD25+ Zellen (oben) B) Im unteren Teil der Abbildung ist die Zellzahl und Reinheit der isolierten CD4+ Zellen angegeben sowie der im FACS ermittelte Anteil der CD4+CD25+ Zellen. Die Anzahl der Versuche betrug n=5

Methode: CD4+-Isolierung mittels Automacs / CD25+-Isolierung mittels Automacs

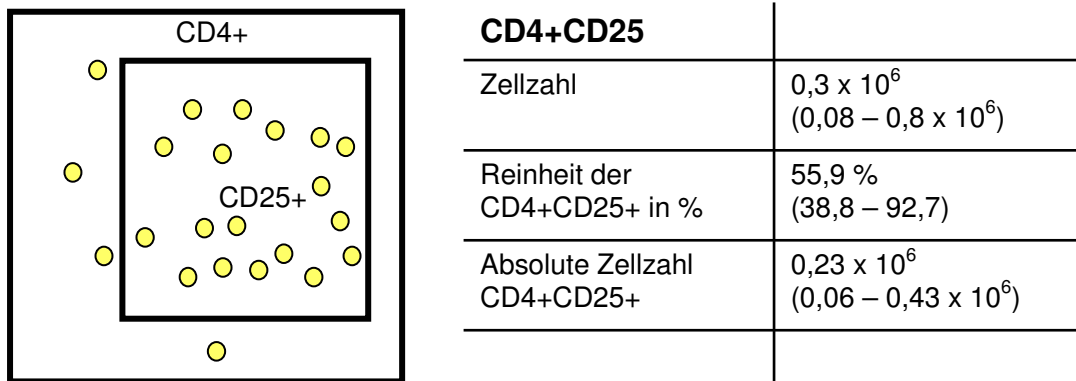
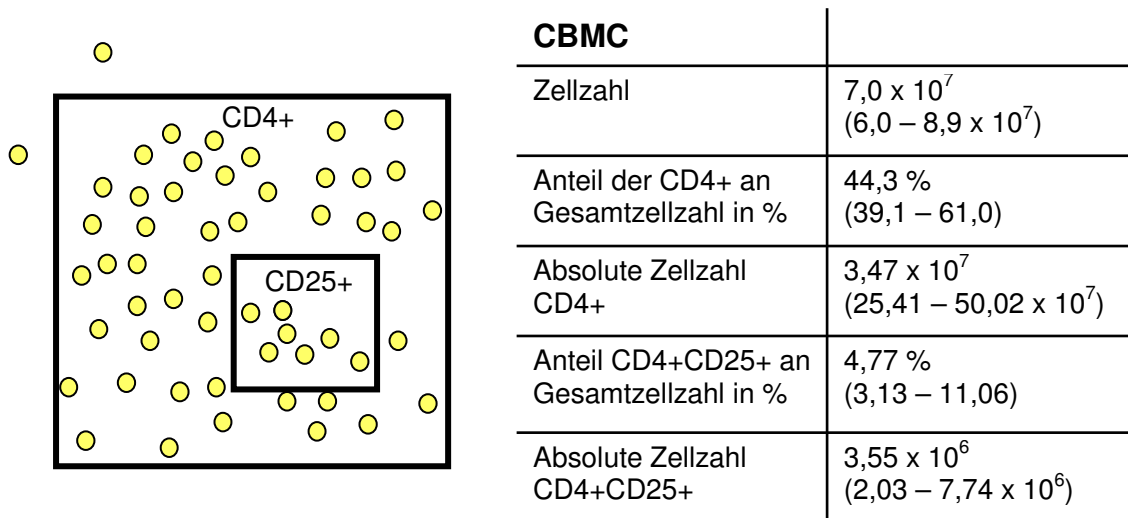


CD4+CD25	
Zellzahl	$0,26 \times 10^6$ ($0,04 - 0,5 \times 10^6$)
Reinheit der CD4+CD25 in %	82,9 % (33,3 – 96,0)
Absolute Zellzahl CD4+CD25+	$0,13 \times 10^6$ ($0,04 - 0,46 \times 10^6$)

Ausbeute CD4+CD25+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+CD25+ Zellen der CBMC): 5,0 %

Abbildung 3.1.8: B) Zellzahlen und Reinheit der „regulatorischen“ T-Zellen. Die Anzahl der Versuche betrug n=5

Methode: CD4+-Isolierung mittels Automacs/ CD25+-Isolierung mittels Automacs



Ausbeute CD4+CD25+ (kalkuliert aus dem mittels FACS ermittelten Anteil der CD4+CD25+ Zellen der CBMC): 8,4 %

Abbildung 3.1.9: A) Zellzahlen der mittels Ficoll-Separation islierten CBMC und der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil der CD4+ Zellen sowie der CD4+CD25+ Zellen (oben) B) Zellzahlen und Reinheit der „regulatorischen“ T-Zellen (unten). Die Anzahl der Versuche betrug n=5

3.2 Proliferationsantwort CD4⁺/CD25⁺ Zellen

Bei insgesamt n=22 Nabelschnurblutproben wurde die Proliferationsantwort der CBMC und der CD4⁺/CD25⁺ Zellen quantifiziert.

Die Zellen wurden für 7 Tage mit Medium alleine bzw. mit 200 E/ml IL-2 inkubiert und anschließend wurde (wie weiter oben beschrieben) die Proliferation gemessen. Diese wird anhand des Stimulationsindex (SI= eingebaute 3H-Thymidin-Menge nach Stimulation im Verhältnis zur Negativkontrolle) bestimmt.

Für die CBMC ergab sich ein signifikant höherer medianer Stimulationsindex von 5,1 (Range: 1.8 – 19; p < 0.05) im Vergleich zu den CD4⁺/CD25⁺-Zellen. Diese zeigten im Median einen SI von 2,0 (1.1 – 5.3; Abbildung 3.2.1).

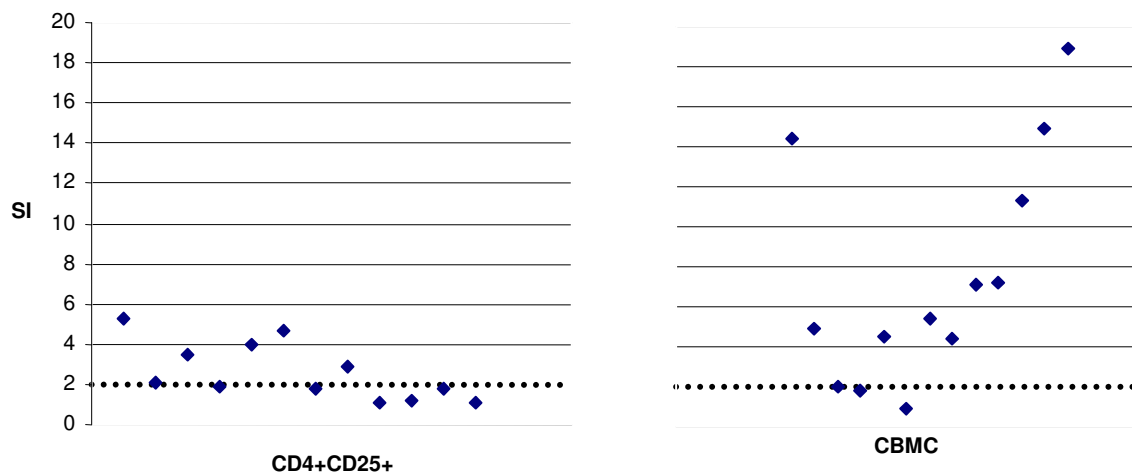


Abbildung 3.2.1: Darstellung der Verteilung der SI-Werte für alle auswertbaren Proliferationsversuche von CBMC und CD4+CD25+-T-Zellen. Ein SI-Wert ≥ 2 bedeutet eine deutliche Proliferation; Bei SI-Werten < 2 zeigen die Zellen keine Proliferation.

CD4⁺/CD25⁺-Zellen zeigten bei der überwiegenden Anzahl der Experimente keine Proliferationsantwort (SI < 2,1; 58%, n= 7/12). In 5 Experimenten war der SI > 2.1. Dieser Befund ist nicht durch eine Verunreinigung der kultivierten CD4⁺/CD25⁺ Zellen zu erklären: in 3 von 5 Experimenten lag die Reinheit der CD4⁺/CD25⁺ Zellen über 80 %.

Das Verhältniss von Reinheit und Proliferationsantwort der CD4⁺/CD25⁺ Zellen ist in Abbildung 3.2.2 dargestellt.

Im Gegensatz zu CD4⁺/CD25⁺-Zellen zeigten CBMC in 10 von 13 Versuchen eine deutliche Proliferation (SI>2) nach Stimulation mit IL-2.

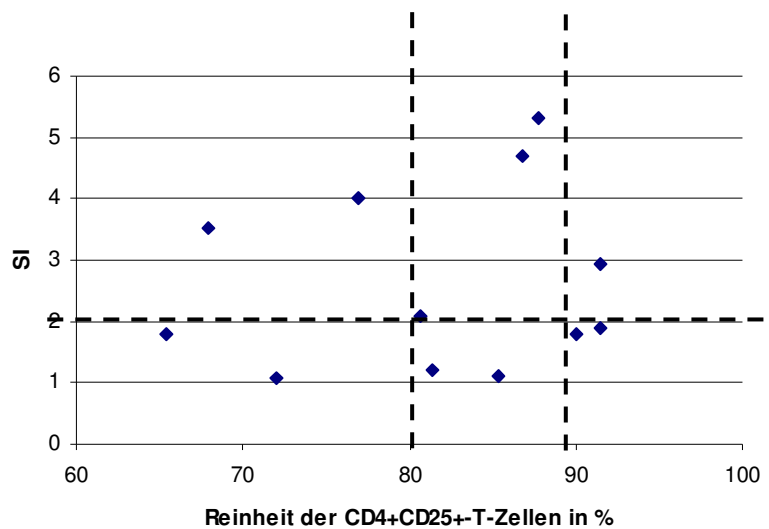


Abbildung 3.2.2: Darstellung der Reinheit der CD4⁺CD25⁺-Zellen im Verhältnis zum Stimulationsindex

3.3 Zytokinexpression CD4⁺/CD25⁺ Zellen

Bei n=7 (4 x MACS/MACS und 3 x Dynal/MACS) Proben wurden CD4⁺/CD25⁻ und CD4⁺/CD25⁺ Zellen im Verhältniss 1:1 und 1:4 kokultiviert und die einzelnen Zellpopulationen mit Medium alleine (negativ Kontrolle) und mit PHA (unspezifisches Mitogen) stimuliert. Anschließend wurden in den Überständen mittels ELISA die Zytokine IL-10, TGF-β, IFN-γ und IL-13 bestimmt (s. Tabellen 3.2 bis 3.5).

IFN-γ wurde in den Zellüberständen von reinen CBMC und CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen) ohne zusätzlichen Stimulus nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert (4.9 bis 7 pg/ml). In den Zellüberständen von CBMC

wurden nach Stimulation mit PHA deutlich signifikant Konzentrationen von IFN- γ gemessen (223.8 pg/ml; $p < 0.05$), nicht jedoch in den Zellüberständen der CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen).

Sehr ähnlich verhielt es sich mit IL-10. IL-10 wurde in den Zellüberständen von reinen CBMC und CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen) ohne zusätzlichen Stimulus nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert (1.7 bis 2.5 pg/ml). In den Zellüberständen von CBMC wurden nach Stimulation mit PHA signifikant höhere Konzentrationen von IL-10 gemessen (175 pg/ml, $p < 0.05$), nicht jedoch in den Zellüberständen der CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen).

Auch IL13 wurde in den Zellüberständen von reinen CBMC und CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen) ohne zusätzlichen Stimulus nur in geringen Konzentrationen detektiert (1.2 bis 1.4 pg/ml).

Auch IL-13 wurde in den Zellüberständen von reinen CBMC und CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen) ohne zusätzlichen Stimulus nur in geringen Konzentrationen detektiert (1.2 bis 1.4 pg/ml). Nach Stimulation der Zellen mit PHA zeigten die CBMC eine deutliche Ausschüttung von IL-13 (Median 702 pg/ml; $p < 0.05$). In den Zellüberständen der CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. 1:4 mit CD4⁺/CD25⁻ Zellen) konnten im Median 352 bzw. 66 pg/ml IL-13 detektiert werden.

In allen Kulturansätzen (stimuliert oder nicht stimuliert; CBMC oder CD4⁺/CD25⁻ Zellen) konnten ähnliche Mengen TGF- β gemessen werden (85 bis 138 pg/ml).

IFN- γ [pg/ml]	CBMC	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:1	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:4
Negativ	4,9 4 – 7	5,9 4 - 7	7,0 5 – 10
PHA	223,8 57 – 863	11,5 8 – 147	15,8 10 – 185

Tabelle 3.2: IFN- γ Konzentration in Überständen von CBMC alleine und von CBMC nach Ko-Kultur von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen (1:1 und 1:4 Ratio), nach Inkubation mit Medium alleine bzw. nach Stimulation mit PHA (Median und Range).

IL-10 [pg/ml]	CBMC	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:1	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:4
Negativ	2,5 1 – 3	1,7 1 – 3	2,1 1 – 3
PHA	175 9 – 217	2,6 2 - 5	2,8 2 – 6

Tabelle 3.3: IL-10 Konzentration in Überständen von CBMC alleine und von CBMC nach Ko-Kultur von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen (1:1 und 1:4 Ratio), nach Inkubation mit Medium alleine bzw. nach Stimulation mit PHA (Median und Range).

IL-13 [pg/ml]	CBMC	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:1	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:4
Negativ	1,4 0 – 3	1,4 0 - 2	1,2 0 – 3
PHA	702 77 – 2313	352 137 -543	66 22 – 145

Tabelle 3.4: IL-13 Konzentration in Überständen von CBMC alleine und von CBMC nach Ko-Kultur von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen (1:1 und 1:4 Ratio), nach Inkubation mit Medium alleine bzw. nach Stimulation mit PHA (Median und Range).

TGF-β [pg/ml]	CBMC	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:1	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ 1:4
Negativ	85 70 – 109	99 85 – 207	138 97 – 210
PHA	104 94 – 116	114 87 - 131	99 90 – 118

Tabelle 3.5: TGF-β Konzentration in Überständen von CBMC alleine und von CBMC nach Ko-Kultur von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen (1:1 und 1:4 Ratio), nach Inkubation mit Medium alleine bzw. nach Stimulation mit PHA (Median und Range).

3.4 Oberflächenmarker CD4⁺/CD25⁺ Zellen

In den unterschiedlichen Zellpopulationen wurden durchflußzytometrisch die Expression der Oberflächenmarker CD45R0 und HLA DR bestimmt (n= 22). In der CBMC-Population zeigte sich ein Anteil von CD4⁺/CD3⁺ Zellen von 42,8 % (Range 12,6 – 68,1 %). Der Anteil an CD4⁺/CD25⁺: 4,6 % (Range 1,5 – 9,8 %), CD4⁺/CD45 R0⁺: 14,0 % (Range 4,3 – 38,3 %) und HLA DR⁺: 4,4 % (Range 0,7 – 20,2 %). Die Population der isolierten CD4⁺ Zellen zeigte einen Anteil von 8,1 % CD25⁺ (Range 2,4 – 12,1 %), 33,0 % CD45R0⁺ (Range 12,5 – 49,5 %) und 1,2 % HLA DR⁺ Zellen (Range 0,1 – 4,1 %). Die isolierten CD4⁺CD25⁺ Zellen zeigten einen Anteil an

CD45R0⁺ Zellen von 37,9 % (Range 18,9 – 76,3 %) und an HLA DR⁺ Zellen von 1,3 % (Range 0,2 – 10,7 %). In der Abbildung 3.4.1 ist ein repräsentatives Ergebnis einer durchflußzytometrischen Analyse dargestellt.

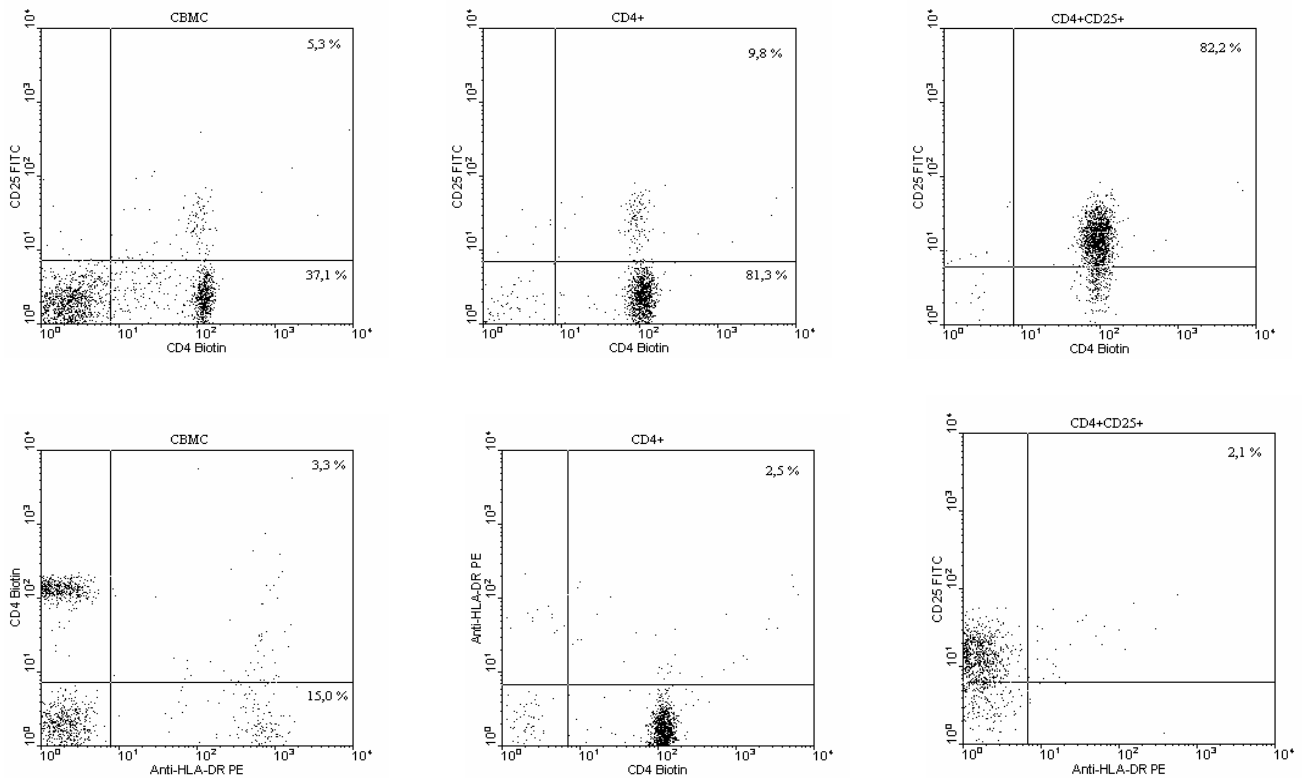


Abbildung 3.4.1 : Durchflußzytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils der Oberflächenmarker CD4, CD3, CD25 und HLA DR in den Subpopulationen CBMC, CD4⁺ und CD4⁺CD25⁺ Zellen in einem repräsentativen Beispiel.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung sowie die funktionelle und phänotypische Charakterisierung von CD4⁺/CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen im Nabelschnurblut.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil der CD4⁺/CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen im Nabelschnurblut bei gesunden Neugeborenen im Median 4.6 % (Range 1,5 – 9,8 %) beträgt.

Diese CD4⁺/CD25⁺ T-Zellpopulation proliferiert nach Stimulation mit Interleukin-2 nicht. Darüber hinaus kommt es nach Co-Kultur von CBMC mit CD4⁺/CD25⁺ Zellen zu keiner wesentlichen Freisetzung der Zytokine Interferon-Gamma, IL-13 und IL-10. Im Gegensatz dazu ist die Freisetzung von TGF- β im Vergleich zu stimulierten CBMC nicht verändert.

Vor wenigen Jahren gelang es zunächst im Mausmodell eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften zu charakterisieren (Sakaguchi 1995). Diese CD4⁺ Subpopulation weist nur eine geringe Fähigkeit zur Proliferation auf und ist in der Lage, hohe Konzentrationen an IL-10, jedoch nur wenig IL-2 und kein IL-4 zu produzieren. Die immunsuppressiven Effekte dieser sogenannten T-regulatory Cells 1 (Tr1)- Population sind offenbar abhängig von IL-10 und TGF- β . Tr1 Zellen hemmen die antigen-spezifische Proliferation von CD4⁺ Zellen und verhindern im Mausmodell die Entwicklung einer Colitis ulcerosa (Sakaguchi 1995, Groux 1997). Auch beim Menschen wurden T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben, die neben CD4⁺ durch die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25⁺) charakterisiert sind (Jonuleit 2001a). Diese CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}) exprimieren CD45RO, Histokompatibilitäts-Leukozyten-Antigen (HLA-DR) und das

intrazelluläre zytotoxische T Lymphozyten-Assoziierte Antigen 4 (CTLA-4). Sie expandieren nicht nach Stimulation und unterdrücken die Expansion von konventionellen T-Zellen. Darüber hinaus produzieren sie keine signifikanten Mengen an IL-2, IL-4 oder TGF- β sondern lediglich IL-10.

Vor einem Jahr konnten Hori und Mitarbeiter zeigen, daß der Transkriptionsfaktor Foxp3 essentiell für die Differenzierung dieser regulatorischen T-Zellen ist (Hori 2003). Mutationen im Bereich des Foxp3 Gens führten bei Mäusen zu der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten, vergleichbar dem Bild von Mäusen, die defizient für regulatorische T-Zellen waren. Umgekehrt konnten Hori und Mitarbeiter zeigen, daß die Überexpression von Foxp3 zu einer normalen Differenzierung von regulatorischen T-Zellen führte. Diese Ergebnisse wurden von Anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Fontenot 2003, Khattri 2003). Mutationen im Foxp3 Gen beim Menschen führen zu einem Syndrom mit dem Namen IPEX.

Dieses Akronym steht für „Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-linked Syndrom“, das durch eine Autoimmun-Endokrinopathie, Typ I-Diabetes, inflammatorische Magen-Darmerkrankung und schwere Atopie charakterisiert ist (Chatila 2000).

Die Funktion regulatorischer T-Zellen besteht nach dem heutigen Verständnis darin, daß sie eine Kontrollfunktion im Rahmen chronisch inflammatorischer Prozesse spielen. Dabei kommt ihnen nicht nur eine Rolle in der Supprimierung von sogenannten TH1-Krankheiten zu, sondern auch bei der Kontrolle der inflammatorischen Veränderungen und Zytokinproduktion im Rahmen des Asthma bronchiale. Bellinghausen und Mitarbeiter konnten zeigen, daß sowohl Atopiker (n=7) wie auch Nicht-Atopiker (n=6) CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen haben, die in quantitativ wie auch qualitativ vergleichbarer Weise die TH1- wie auch die TH2- Immunantwort inhibieren können (Bellinghausen 2003).

Die potentielle Bedeutung von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen bei Neonaten liegt in deren regulativen Potential in der TH1/TH2-Immunebalance (Mosmann 1989) .

Mittlerweile ist gut belegt, daß alle Neonaten mit einem Überwiegen der TH2-Immuneantwort auf die Welt kommen. Nach der aktuellen Vorstellung verlieren Neonaten, die später „gesund“ sind, dieses TH2-Übergewicht während der ersten 2 Lebensjahre. Anders verhält es sich bei Neonaten, die später eine allergische Sensibilisierung und/oder eine atopische Erkrankung entwickeln: Bei diesen Kindern persistiert die initiale TH2-Immuneantwort (Yabuhara 1997, Prescott 1997, Prescott 1999). Die hierfür verantwortlichen Mechanismen sind bisher nicht bekannt. Die Ausprägung des TH2-Zytokinmusters und dessen Persistenz über die ersten Lebensjahre muß aber als Initialgeschehen in der Pathogenese atopischer Erkrankungen betrachtet werden. Damit stellt sich die Frage, welche Faktoren in Richtung einer TH1- oder TH2-Antwort polarisieren und welchen regulatorischen Mechanismen für das Zustandekommen und die Balance des TH1/TH2-Zytokinmilieus verantwortlich sind. Diesem Phänomen können hypothetisch verschiedene Ursachen zu Grunde liegen:

- 1) Bei späteren „Allergikern“ fehlen in einem sensiblen Zeitfenster spezifische Trigger, die eine TH1-Immuneantwort begünstigen.

Und/oder:

- 2) Bei späteren „Allergikern“ überwiegen in einem sensiblen Zeitfenster spezifische Trigger, die eine TH2-Immuneantwort begünstigen.

Und/oder:

- 3) Bei späteren „Allergikern“ sind regulative Mechanismen, die für eine TH1/TH2-Immunebalance essentiell sind, defekt.

Dieser letzte Punkt zielt dabei direkt auf die phänotypische und funktionelle Beschreibung von regulatorischen T-Zellen ab.

In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, daß sich die Anzahl von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen im Nabelschnurblut nicht von Erwachsenen unterscheiden. Bevor die Ergebnisse der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften dieser – Zellpopulation beschrieben wird, sollen jedoch zunächst die methodischen Probleme bei der anspruchsvollen Zellseparation diskutiert werden.

4.1. Methodische Aspekte bei der Isolation CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen

Die Isolation und funktionelle Charakterisierung der CD4⁺/CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen ist technisch anspruchsvoll. Dies gilt vor allem dann, wenn man eine ausreichend hohe Zellzahl mit einer entsprechenden Reinheit der Zellpopulationen erzielen möchte. Während sich durchflusszytometrische Analysen auch mit kleineren Zellzahlen bewerkstelligen lassen, sind insbesondere für die Kultur-Experimente die Isolation von größeren Zellpopulationen notwendig. Für eine durchflusszytometrische Analyse wurden mindestens 40.000 Zellen eingesetzt, für einen Kulturansatz wurden hingegen mindestens 100.000 Zellen benötigt.

Bei der Aufarbeitung der T-Zell-Subpopulation sind folgende Schwierigkeiten zu meistern gewesen:

Die geringe Ausbeute hatte zur Folge, daß wir nicht von jeder Probe alle Analysen (Proliferation, Zytokinbestimmung und FACS-Analyse) durchführen konnten. Die funktionellen Untersuchungen konnten demzufolge nur bei einer kleinen Anzahl an Probanden durchgeführt werden.

Die Hauptursache scheint in der Isolierung einer kleinen Zellpopulation aus einer großen Gesamtzellzahl (circa 5% der Gesamtzellen) zu liegen. Insgesamt wurden daher mehrere Ansätze in der Isolation der CD4⁺/CD25⁺ Zellen untersucht. Hier

konnten wir deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit feststellen. So stellte sich für den ersten Isolierungsschritt (Isolation der CD4⁺ Zellen aus CBMC) mittels „Dynalbead“ als das ergiebigste heraus (negativ-Isolation; ca. 70 % CD4⁺ Zellen-Ausbeute der CD4⁺-Gesamtzellzahl; Reinheit > 90%). Die anschließende Isolierung der CD25⁺ Zellen (2. Isolierungsschritt) mittels „AutoMacs“ ergab mit 54 % Ausbeute an CD25⁺ Zellen die besten Ergebnisse. Wenn im ersten Isolierungsschritt die AutoMacs-Methode verwendet wurde, ergab sich eine deutlich niedrigere Ausbeute von nur 34 % (Medianwert) als bei Anwendung des Dynabead-Systems. Ein ähnliches Ergebnis konnte beim manuellen Macs-System festgestellt werden (41 % nach 1. Schritt mittels Dynalsystem und 35 % nach 1. Schritt mittels Handmacssystem). Nach einer Reihe von Vorversuchen wurden schließlich auf Grund der oben genannten Befunde die CD4⁺/CD25⁺ Zellen zunächst mittels Dynabeads (negative Selektion CD4⁺ Zellen) und in einem zweiten Schritt mittels MACS-System (positive Selektion CD25⁺ Zellen) isoliert. Insgesamt zeigte sich jedoch bei allen Versuchen ein großer Zellzahlverlust. Mit den isolierten Zellen wurden verschiedene funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde die Proliferation der Zellen nach Stimulation mit IL-2 gemessen.

4.2. Proliferationsantwort CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen

In der Literatur werden CD4⁺/CD25⁺ Zellen bei Erwachsenen als nicht proliferierende Zellen beschrieben. Wir konnten diese Ergebnisse auch bei Neonaten reproduzieren. CD4⁺/CD25⁺ Zellen zeigten eine signifikant niedrigere Proliferationsantwort als CBMC nach Stimulation mit Interleukin-2. Auch nach Einsatz von hohen Dosen dieses unspezifischen Stimulus proliferierten CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen nicht. Auch Betalactoglobulin, ein Kuhmilchprotein, bei dem sich bei nahezu 100% der CBMC im

Nabelschnurblut eine Proliferationsantwort zeigt (Upham 1995, Kopp 2000), führt in der Kultur mit CD4⁺/CD25⁺ Zellen zu keiner Proliferationsantwort. Sicherlich stellt diese funktionelle Beschreibung CD4⁺/CD25⁺ Zellen im Nabelschnurblut einen wichtigen Baustein im Verständnis dieser Zellpopulation bei Neonaten dar. An dieser Stelle stellen sich allerdings eine Reihe weiterer Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden konnten. Die wichtigste Frage dabei ist sicherlich die, in wie weit CD4⁺/CD25⁺ Zellen die Proliferation von CBMC hemmen können. Um diese Frage zu beantworten, können autologe CBMC mit steigender Anzahl CD4⁺/CD25⁺ Zellen kultiviert werden und nach Gabe von IL-2 oder allergenspezifischen Stimuli die Proliferationsantwort quantifiziert werden. Diese Experimente wurden jedoch auf Grund der geringen Zellausbeute bisher noch nicht durchgeführt.

4.3. Zytokinproduktion CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen

Neben der Proliferationsantwort sollte die Zytokinproduktion von CD4⁺/CD25⁺ Zellen quantifiziert werden. Auch hierbei stellte die Zellausbeute eine große Schwierigkeit dar. Insgesamt konnten nur bei 7 Experimenten genügend CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen isoliert werden. Allerdings bewegen sich selbst bei der Untersuchung CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen bei Erwachsenen die Probandenzahlen in diesem Bereich (Bellinghausen 2003). Dies spiegelt zum einen die Schwierigkeiten bei der Isolation, zum anderen aber auch den enormen Zeitaufwand der einzelnen Experimente wieder. Für die Spanne von der Verarbeitung der Nabelschnurblutproben bis zum Kulturexperiment mussten etwa 10 Stunden veranschlagt werden.

Bei der Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurde folgendermassen vorgegangen: CBMC und CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen wurden im Verhältniss 1:1 sowie 1:4 mit Medium alleine (Negativkontrolle) sowie mit dem unspezifischen Stimulus PHA und dem allergenspezifischen Stimulus BLG inkubiert. Die Zellüberstände wurden

abgezogen und die Zytokine mittels ELISA im Überstand quantifiziert. Wir analysierten dabei die Produktion von IL-10, TGF- β , IFN- γ und IL-13.

Die Zytokin-Produktion der regulatorischen T Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Pontoux et al beschreiben eine entscheidende Rolle von IL-10. So konnte eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen in CD25-defizienten Mäusen durch die Injektion von natürlichen CD4⁺/CD25⁺ T Zellen kontrolliert werden. Wenn diese Mäuse jedoch kein IL-10 produzieren konnten (IL-10-knockout-mice) konnte die Zytokinproduktion durch Zugabe von CD4⁺/CD25⁺ Zellen nicht aufgehoben werden (Pontoux 2002).

In anderen Untersuchungen ist die immunsuppressive Wirkung allerdings unabhängig von IL-4 oder IL-10. Dabei konnte gezeigt werden, daß CD25⁺ Zellen von IL-4^{-/-} und IL-10^{-/-} Mäusen ähnlich effektiv arbeiten wie die von Wildtyp-Mäusen (Thornton 1998).

Chen et al fanden heraus dass die CD4⁺/CD25⁺ Zellen TGF- β_1 und IL-10 zur Differenzierung benötigten. Die immunsuppressive Wirkung konnte allerdings durch neutralisierende Antikörper gegen TGF- β_1 und IL-10 nicht aufgehoben werden (Chen 2003). Weitere Arbeiten schlussfolgerten dass die inhibitorische Wirkung der regulatorischen Zellen nicht durch die Sekretion von TGF- β_1 stattfindet, da 1) der direkte Kontakt zwischen CD25⁺ Zelle und Zielzelle notwendig ist und 2) Anti-TGF- β_1 -Antikörper nicht zu einer Aufhebung der suppressiven Wirkung führt (Takahashi 1998, Nakamura 2001).

Nakamura et al schlugen ein Model vor in welchem CD4⁺/CD25⁺ T Zellen latentes TGF- β_1 an der Zelloberfläche exprimieren und so über Zellkontakt eine Suppression der Zielzellen stattfindet (Nakamura 2001). In einer weiteren Untersuchung wurden TGF- β_1 -unempfindliche und normale Mäuse bezüglich der suppressiven Wirkung von

CD4⁺/CD25⁺ Zellen miteinander verglichen. Hier konnte kein Unterschied festgestellt werden. Ebenso waren regulatorische T Zellen von TGF-β₁^{-/-} Mäusen ähnlich immunsuppressiv wie TGF-β₁^{+/+} Mäusen (Piccirillo 2002).

Wie im Ergebnisteil beschrieben zeigte sich die IL-13-Sekretion in allen Zelluntergruppen nach Stimulation mit PHA erhöht. Das bedeutet, daß alle Zellpopulationen nach Stimulation mit PHA vermehrt IL-13 freisetzen, unabhängig von dem Anteil an CD4⁺/CD25⁺ Zellen (1:1 bzw. 1:4).

In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Wing interessant, die zeigen konnte dass CD4⁺/CD25⁺ Zellen aus dem Nabelschnurblut keinen suppressiven Effekt auf selbst-reaktive T-Zellen haben. Im Gegensatz dazu zeigen CD4⁺/CD25⁺ aus Erwachsenenblut eine deutliche Suppression der autoreaktiven Immunantwort (Wing, 2003). Es wird die Schlußfolgerung gezogen dass die CD4⁺/CD25⁺ Zellen aus dem Nabelschnurblut möglicherweise nach der Geburt einen Reifungsprozess erfahren und erst anschließend ihre volle suppressive Fähigkeit ausbreiten. Es wäre denkbar dass unsere Ergebnisse durch ein ähnliches Phänomen zu erklären sind. Möglicherweise haben die CD4⁺/CD25⁺ Zellen im Nabelschnurblut im Vergleich zu Erwachsenen noch keine komplette suppressive Funktion.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, Befunde von Neonaten mit und ohne eine spätere Atopie-Entwicklung vergleichen zu können. Bislang stehen der Bearbeitung dieser Fragestellung jedoch der hohe zeitliche und materielle Aufwand dieser Experimente entgegen. Unklar ist bisher die Rolle des Magneten in der Stimulationssituation. Die CD4⁺/CD25⁺ Zellen haben während der gesamten Experimente einen Anti-CD25-Magnetpartikel anhaften. Dieser spielt möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung der Zellen und der Produktion und Sekretion von Zytokinen.

Wünschenswert und Ziel weiterer Untersuchungen muss es sein, die Zytokin-Konzentrationen Ausschüttungsversuche bei Neonaten und Erwachsenen vergleichend zu untersuchen und hierbei die Zytokinexpression in den Zellüberständen und auf RNA-Ebene in reinen CD4⁺/CD25⁺ Populationen zu charakterisieren.

4.4. Oberflächenmarker von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen

Die durchflusszytometrische Charakterisierung von Oberflächenmarkern ist für die Bestimmung der Reinheitsgrade der isolierten T-Zell-Subpopulation essentiell. Die hier untersuchte T-Zellpopulation exprimiert neben CD4 die α -Kette des IL-2 Rezeptors.

Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der CD4⁺/CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen im Nabelschnurblut bei gesunden Neugeborenen im Median 4.6 % (Range 1,5 – 9,8 %) beträgt.

Damit lassen sich die CD4⁺/CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen phänotypisch eindeutig von anderen T-Zellpopulationen mit regulatorischen Eigenschaften abgrenzen. Hierzu zählen 1) sogenannte TH3-Zellen, die den Oberflächenmarker CD4⁺ aber nicht CD25 exprimieren und durch die Produktion von TGF- β charakterisiert sind (Chen 1994), 2) sogenannte T_{reg}-Zellen, die ebenfalls den Oberflächenmarker CD4⁺ aber nicht CD25⁺ exprimieren und durch die Produktion von IL-10 charakterisiert sind (Groux 1997) und 3) CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen, charakterisiert durch die Produktion von IL-10 und IL-13 (Sakaguchi 1995) sowie 4) NK (natural killer)-Zellen, die negativ für CD4⁺ oder doppelt negativ für CD4⁺ und CD8⁺ sind und durch die Produktion eines breiten Spektrums von Zytokinen (IL-4, IL-13 und IFN- γ) charakterisiert sind. NK-Zellen haben regulative Eigenschaften für zahlreiche Autoimmunerkrankungen und verstärken im Tierexperiment die

Entwicklung von Asthma und induzieren die Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität bei Mäusen (Wilson 1998).

An dieser Stelle stellt sich natürlich die Frage, welche Gruppe der beschriebenen T-Zellen die Entwicklung von Asthma und Allergien kontrollieren: TH3-Zellen, T_{reg} , $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen oder NK-Zellen? Letztendlich ist diese Frage zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend zu beantworten. Möglicherweise sind TH3-Zellen primär involviert in Prozesse der Toleranzinduktion des Gastrointestinaltraktes, während T_{reg} im Respirationstrakt eine besondere Rolle spielen könnte (Weiner 2001). Diese Hypothesen basieren auf in-vitro Befunden, die zeigen, daß dendritische Zellen aus dem Respirationstrakt IL-10 (notwendig für T_{reg}) produzieren, während dendritische Zellen aus dem Gastrointestinaltrakt IL-10 und TGF- β produzieren, das für die Entwicklung von TH3-Zellen notwendig ist (Akbari 2001). Nach den derzeit vorliegenden Befunden supprimieren T_{reg} sowohl die TH1- als auch die TH2- Antwort und haben eine regulative Funktion in der Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität beim Asthma bronchiale (Cottrez 2000, Akbari 2002). $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen haben eine regulative Funktion in der Entwicklung der eosinophilen Atemwegsentszündung aber beeinflussen die Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität nicht (Suto 2001, Hadeiba 2003).

Die Bedeutung von NK-Zellen bei der Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität beim Menschen ist bislang noch weitgehend unklar.

Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Entwicklung von Asthma und Allergien ist auch auf dem Hintergrund der so genannten „Hygiene-Hypothese“ plausibel.

Diese von Strachan formulierte „Hygiene-Hypothese“ hat aus verschiedenen epidemiologischen Arbeiten abgeleitet, daß die verminderte Exposition gegenüber

Mikroorganismen im Säuglingsalter zu einer Zunahme der allergischen Sensibilisierung in den Industrienationen geführt hat (Strachan 1989).

Auf dem Hintergrund des TH1/TH2-Konzeptes bedeutet dies: Allergische Erkrankungen sind mit einer Verschiebung des TH2/TH1 Gleichgewichtes in Richtung einer TH2-Immunantwort assoziiert. Zytokine, die diese TH2-Immunantwort charakterisieren, wie beispielsweise IL-4, IL-13 und IL-5, sind für die IgE-Produktion der B-Zellen bzw. die eosinophile Inflammation von herausragender Bedeutung. Fehlen spezifische Stimuli z.B. durch Mikroorganismen in der frühen Kindheit, die per se oder durch Aktivierung „regulatorischer“ Mechanismen die Produktion von TH1-Zytokinen bewirken, so bleibt das bei Geburt bestehende TH2-Zytokinmuster dominierend. Sind hingegen „immunmodulatorische Stimuli“ während einer sensiblen Episode vorhanden, kommt es zu einer Verschiebung in Richtung einer TH1-Immunantwort bei Kindern, die dann auch keine Atopie entwickeln. Während des Säuglingsalters gibt es mindestens zwei kritische Ereignisse, die eine Verschiebung der TH2 in Richtung TH1 – Immunantwort bewirken könnten. Hierzu zählt neben Episoden mit viralen oder bakteriellen Infekten vor allem die physiologische Besiedlung des Magen-Darm Traktes mit Bifidobakterien und Laktobazillen. In welchem Maß eine adäquate Besiedelung des Magen-Darm-Traktes für eine „normale“ Entwicklung des Immunsystems notwendig ist, zeigen Experimente mit Mäusen, die in einer keimfreien Umgebung aufgewachsen sind: Diese Tiere zeigten keinerlei Toleranzentwicklung.

Bislang gibt es eine prospektive Untersuchung, die den allergiepräventiven Effekt von Probiotika untersucht hat (Kalliomaki 2001). Dabei rekrutierte die finnische Arbeitsgruppe um Erika Isolauri ein Risikokollektiv, d.h. es wurden Familien eingeschlossen, in denen entweder die angehende Mutter, der Vater oder ein

Geschwisterkind eine atopische Erkrankung hatten. Die angehende Mutter bekam vier Wochen vor Geburt entweder Laktobazillus GG oder ein Plazebopräparat. In den ersten sechs Monaten nach Geburt nahm entweder die stillende Mutter oder das neugeborene die Laktobazillen bzw. das Plazebopräparat weiter ein. Nach zwei Jahren wurden die Kinder im Hinblick auf die Manifestation einer atopischen Dermatitis untersucht. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt hatten signifikant weniger Kinder (15 von 64; 23%) in der LGG-Gruppe Symptome einer atopischen Dermatitis, in der Plazebogruppe waren es hingegen 46% (31 von 68 Kinder). Aus dieser Population liegen allerdings keine immunologischen Daten vor, die den beschriebenen Effekt pathophysiologisch klären könnten.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, daß die Isolation von CD4⁺/CD25⁺-Zellen im Nabelschnurblut prinzipiell möglich ist und daß diese Zellen offenbar ähnliche funktionelle Eigenschaften wie bei Erwachsenen haben. Ziel für weitere Untersuchungen sollte es sein, die funktionellen und phänotypischen Eigenschaften regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut weiter zu charakterisieren. Dabei ist insbesondere die Rolle von IL-13 zu untersuchen, um zu klären, in wie weit sich CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen von Neonaten von Erwachsenen unterscheiden.

Eine Klärung der Bedeutung und Funktion von „regulatorischen“ T-Zellen ist insbesondere auch auf dem Hintergrund von neuen Präventionsstudien vielversprechend. Dies könnte dazu beitragen, die Mechanismen der allergischen Sensibilisierung im frühen Kindesalter in den nächsten Jahren besser zu verstehen und gezielte Strategien zu entwickeln, um damit langfristig der Zunahme allergischer

Sensibilisierungen und atopischer Erkrankungen in den westlichen Industrienationen entgegen wirken zu können.

5. Zusammenfassung

Allergische Erkrankungen sind immunologisch definiert durch die Produktion allergen-spezifischer IgE-Antikörper von B-Zellen, deren Bildung durch sogenannte TH-2 Zytokine, insbesondere IL-4 und IL-13 induziert werden. Bereits bei Geburt ist die Situation des Neonaten durch eine Polarisierung naiver T-Zellen in Richtung einer TH-2-Immunantwort charakterisiert. Dieses TH-2-Muster persistiert bei späteren Allergikern, während sich bei Kindern ohne Allergie-Entwicklung in den ersten Lebensjahren eine TH-1/TH-2 Immunbalance entwickelt. Damit stellt sich die Frage, welche Faktoren in Richtung einer TH1- oder TH2-Antwort polarisieren und welchen regulatorischen Mechanismen für das Zustandekommen und die Balance des TH1/TH2-Zytokinmilieus verantwortlich sind. Tierexperimentell sowie bei Erwachsenen konnte unlängst eine CD4⁺/CD25⁺ T-Zellpopulation mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben werden.

Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung sowie die funktionelle und phänotypische Charakterisierung von CD4⁺/CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen im Nabelschnurblut. Hierfür wurden aus Nabelschnurblutproben mononukleäre Zellen mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert und anschließend über zwei Aufreinigungsschritte CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mittels magnetischer Antikörper (Dyna, MACS) isoliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Anteil der CD4⁺CD25⁺ „regulatorischen“ T-Zellen im Nabelschnurblut bei gesunden Neugeborenen im Median 4,6 % (Range 1,5 – 9,8 %) beträgt. Diese CD4⁺CD25⁺ T-Zellen proliferieren nach Stimulation mit Interleukin-2 nicht. Darüber hinaus kommt es nach Co-Kultur von CBMC mit CD4⁺CD25⁺ Zellen in den Zellüberständen zu keiner wesentlichen Freisetzung der Zytokine Interferon-Gamma und IL-10 (ELISA). Im Gegensatz dazu ist die Freisetzung von TGF-β im Vergleich zu stimulierten CBMC nicht verändert. Nach Co-Kultur mit CD4⁺CD25⁺ Zellen war auch IL-13 in den Überständen über der Negativkontrolle erhöht. Mit

dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen nicht nur quantitativ sondern auch funktionell und phänotypisch ähnliche Charakteristika wie bei Erwachsenen aufweisen. Die Arbeit hat insbesondere methodische Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen gelegt. Zu klären ist nun, in wie weit sich CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Geburt bei Kindern mit späterer Atopie-Entwicklung von später gesunden Kindern unterscheiden. Hierbei ist die Untersuchung des Transkriptionsfaktor Foxp3, der die Differenzierung „regulatorischer“ T-Zellen determiniert, ein vielversprechender Ansatzpunkt.

6. Literaturverzeichnis

Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT, 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2: 725-31

Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT, 2001. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002; 8: 1024-32

Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J, 2003. Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 862-8

Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, Funke A, Schwab C, Rau U, Richter K, Tawfeek MS, Clad A, Brandis M, 1998. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res* 1998; 44:469-77

Bertoletti A, D'Elis MM, Boni C, De Carli M, Zignego AL, Durazzo M, Missale G, Penna A, Fiaccadori F, Del Prete G, Ferrari C, 1997. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997; 112:193-9

Cao Q, Batey R, Pang G, Clancy R, 1998. Altered T-lymphocyte responsiveness to polyclonal cell activators is responsible for liver cell necrosis in alcohol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 723-9

Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM, 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000; 106: 75-81

Chen Y, Ebright YW, Ebright RH, 1994. Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking. *Science* 1994; 265:90-2

Chen ZM, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Narula S, Roncarolo MG, Blazar BR, 2003. IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4⁺CD25⁻ T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* 2003; 101: 5076-83

Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA, 1999. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1333-46

Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H, 2000. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 4848-53

Dallaglio G, North M, McKenzie SW, Means RT Jr, 1999. Cytokine and cytokine receptor concentrations in bone marrow supernatant from patients with HIV: correlation with hematologic parameters. *J Investig Med* 1999; 47:477-83

Economou JS, Colquhoun SD, Anderson TM, McBride WW, Golub S, Holmes EC, Morton DL, 1988. Interleukin-1 and tumor necrosis factor production by tumor-associated mononuclear leukocytes and peripheral mononuclear leukocytes in cancer patients. *Int J Cancer* 1988; 15: 712-4

El-Mezzein RE, Matsumoto T, Nomiya H, Miike T, 2001. Increased secretion of IL-18 in vitro by peripheral blood mononuclear cells of patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 193-8

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR, 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-9

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY, 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 330-6

Gajewski TF, Fitch FW, 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988; 140:4245-52

Gratacos E, Filella X, Palacio M, Cararach V, Alonso PL, Fortuny A, 1998. Interleukin-4, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in second-trimester serum from women with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 849-53

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG, 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-42

Hadeiba H, Locksley RM, 2003. Lung CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J Immunol* 2003; 170: 5502-10

Herz U, Ahrens B, Scheffold A, Joachim R, Radbruch A, Renz H, 2000. Impact of in utero Th2 immunity on T cell deviation and subsequent immediate-type hypersensitivity in the neonate. *Eur J Immunol* 2000; 30: 714-8

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299: 1057-61

Hoshino T, Wiltrout RH, Young HA, 1999. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J. Immunol* 1999; 162: 5070-7

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH, 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁽⁺⁾ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192:1213-22

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH, 2001. Identification and functional characterization of human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells with

regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1285-94 (Jonuleit 2001a)

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH, 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001; 22:394-400 (Jonuleit 2001b)

Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E, 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-9

Kapsenberg ML, Kalinski P, 1999. The concept of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. *Immunol Lett* 1999; 69:5-6

Kavelaars A, van der Pompe G, Bakker JM, van Hasselt PM, Cats B, Visser GH, Heijnen CJ, 1999. Altered immune function in human newborns after prenatal administration of betamethasone: enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood. *Pediatr Res* 1999; 45: 306-12

Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F, 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*. 2003; 4: 304-6

Kopp M, Frischer T, Karmaus W, Kühr J, 1995. Verlauf der allergischen Sensibilisierung in der ersten Lebensdekade. *Deutsches Ärzteblatt* 1995; 92: A-2246–52

Kopp MV, Pichler J, Halmerbauer G, Kuehr J, Frischer T, Urbanek R, Szépfalusi Z, 2000. Culture conditions for the detection of allergen specific T - cell reactivity in cord blood: Influence of cell number. *Pediatr Allergy Immunol* 2000; 11: 4-11

Kopp MV, Zehle C, Pichler J, Szépfalusi Z, Moseler M, Deichmann K, Forster J, Kuehr J, 2001. Allergen specific T-cell reactivity in cord blood: Influence of maternal cytokine production. *Clin Exp Allergy Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1536 – 43

Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yokoyama Y, 1998. Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 1998; 28: 1313-6

Lange J, Ngoumou G, Berkenheide S, Moseler M, Mattes J, Kuehr J, Kopp MV, 2003. High interleukin-13 production by phytohaemagglutinin- and Der p 1-stimulated cord blood mononuclear cells is associated with the subsequent development of atopic dermatitis at the age of 3 years. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1537-43

Leonard WJ, 1999. Type I Cytokines and Interferons and their receptors. In: Paul WE, Eds. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999; 741 – 774

Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Al-Azemi MM, Hassan NA, Bandar A, 1999. Mitogen-induced cytokine responses of maternal peripheral blood lymphocytes indicate a differential Th-type bias in normal pregnancy and pregnancy failure. *Am J Reprod Immunol* 1999; 42: 273-81

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpeper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A, 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071-79

Mosmann TR, Coffman RL, 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73

Nakamura K, Kitani A, Strober W, 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629-44

Ngoumou G, Schaefer D, Mattes J, Kopp MV, 2004. Interleukin-18 enhances the production of Interferon-Gamma by allergenspecific and unspecific stimulated cord blood mononuclear cells. *Cytokine* 2004; 25: 172-8

Ninan T, Russel G, 1992. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen school children: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ* 1992; 304: 873-5

Niessner M, Volk BA, 1995. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 1995; 101:428-35

Nowak N, Haberstock J, Geiger E, Bieber T, 1999. Dendritic cells in allergy. *Allergy* 1999; 54: 792-803

Ohshima Y, Yasutomi M, Omata N, Yamada A, Fujisawa K, Kasuga K, Hiraoka M, Mayumi M, 2002. Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants. *Pediatr Res* 2002; 51: 195-200

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et al, 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88-91

Pacora P, Romero R, Maymon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH, 2000. Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host response to intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1138-43

Piccinni MP, Romagnani S, 1996. Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol Res* 1996; 15:141-50

Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM, 2002. CD4+CD25+ Regulatory T Cells can mediate suppressor function in the absence of TGF-b1 Production and Responsivness. *J Exp Med* 2002; 196: 237-45

Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S, 1999. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J Immunol* 1999; 162: 7322-9

Pontoux C, Branz A, Papiernik M, 2002. Natural CD4+CD25+ regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* 2002; 14: 233-9

Prescott SL, Macaubas C, Yabuhara A, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Loh R, Sly PD, Holt PG, 1997. Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 75-9

Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG, 1999. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353: 196-200

Raghupathy R, 2001. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 2001; 13: 219-27

Renz H, 1995. The central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation. *Exp Dermatol* 1995; 4:173-82

Rinas U, Horneff G, Wahn V, 1993. Interferon-gamma production by cord-blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE-levels. *Pediatr Allergy Immunol* 1993; 4: 60-4

Rimpelä A, 1995. Asthma and allergic rhinitis among Finish adolescents in 1977 - 1991. *Scand J Soc Med* 1995; 1: 60-5

Ring J, Wenning J, 2000. *Weißbuch Allergie in Deutschland 2000*. München: Urban & Vogel

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M, 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64

Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N, 1996. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1996; 9: 211-20

Sareneva T, Matikainen S, Kurimoto M and Julkunen I, 1998. Influenza A virus-induced IFN- alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma gene expression in human T cells. *J Immunol* 1998; 160: 6032-38

Steinborn A, Sohn C, Sayehli C, Baudendistel A, Huwelmeier D, Solbach C, Schmitt E, Kaufmann M, 1999. Spontaneous labour at term is associated with fetal monocyte activation. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:147-52

Strachan DP, 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299:1259-60

Suto A, Nakajima H, Kagami SI, Suzuki K, Saito Y, Iwamoto I, 2001. Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 680-7

Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Teramoto S, Shiratori M, Hashimoto M, Ohmichi M, Abe S, 2001. IL-18 might reflect disease activity in mild and moderate asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 331-6

Takahashi T, Y Kuniyasu, M Toda, N Sakagushi, M Itoh, M Iwata, J Shimizu and S Sakaguchi, 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressiv T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressiv state. *Int Immunol* 1998; 10:1969-80

Tang ML, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ, 1994. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994; 344: 983-5

Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M, Peckham C, 1984. Changes in the reported prevalence of childhood eczema since the 1939-45 war. *Lancet* 1984; 2: 1255-57

The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Comitee, 1998. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinokonjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351: 1225–32

Upham JW, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Yabuhara A, Hales BJ, Thomas WR, Loh RK, O'Keeffe PT, Palmer L, Le Souef PN, et al, 1995. Inhalant allergen-specific T-cell reactivity is detectable in close to 100% of atopic and normal individuals: covert responses are unmasked by serum-free medium. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 634-42

Thornton AM, Shevach EM, 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell aktivation in vitro by inhibiting IL-2 Production. *J Exp Med* 1998; 188: 287-96

Umetsu DT, Akbari O, Dekruyff RH, 2003. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 480-7

Vankayalapati R, Wize B, Weis SE, Samten B, Girard WM, Barnes PF, 2000. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; 182: 234-9

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR, 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-6

Weiner HL, 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-14

Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA, 1999. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1999; 399: 84

Wing K, Lindgren S, Kollberg G, Lundgren A, Harris RA, Rudin A, Lundin S, Suri-Payer E, 2003. CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is

suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 579-87

Wüthrich B, Schindler C, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich U, SAPALDIA-Team, 1995. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA-Study). *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1995; 106: 149-56

Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Sly PD, Holt PG, 1997. TH2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1261-69

ANHANG

Danksagung

Stammdatenbogen

Informationsblatt für die Eltern

Fragebogen

Einverständniserklärung

Lebenslauf

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zu aller erst bei allen Müttern und Kindern, die an der Studie teilnahmen und ohne deren bereitwillige Mitarbeit diese Studie nicht möglich gewesen wäre. Außerdem gilt mein Dank den Kreissaalteams des St Josefs-Krankenhauses Freiburg, des Evangelischen Diakoniekrankenhauses Freiburg und der Universitätsfrauenklinik Freiburg, die wesentlich an dem reibungslosen Ablauf der Patientenrekrutierung beteiligt waren. Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. J.C. Simon und Herrn PD Dr. S. Martin für die bereichernde Zusammenarbeit in der Universitätshautklinik bedanken. Meiner Kollegin Frau Dr. Eva Maria Engels danke ich für ihre Einarbeitung im Labor und den Unterricht im Nabelschnurblutabnehmen. Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Maria Lickert für ihre Geduld und Gelassenheit bei der Einführung in die Labormethoden und ihr offenes Ohr an grauen Tagen. Die Zusammenarbeit mit Ihr hat mir sehr viel Spass gemacht.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem „Doktor-Vater“ PD Dr. Matthias Kopp. Er hatte die Idee dieser Arbeit und ermöglichte mir durch seine Präsenz, durch sein Vertrauen und nicht zuletzt durch seine tatkräftige Unterstützung diese Arbeit zum Abschluß zu bringen.

Danken möchte ich auch ganz herzlich Herrn PD Dr. C. Schempp für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter und meinem Vater danken für die gedankliche Unterstützung.

Stammdatenbogen

Familie ____ ____ ____

-
- 0 Vorliegende Einverständniserklärung
- 0 Ausgefüllter Fragebogen
- 0 Ausschlusskriterien während der Schwangerschaft erfragt:
- Erkrankung während der Schwangerschaft: Gestosen, Eklampsie, Infektionen
 - Zustand nach Sterilitätsbehandlung oder Hormonbehandlung
 - Autoimmunerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Vaskulitiden, Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, M. Crohn, Colitis ulcerosa
 - Neoplasien
 - chronische Entzündungen (u.a. HIV, chronische Hepatitis, Parasitosen, Sarkoidose, Tuberkulose)
 - Alkoholabusus, Drogenabhängigkeit
-

Planung der Geburt:

- 0 errechneter Termin _____
- 0 Geburt vorraussichtlich im _____ Krankenhaus
-

Anmerkungen:**Zeitpunkt Geburt:**

Kind: PN: ____ ____ ____ Mutter: PN: ____ ____ ____

- 0 Ausschlusskriterien erfragt:
- Frühgeborene (< 37. SSW), Neugeborene mit niedrigem Geburtsgewicht (< 2500g)
 - Kinder mit Neugeboreneninfektionen, Beatmungspflichtigkeit, Stoffwechselstörung und schweren Organfehlbildungen
 - z.B. Herzfehler, Spaltfehlbildungen, Chromosomenaberrationen
- 0 Blutentnahme bei der Mutter erfolgt am _____ = _____ Schwangerschaftswoche
- 0 Nabelschnurblutprobe verarbeitet am _____
- 0 Geschlecht des Kindes _____
- 0 Geburtsgewicht _____
- 0 Geburtsmodus _____

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Universitätsklinikum der Albert-Ludwigs-Universität
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Brandis
Projektleiter: Dr. Matthias Kopp
e-mail: kopp@kikli.ukl.uni-freiburg.de
Mathildenstrasse 1
79106 Freiburg

Freiburg, im November 2001

Liebe Eltern,

Seit Jahren nehmen allergische Erkrankungen wie Asthma, Heuschnupfen oder Neurodermitis in westlichen Industrienationen zu. Offenbar wird recht früh festgelegt, wer später eine allergische Erkrankung entwickelt oder nicht. Um die Zusammenhänge der Allergie-Entstehung besser verstehen zu können, untersuchen wir seit einigen Jahren Nabelschnurblutproben von neugeborenen Kindern.

Wir wissen mittlerweile, daß die Blutzellen des Neugeborenen bereits Allergene erkennen können und darauf auch mit einer Immunantwort reagieren können. In den letzten Jahren wird dabei besonders die Bedeutung von Zytokinen (Botenstoffen, die eine allergische Entzündungsreaktion auslösen können) und Zellen, die diese Botenstoffe freisetzen (sogenannte T-Zellen“) untersucht. Über die Bedeutung dieser Zytokine und der T-Zellen im Nabelschnurblut für die spätere Allergie-Entstehung ist bislang allerdings nur sehr wenig bekannt.

Wir planen nun eine Untersuchung über die Rolle von Zytokinen und T-Zellen bei Neugeborenen und möchten Sie hiermit fragen, ob Sie Interesse an der Teilnahme haben.

- Dazu möchten wir Ihnen zunächst einen Fragebogen aushändigen und Sie bitten, diesen auszufüllen.
- Nach der Geburt ihres Kindes möchten wir aus dem Mutterkuchen eine Nabelschnurblutprobe („Plazentarestblut“) von ihrem Kind gewinnen. Davon spüren aber weder die Mutter noch ihr Kind etwas.

Diese Untersuchung wird im Rahmen einer wissenschaftliche Studie durchgeführt. Ein direkter Nutzen für Ihr Kind besteht lediglich darin, daß wir möglicherweise durch die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen eine Zusatzinformation erhalten. Diese könnte uns in Einzelfällen bei der Planung eventuell notwendiger Therapien weiterhelfen, zum Beispiel dann, wenn sich bei Ihrem Kind allergische Erkrankungen entwickeln sollten. Selbstverständlich ist diese Untersuchung freiwillig, es entstehen dadurch keine Behandlungskosten für Sie. Die Daten werden in anonymisierter Form und nur zu Studienzwecken erfasst, sie werden entsprechend den Vorschriften der Datenschutzbestimmung nach Abschluss der Untersuchung anonymisiert. Es steht Ihnen jederzeit frei, die weitere Teilnahme an dieser Studie ohne Nennung von Gründen zu widerrufen. Wir würden uns jedoch sehr freuen, wenn Sie uns bei unserem Anliegen unterstützen könnten. Über die Ergebnisse unserer Untersuchung werden wir Sie gerne informieren.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Matthias Kopp

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der
 Universitätsklinik Freiburg
 Dr. Matthias Kopp, Gonza Ngoumou
 Matthildenstrasse 1 in 79106 Freiburg, Tel. 0761 270 4427

FRAGEBOGEN

Wir möchten Ihnen heute zunächst einige Fragen stellen:

1. Sind bei Ihnen während der Schwangerschaft gesundheitliche Probleme aufgetreten? Falls ja, welche?

2. Haben Sie während der Schwangerschaft Medikamente eingenommen? Falls ja, welche?

3. Sind bei Ihnen Krankheiten bekannt wie Diabestes, Rheuma, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (z.B. Morbus Crohn), chronische Infektionen (z.B. Hepatitis)? Falls ja, welche?

Besten Dank für das Ausfüllen dieses Fragebogens!

.....

Einverständniserklärung

Ja, wir sind/ich bin mit der in beiliegender Aufklärung beschriebenen Untersuchung einverstanden und willige für mich und unser Kind in die Teilnahme ein.

Wir haben die gegebenen Erläuterungen gelesen und verstanden. Wir wissen insbesondere, dass wir und unser Kind freiwillig teilnehmen und jederzeit aus der Untersuchung ausscheiden können, ohne dass uns irgendwelche Nachteile entstehen.

Name der Mutter:

Name des Vaters:

Strasse

Wohnort

Telephonnummer

e-mail

Unterschrift der
Mutter:

Unterschrift des
Vaters:

1980 – 1985	Grundschule: „Ecole du centre administratif“ in Yaoundé, Kamerun
1985 – 1992:	Gymnasium: „Centre d’enseignement secondaire de Ngoa-Ekellé“ und “Lycée général Leclerc” in Yaoundé, Kamerun. Abschluss: Baccalauréat 1992 (=Allgemeine Hochschulreife)
1992 – 1994	Berufsfachschule für Krankenpflege im Krankenhaus III. Orden in München.
04/1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen.
03/1996	Ärztliche Vorprüfung in Giessen
03/1997	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Giessen
09/2000	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Giessen
10/00 – 09/01	Praktisches Jahr in Giessen
Ende 10/2001	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Giessen
04/02 – 09/03	Ärztin im Praktikum im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg
01/04 – 09/04	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe für Allergologie, Leiter: PD Dr. M. Kopp, Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg
Seit 10/04	Assistenzärztin im Zentrum für Kinder und Jugendmedizin des Kreiskrankenhauses Lörrach

Freiburg, im Oktober 2004