

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt
&
dem Institut für Molekulare Immunologie
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Institutsleiter: Prof. Dr. PhD D.J. Schendel PhD

Zytokinsezernierende T-Helfer-Zellen in Nabelschnurblut
und peripherem Blut Erwachsener – ein Vergleich



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jakob Florian Säckl

aus
Erlangen

2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Reinhard

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. R. Weissenbacher
Priv. Doz. Dr. R. Kammerer

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. S. Krauss-Etschmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
2 Hintergrund.....	6
2.1 Definition und Epidemiologie von Allergien	6
2.2 Typ-I-Allergie und die Dichotomie von T _H 1 und T _H 2 auf der Ebene der Zytokine	8
2.3 Die Dichotomie von T _H 1 und T _H 2 auf Ebene der Chemokinrezeptoren (CKR)	9
2.4 In utero priming	10
2.5 Probleme der verschiedenen Methoden der Zytokinmessung in Nabelschnurblut	10
3 Zielsetzung.....	13
4 Material und Methoden.....	14
4.1 Probanden- und Gruppeneinteilung	14
4.2 Probengewinnung	15
4.3 Routineblutbild und Bestimmung der Immunglobuline	15
4.4 Immunophänotypisierung.....	15
4.5 Zellkultur	16
4.5.1 Präparation der mononukleären Zellen (PBMC)	16
4.5.2 Stimulation mit Staphylokokkenenterotoxin B (SEB).....	17
4.6 Cytometric Bead Array (BD Biosciences).....	18
4.7 Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)	20
4.8 Magnetische Anreicherung IL-4, IL-10 sezernierender Zellen.....	22
4.9 Durchflusszytometrische Messung.....	24
4.10 Statistische Auswertung.....	25
4.11 Material	26
4.11.1 Glas- und Plastikmaterial	26
4.11.2 Apparative Einrichtungen.....	26
4.11.3 Reagenzien.....	27
4.11.4 Antikörper.....	27
4.11.5 Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)	27
4.11.6 Cytometric Bead Array (BD Biosciences).....	28

5	Ergebnisse	29
5.1	Gruppen	29
5.1.1	Erwachsene	29
5.1.2	Neugeborene	29
5.2	CD4- und CD8-positive T-Zellen	31
5.3	CD45RO-positive T-Zellen	31
5.4	CD19-positive B-Zellen	32
5.5	Chemokinrezeptoren.....	32
5.5.1	CCR5	33
5.5.2	CXCR3.....	34
5.5.3	CCR4	36
5.5.4	CCR3	37
5.6	Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)	38
5.6.1	Kinetik	38
5.6.2	Intra Assay Kontrolle	39
5.6.3	Interferon Gamma (IFN- γ).....	39
5.6.4	Interleukin 4 (IL-4).....	41
5.6.5	Interleukin 10 (IL-10).....	43
5.7	Cytometric Bead Array (BD Biosciences)	45
5.7.1	Interferon Gamma (IFN- γ).....	45
5.7.2	Interleukin 4 (IL-4).....	46
5.8	T _H 1/T _H 2-Quotient.....	46
5.8.1	Chemokinrezeptoren.....	47
5.8.2	Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)	47
5.8.3	Cytometric Bead Array (CBA)	48
6	Diskussion.....	50
6.1	Studienpopulation	50
6.2	Methodik	51
6.2.1	Durchflusszytometrie	51
6.2.2	Stimulation mit SEB und Zytokin Secretions Assay	51
6.2.3	Cytometric Bead Array (CBA)	53
6.3	Ergebnisse der Immunophänotypisierung.....	53
6.3.1	CD4- und CD8-positive Zellen, sowie CD4/CD8-Ratio	53
6.3.2	CD19-positive B-Zellen	54

6.3.3	CD45RO-positive Memory-Zellen	54
6.3.4	Chemokinrezeptor CCR5 und CXCR3.....	55
6.3.5	Chemokinrezeptor CCR4	55
6.4	Ergebnisse der Zytokinmessungen	56
6.4.1	Interferon γ	56
6.4.2	Interleukin 4	57
6.4.3	Interleukin 10	58
6.5	Zeigt Nabelschnurblut eine balancierte Immunantwort vor und nach Stimulation mit SEB?	59
6.5.1	T_H1/T_H2 -Quotient auf Ebene der Chemokinrezeptoren.....	60
6.5.2	T_H1/T_H2 -Quotient auf Ebene der Zytokinsekretion	60
7	Zusammenfassung.....	62
	Abbildungsverzeichnis	65
	Abkürzungsverzeichnis	66
	Tabellenverzeichnis	67
	Bibliographie	68
	Lebenslauf	78

1 Einleitung

In den vergangenen 20 bis 30 Jahren hat die Prävalenz allergischer Krankheiten in den industrialisierten Ländern deutlich zugenommen. Allergische Erkrankungen stellen damit einen erheblichen Kostenfaktor für die Gesundheitssysteme dar. Es ist daher sinnvoll, Individuen mit erhöhtem Atopierisiko frühzeitig zu identifizieren, um ihnen gezielt primäre Präventionsmaßnahmen zukommen zu lassen. Andererseits zählen obstruktive Bronchitiden zu den häufigsten Erkrankungen des frühen Kindesalters. Diese lassen sich häufig weder klinisch noch laborchemisch von allergisch bedingten Bronchitiden unterscheiden, so dass auch nicht atopische Kinder unnötig einer teuren Therapie einer vermeintlichen Allergie zugeführt werden. Es ist daher von hohem Interesse, ein einfaches diagnostisches Werkzeug zu entwickeln, welches die frühzeitige Identifizierung von Personen mit erhöhtem Atopierisiko ermöglicht. Ziel dieser Arbeit ist es daher, Nabelschnurblut hinsichtlich des T_H1/T_H2 -Zytokinmusters – einem möglichen prädiktiven Marker einer Atopie – zu charakterisieren und mit einer gesunden erwachsenen Kontrollpopulation zu vergleichen.

2 Hintergrund

2.1 *Definition und Epidemiologie von Allergien*

Allergien sind Krankheiten der postindustriellen Neuzeit, die bis vor hundert Jahren als Raritäten betrachtet wurden und bis dahin nicht einmal Anlass gaben für eine semantische Definition dieser medizinischen Entität⁽³³⁾.

Erst Clemens von Pirquet führt 1906 den Terminus „Allergie“ ein. Er versteht darunter eine veränderte Reaktion des Immunsystems auf Reize, sowohl im Sinne einer Überreaktion als auch im Sinne einer Abschwächung. Im Laufe der Zeit erfährt der Begriff „Allergie“ eine Einengung: Er bezeichnet eine hypersensitive Reaktion auf Reize, die unter normalen Umständen nicht zu einer Aktivierung des Immunsystems führen, also eine überbordende und damit inadäquate Immunreaktion.

Coombs und Gell teilen in ihrer Veröffentlichung *„Clinical Aspects of Immunology“*⁽²⁶⁾ aus dem Jahre 1993 die Allergie nach dem primären Träger der Immunantwort in vier

Typen, den anaphylaktischen Typ I, den zytotoxischen Typ II, den Immunkomplexvermittelten Typ III und den zellvermittelten Typ IV ein. Im Folgenden wird unter „Allergie“ eine Typ I und damit IgE vermittelte Immunantwort verstanden.

Klinisch präsentiert sich eine Allergie nicht einheitlich, sondern sehr heterogen als allergische Rhinitis, allergische Konjunktivitis, Heuschnupfen, allergische Dermatitis, Nahrungsmittelallergie oder als allergisches Asthma. Diese Krankheitsbilder werden im Folgenden nicht unterschieden, sondern als verschiedene Manifestationen einer zugrunde liegenden generellen Neigung zur Atopie betrachtet.

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen nimmt in industrialisierten Ländern zu^(51;115;121). Die Erkenntnis, dass in Ostdeutschland trotz höherer Umweltverschmutzung Allergien weniger weit verbreitet sind als in den alten Bundesländern, führte – zusammen mit der mangelnden Erklärbarkeit durch genetische Faktoren – zur Formulierung der so genannten „Hygiene-Hypothese“: Veränderte sozioökonomische Bedingungen, insbesondere ein Rückgang der Infektionskrankheiten in der frühen Kindheit bzw. eine veränderte „mikrobielle Umgebung“ könnten mitverantwortlich für den Anstieg der Allergien in westlichen Ländern sein. Diese Hypothese wird von vielen epidemiologischen Studien gestützt: Das Risiko einer Allergie nimmt mit der Zahl der Geschwister ab und ist höher beim Erstgeborenen^(94;114); die Prävalenz von Allergien ist in Familien mit einem anthroposophischen Lebensstil geringer⁽¹⁾, was sich mit restriktiverem Einsatz von Antibiotika⁽¹¹⁹⁾ und einer geringeren Durchimpfung erklären lässt; epidemiologische Daten legen eine inverse Korrelation zwischen Atopieneigung und durchgemachten Infektionskrankheiten, insbesondere Masern^(43;90), Tuberkulose^(92;112) und Hepatitis A⁽⁵⁷⁾ nahe. Möglicherweise spielt dabei die Gesamtheit an Erregern, denen ein Kind ausgesetzt ist, eine größere Rolle als der Kontakt mit einem bestimmten Erreger^(55;58;113).

Weiterhin haben Kinder, die in einer Landwirtschaft aufwachsen, ein geringeres Allergierisiko als Kinder, die in ländlicher Umgebung groß werden ohne direkten Kontakt mit Nutztieren zu haben^(38;76;111). Eine mögliche Erklärung dafür ist die hohe Exposition an bakteriellen Produkten wie Lipopolysaccharide, die via IL-12 eine starke Induktion von T_H1-Zellen bewirken^(53;108). So konnten Gereda et al. zeigen, dass hohe Hausstaub Endotoxin Konzentrationen mit einem geringeren Allergierisiko einhergehen⁽²⁷⁾.

Einige Studien liefern Hinweise, dass veränderte Ernährungsgewohnheiten, insbesondere eine erhöhte Aufnahme von mehrfach ungesättigten gegenüber gesättigten Fettsäuren, mit einer erhöhten Prävalenz von Asthma einhergehen^(5;30). Zusammenfassend lässt die bisherige Datenlage den Schluss zu, dass die zunehmende Prävalenz von allergischen Erkrankungen unter anderem auf veränderte sozioökonomische Bedingungen, insbesondere auf eine geringere Exposition gegenüber Krankheitserregern zurückzuführen ist.

2.2 Typ-I-Allergie und die Dichotomie von T_H1 und T_H2 auf der Ebene der Zytokine

Für das Verständnis allergischer Erkrankungen spielt die T_H1/T_H2 -Zelldichotomie eine zentrale Rolle. Bei T_H1/T_H2 -Zellen handelt es sich um zwei $CD4+$ Lymphozytenpopulationen, die beide dem spezifischen Immunsystem zugerechnet werden, aber antagonistisch wirksame Zytokine produzieren. Diese distinkten Zellpopulationen wurden erstmals von Mosmann et al. in einem Mausmodell beschrieben⁽⁶³⁾. Gruppen von Romagnani und Kapsenberg konnten zeigen, dass auch beim Menschen analoge Subsets von $CD4+$ Zellen nachweisbar sind^(70;120).

T_H2 -Zellen bilden u.a. IL-4, IL-5 und IL-13, jedoch wenig bzw. kein IL-2 und IFN- γ . T_H1 -Zellen dagegen produzieren IFN- γ und IL-2.

Entsprechend wurde untersucht, ob sich diesen Populationen unterschiedliche Rollen in der humanen Immunantwort zuteilen lassen: IFN- γ bewirkt eine Aktivierung von Makrophagen und moduliert die zytotoxische T-Zell Antwort. Damit ist es das Hauptzytokin der zellulären Immunantwort⁽²³⁾. IL-4 und IL-13 lösen in B-Zellen den Isotyp-Switch zu IgE⁽¹⁷⁾ aus und sind somit ein wichtiger Regulator der humoralen Immunität. IL-5 führt zur Ausreifung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten⁽⁸⁵⁾.

Da nur T_H2 -Zellen sowohl via T-Zell Rezeptor direkt Allergene erkennen als auch Zytokine produzieren können, die einen Switch von IgM zu IgE – dem primären Träger der Typ I Allergie – induzieren, wird angenommen, dass ein T_H1/T_H2 -Ungleichgewicht zugunsten von T_H2 -Zellen zur Entstehung atopischer Erkrankungen führt. Entsprechend konnten T_H2 -Zellen in peripherem Blut und in Hautläsionen von Patienten mit Neurodermitis^(51;109), in Nasenschleimhaut von Patienten mit

allergischer Rhinitis und in bronchoalveolärer Flüssigkeit von Asthmapatienten nachgewiesen werden^(18;79).

Ein weiteres Zytokin, welches von CD4+-Zellen, insbesondere regulatorischen T-Zellen, aber auch einer Vielzahl anderer Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert wird, ist IL-10. So scheint IL-10 das Überleben von Eosinophilen und deren Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu hemmen⁽¹⁰²⁾. Es konnte gezeigt werden, dass in der bronchoalveolären Lavage bei Asthmapatienten weniger IL-10 nachweisbar ist als bei gesunden Kontrollen⁽⁸⁾ und Makrophagen im Sputum bei Asthmatikern weniger IL-10 exprimieren⁽¹⁰¹⁾. Im Gegensatz dazu konnten Lim et al. zeigen, dass während der Spätreaktion auf Allergene bei Asthmatikern periphere Makrophagen größere Mengen von IL-10 sezernieren als in der Kontrollgruppe⁽⁴⁵⁾. IL-10 ist also ein immunmodulatorisches Zytokin, dessen Rolle bei der Entstehung einer Atopie noch nicht abschließend geklärt ist.

2.3 Die Dichotomie von T_H1 und T_H2 auf Ebene der Chemokinrezeptoren (CKR)

Die T_H1 - respektive T_H2 -Subpopulationen der T-Zellen sind primär über deren Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen definiert. Verschiedene Gruppen konnten jedoch zeigen, dass mit den jeweiligen Subsets auch bestimmte Oberflächenmarker aus der Gruppe der Chemokinrezeptoren assoziiert sind.

Chemokinrezeptoren spielen eine maßgebliche Rolle bei der Emigration der Leukozyten zum Ort der Entzündung⁽⁸⁴⁾. Nahezu alle Chemokinrezeptoren werden auf T-Lymphozyten exprimiert und gelten als Marker für Reife, Differenzierung und Aktivierungsgrad⁽⁸³⁾.

T_H1 -Zellen exprimieren präferentiell CCR5 und CXCR3^(48;74). CXCR3 gilt dabei als Marker, der hauptsächlich von aktivierten T-Zellen exprimiert wird⁽⁴⁷⁾. Humane IL-4 produzierende Zelllinien exprimieren CCR3. Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass CCR3-positive Zellen IL-4 sezernieren, so dass eine Assoziation von CCR3 und T_H2 -Zellen nahe liegt^(7;122). Auch CCR8⁽¹²⁵⁾ und CCR4⁽¹⁴⁾ gelten als Marker, die hauptsächlich auf T_H2 -Zellen exprimiert werden. So berichteten Nakatani et al., dass CCR4-positive Zellen in Patienten mit atopischer Dermatitis vermehrt nachgewiesen werden können⁽⁶⁴⁾.

2.4 *In utero priming*

Bereits 1993 stellte Tom Wegmann die Hypothese auf, dass eine erfolgreiche Schwangerschaft eine Verschiebung der maternalen Immunitätslage in Richtung T_H2 -Reaktion erfordert⁽¹¹⁸⁾. Folgeuntersuchungen konnten zeigen, dass eine persistierende T_H1 -Reaktion mit gehäuften Aborten einhergeht⁽³⁴⁾.

Passend dazu zeigen Neugeborene ein relatives Überwiegen von T_H2 -Zellen, definiert als IL-4 produzierende Zellen^(12;31;89). Dies scheint durch eine relativ verminderte IFN- γ Synthese verursacht zu sein⁽⁸⁹⁾. Weiter wurde gezeigt, dass bei späteren Atopikern die IFN- γ Synthese im Nabelschnurblut stärker vermindert ist als bei späteren nicht-Atopikern,^(56;71;77;103;117). Prescott et al. konnten in einer longitudinalen Untersuchung zeigen, dass bei atopischen Individuen die Ausreifung der T_H1 -Zellen verzögert ist, bzw. eine Persistenz der T_H2 -Reaktion mit der Entwicklung einer Allergie korreliert⁽⁷²⁾. Unterschiede des Zytokinexpressionsmusters lassen sich bei symptomatischen Atopikern und einer gesunden Vergleichspopulation auch im Alter von 6 Jahren noch nachweisen⁽⁹³⁾.

In utero findet jedoch nicht nur eine generelle Verschiebung in Richtung T_H2 -Reaktion statt, sondern auch ein Allergen spezifisches Priming des kindlichen Immunsystems. So reagieren T-Lymphozyten aus Nabelschnurblut auf Stimulation mit verbreiteten Allergenen mit Produktion von Zytokinen^(21;98); dies legt einen pränatalen Kontakt mit Allergenen nahe. Herz et al. konnten dies unter kontrollierten Bedingungen an einem Mausmodell nachvollziehen⁽²⁹⁾.

Trotz konsistenter Belege, dass T-Zellen bereits in utero mit Allergenen Kontakt haben, bleiben Mechanismus und klinische Relevanz dieses Vorgangs bisher im Dunklen.

2.5 *Probleme der verschiedenen Methoden der Zytokinmessung in Nabelschnurblut*

Die Quantifizierung von Zytokinen in Nabelschnurblut ist nicht unproblematisch. Dies gilt insbesondere für T_H2 -assoziierte Zytokine, da die Vorläuferfrequenz dieser Zellen in der Regel sehr niedrig ist. So war in Untersuchungen von Prescott et al. IL-4 auch bei späteren Allergikern im Nabelschnurblut nur auf molekularer Ebene mittels semi-quantitativer PCR nachweisbar. Der Nachweis des sezernierten IL-4 war wegen der niedrigen Proteinkonzentration nicht möglich. Gleiches galt für IFN- γ , sofern mit

Allergenen stimuliert wurde^(42;44;72). Der Nachweis spezifischer mRNA kann jedoch nicht zwangsläufig mit translatiertem und sezerniertem Protein gleichgesetzt werden. PCR-basierte Untersuchungen geben ferner keinen Aufschluss über den Phänotyp der Zytokin-synthetisierenden Zelle.

In einem anderen Ansatz wurden CD4⁺ T-Zell-Klone durch polyklonale Stimulation mit Phythämagglutinin und Phorbolestern aus Nabelschnurblut gezüchtet. In den Zellkulturüberständen dieser Klone konnte nach Allergen-Stimulation IL-4 nachgewiesen werden⁽³²⁾. Der Haupteinwand gegen die Zuverlässigkeit solcher Bestimmungen besteht darin, dass der Klonierungsvorgang möglicherweise das Wachstum bestimmter T-Zellen bevorzugt und so eine Verzerrung des T_H1/T_H2-Profiles herbeiführt.

Einzelne ELISA-basierte Spezialmethoden zeichnen sich zwar durch hohe Sensitivität aus⁽²⁰⁾, geben jedoch wiederum keine Information über die sezernierende Zelle.

Eine weitere Methode beruht auf dem Nachweis intrazellulärer Zytokine. Hierfür werden Zellen mit Calcium-Ionophoren und Phorbolestern maximal stimuliert, um eine möglichst hohe Zytokinsynthese zu erhalten. Weiterhin wird die Sekretion dieser Zytokine durch Zugabe eines Sekretionsinhibitors (z.B. Brefeldin A) verhindert, so dass die nachzuweisenden Zytokine in der Zelle akkumulieren. Nach Permeabilisierung der Zellmembran mit einem Detergens können zytokinspezifische Antikörper in die Zelle gelangen und so die Zytokine durchflusszytometrisch messbar machen. Vorteil dieser Methode ist, dass simultan zur Zytokinmessung auch zelluläre Oberflächenmarker bestimmt werden können. So erhält man Aufschluss über den Phänotyp der Zytokin-synthetisierenden Zelle. Nachteilig ist, dass die genannte Stimulationsmethode hochartifizuell ist, so dass unspezifische Verzerrungen des Zytokinmusters nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Weiter ist nicht auszuschließen, dass unvollständig translatierte oder fehlgefaltete Zytokine intrazellulär nachgewiesen werden, die in vivo nicht sezerniert würden. Die gemessenen Zytokinpiegel wären dann durch biologisch inaktive Zytokinbruchstücke falsch hoch.

Aufgrund erheblicher methodischer Unterschiede ist es zurzeit kaum möglich, unterschiedliche Studien zur Zytokinproduktion von Nabelschnurblut miteinander zu vergleichen. Wie oben ausgeführt, hat jede Methode ihre spezifischen Vor- und

Nachteile. Eine sensitive Quantifizierung biologisch aktiver Zytokine bei gleichzeitiger Phänotypisierung der sezernierenden Zellen in einem Ansatz ist bisher nicht möglich.

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Vorteile der beschriebenen Methoden – nämlich hohe Sensitivität, eine möglichst physiologische Stimulation sowie die Möglichkeit der umfassenden Zellcharakterisierung – in einem neuen, möglichst einfachen Ansatz zu vereinen. Ferner sollen die Nachteile der genannten Methoden – mangelnde Information über den zellulären Phänotyp bzw. artifizielle Verzerrungen des T_H1/T_H2 -Profils – so gering wie möglich gehalten werden. Hierfür soll ein kürzlich entwickelter sog. Sekretions Assay (Fa. Miltenyi Biotech) verwendet werden, um Nabelschnurblut hinsichtlich der Zytokinproduktion zu charakterisieren. Dabei werden im Einzelnen die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 gemessen.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen untersucht werden:

- Zeigt Nabelschnurblut ein anderes Zytokinsekretionsmuster als peripheres Blut Erwachsener?
- Lässt sich in Nabelschnurlymphozyten gegenüber Lymphozyten Erwachsener das beschriebene Überwiegen von T_H2 -Zellen bestätigen?
- Falls ja, handelt es sich um ein Überwiegen IL-4-produzierender Zellen oder um ein Fehlen IFN- γ -produzierender Zellen?
- Lässt sich dieser postulierte Unterschied auch nach Stimulation nachweisen?
- Zeigen der Zytokin Sekretions Assay und der Cytometric Bead Array konkordante Ergebnisse?
- Lässt sich dies auf Ebene der Chemokinrezeptoren bestätigen?
- Sind die jeweiligen Zytokin-produzierenden Zellen vorwiegend Gedächtniszellen (CD45RO) oder naive Zellen (CD45RA)?

4 Material und Methoden

4.1 Probanden- und Gruppeneinteilung

Für die Kontrollgruppe wird ein Kollektiv von freiwilligen, gesunden, männlichen Erwachsenen rekrutiert. Eine atopische Disposition bzw. eine manifeste Allergie wird anamnestisch ausgeschlossen. Um eine Anämie (Hb<13,5g/dl für männliche Probanden) oder eine Leukozytose (Leukozyten>10⁴/μl) zu erkennen, wird ein maschinelles Routineblutbild erstellt. Sowohl Anämie als auch Leukozytose stellen in der beschriebenen Kontrollpopulation ein Ausschlusskriterium dar.

Die Vergleichsgruppe enthält reife, gesunde Neugeborene (37;0 SSW – 41;6 SSW), die vaginal entbunden wurden.

Primäre Ausschlusskriterien sind alle Faktoren mit einem möglichen Einfluss auf die kindlichen Zytokinspiegel. Die Einzelkriterien sind dabei wie folgt:

- andere Entbindungsmodi als spontane vaginale Geburt
- Hinweise auf perinatale Asphyxie (5-Minuten APGAR-Wert ≤ 7 , NSpH < 7,1)
- unter- oder übergewichtige Kinder (<2500g oder >4000g)
- Infektionszeichen bei der Mutter (Fieber >38,5°C, Leukozyten >15.000/μl, CRP >20mg/l)
- klinische oder laborchemische Infektionszeichen beim Kind (Rekapillarierungszeit >2“, CRP > 40 mg/l)

Weiterhin werden retrospektiv alle Probanden ausgeschlossen, deren Blut mit mütterlichem IgA kontaminiert ist.

Die Eltern werden mündlich und schriftlich ausführlich aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wird eingeholt. Aus logistischen Gründen erfolgt die Aufklärung – wie im Ethikantrag dargelegt – erst nach Abnahme der Blutprobe. Verweigern die Eltern nach ausführlicher Aufklärung ihr Einverständnis, werden Blutproben und gesammelte Unterlagen vernichtet.

Mit Hilfe zweier Fragebogen werden Komplikationen während der Schwangerschaft erfasst und Informationen über das individuelle Allergierisiko des Kindes gesammelt. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Erfassung der familiären Allergianamnese. Als objektiver Parameter wird auch der IgE-Wert im Nabelschnurserum bestimmt.

4.2 Probengewinnung

In der Kontrollgruppe werden 10ml venöses Blut in Natriumheparin abgenommen. Ein automatisiertes Blutbild wird aus 1ml EDTA Blut erstellt.

Die Rekrutierung der Neugeborenenpopulation erfolgt in der I. Universitätsklinik, Maistraße. Dort wird direkt nach der Entbindung aus der plazentären Vena umbilicalis 10ml Nabelschnurblut in vorbereiteten, mit Natriumheparin beschickten 10ml Spritzen abgenommen. Weiterhin wird 1ml EDTA Blut für ein maschinelles Routineblutbild und 1ml Serum für die Bestimmung der Immunglobuline gewonnen. Das Heparinblut wird innerhalb von 2h verarbeitet.

4.3 Routineblutbild und Bestimmung der Immunglobuline

Ein maschinelles Blutbild wird im eigenen Labor (Coulter Counter, Fa. Beckmann) erstellt. Die Bestimmung der Serumimmunglobuline (IgA und IgE) erfolgt als Standarddiagnostik im Zentrallabor der Klinik.

4.4 Immunophänotypisierung

Die Immunophänotypisierung erfolgt in Vollblut mittels Durchflusszytometrie. Dabei werden alle relevanten Oberflächenmoleküle mit direkt markierten Antikörpern gefärbt und mittels 4 Farben Durchflusszytometer analysiert. Die optimale Konzentration der Antikörper wird in Titrationsreihen in Vollblut bestimmt. Tabelle 1 zeigt das hierzu verwendete Färbeschema:

	FITC	PE	APC	PC5
Tube 1	CD4	CCR5	CD45RO	CD8
Tube 2	CD4	CCR4	CD45RO	CD8
Tube 3	CXCR3	CD4	CD45RO	CD8
Tube 4	IgG1	IgG2a	CD4	CD8
Tube 5	CAD9	CD19	CD4	CD8
Tube 6	CCR3	CD4	CD45RO	CD8

Tab.1: Immunophänotypisierung, Färbeschema

Durchführung:

Je 50µl mit EDTA antikoaguliertes Blut werden in ein 1,5ml Probengefäß überführt und mit je 5µl des verdünnten Antikörpers (nach sorgfältigem Mischen) für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach folgt ein Waschschrift mit 1ml PBS. Nach Lyse der Erythrozyten mit 1,5ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer werden die Proben in FACS Tubes überführt und bei 4°C bis zur durchflusszytometrischen Analyse aufbewahrt. Zur Analyse werden 12000 Zellen in einem Lymphozyten-Gate (G1=R1), gesetzt nach Zellgröße und Granulationsgrad, aufgenommen und in einem zweiten dot plot hinsichtlich CD4 und CD8 differenziert. Ein logisches Gate, auf die CD4+ respektive CD8+ Fraktion gesetzt, erlaubt in einem weiteren dot plot (CD4/CD8 vs. CD45RO) die Selektion einer dreifach positiven Untergruppe. Zur Bestimmung der immunologischen Reife wird jeweils CD4 und CD8 gegen CD45RO aufgetragen.

4.5 Zellkultur

4.5.1 Präparation der mononukleären Zellen (PBMC)

Die Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll Hypaque™ ist eine Methode zur Isolierung der mononukleären Zellen aus Vollblut. Durch Überschichten der Probe über Ficoll und anschließende Zentrifugation kommt es zu einer Auftrennung der zellulären Bestandteile entlang eines Dichtegradienten. Die mononukleären Zellen reichern sich dabei in einer Intermediärphase an. In der dichten Phase findet man hauptsächlich Erythrozyten, Granulozyten und Zelldebris, wohingegen die obere, weniger dichte Phase fast ausschließlich Plasmaproteine und Thrombozyten enthält.

Durchführung:

Die heparinisierte Blutprobe wird mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:3 verdünnt und in einem 50ml Reaktionsgefäß über 20ml Ficoll Hypaque™ geschichtet. Eine anschließende Zentrifugation (20min, 2600rpm) bei Raumtemperatur führt zur Auftrennung der Zellen entlang des Dichtegradienten.

Die Intermediärphase mit den mononukleären Zellen wird mit der Glaspipette vorsichtig abgenommen und in einem weiteren 50ml Reaktionsgefäß mit mindestens 25ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation (10min, 1300rpm) bei Raumtemperatur wird der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 250µl Kulturmedium (RPMI, 5% FCS) resuspendiert. Bei diesem Verfahren gewinnt man

durchschnittlich 10^6 Lymphozyten aus 1ml Blut. Um eine konstante Zelldichte zu gewährleisten wird die genaue Zahl der Lymphozyten in der Neubauer Zählkammer bestimmt und das durch erneute Zentrifugation gewonnene Pellet so in Medium (RPMI, 5% FCS) resuspendiert, dass die Konzentration 2 mal 10^6 Zellen pro 100 μ l Zellsuspension beträgt. Sämtliche Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen an einem Abzug mit Laminar Air Flow durchgeführt.

4.5.2 Stimulation mit Staphylokokkenenterotoxin B (SEB)

Zur Induktion der Zytokinsynthese werden die Zellen in Kulturplatten mit einem Superantigen (Staphylokokkenenterotoxin B) stimuliert. Negativkontrollen stellen sicher, dass eine unspezifische Aktivierung der Zellen durch die Inkubation als solche erkannt wird.

Durchführung:

Aus der SEB-stock-Lösung mit der Konzentration von 1mg/ml wird mit Kulturmedium (RPMI, 5% FCS) eine 1:10 Verdünnung hergestellt, so dass die Endkonzentration in der Platte 20 μ g/ml pro Ansatz beträgt. Die Induktion der IFN- γ -Synthese wird in einer 96-Well-Platte (U-bottom) durchgeführt. Pro Ansatz werden 2 mal 10^5 Zellen eingesetzt. Die Kulturplatte wird unter dem Abzug wie folgt angesetzt:

Negativkontrolle	Probe
10 μ l Zellsuspension	10 μ l Zellsuspension
90 μ l Medium	70 μ l Medium
	20 μ l SEB (1:10)

Tab 2: **IFN- γ Assay** (96-Well-Platte, U-bottom)

Analog dazu erfolgt die Induktion der IL-4- bzw. IL-10-Synthese in 48-Well-Platten (flat bottom). Hier werden pro Ansatz 2 mal 10^6 Zellen eingesetzt. Die Kulturplatte wird unter dem Abzug wie folgt bestückt:

Negativkontrolle	Probe
100 µl Zellsuspension	100 µl Zellsuspension
200µ Medium	140µl Medium
	60 µl SEB (1:10)

Tab 3: **IL-4, IL-10 Assay** (24-Well-Platte, flat bottom)

Zellsuspension und Medium werden in der Platte vorgelegt und erst danach die Stimulation durch Zugabe von SEB gestartet; dabei ist speziell in der flat bottom Platte auf eine sorgfältige Durchmischung der Zellen mit SEB zu achten. Um in jedem Well identische Bedingungen zu erhalten, werden die an die probenhaltigen Wells angrenzenden Löcher mit Medium befüllt. Die Stimulation erfolgt im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für 10h.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Überstände der stimulierten und unstimulierten Proben gepoolt und sofort bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

4.6 Cytometric Bead Array (BD Biosciences)

Der Cytometric Bead Array ist eine Methode zum quantitativen Nachweis löslicher Proteine mittels Durchflusszytometrie. Es handelt sich dabei um einen partikelbasierten Test, der in einer Probe mehrere Proteine gleichzeitig misst (Multiplexing). Mehrere distinkte Partikelpopulationen werden vom Hersteller mit einem Fluorochrom so markiert, dass die Populationen anhand der „Fluoreszenzhelligkeit“ unterschieden werden können. Jede einzelne Partikelpopulation ist zusätzlich mit Antikörpern, deren Bindungsstelle gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist, beschichtet. Nach Bindung der zu messenden Proteine erfolgt die Markierung mit Fluorochrom markierten Detektionsantikörpern, die an das bereits partikelgebundene Protein binden.

So erfolgt eine zweidimensionale Auftrennung des Partikelgemischs. Auf Achse 1 finden sich die distinkten Partikelpopulationen. Damit wird die Unterscheidung zwischen den nachzuweisenden Proteinen möglich. Auf der Achse 2 erfolgt die Auftrennung nach Menge des gebundenen Sekundärantikörpers und damit nach

Menge des Proteins im Analysat. Eine kalibrierende Verdünnungsreihe mit Proteinstandards ermöglicht die Quantifizierung des Ergebnisses.

Durchführung:

In unserem Versuchsaufbau werden IFN- γ und IL-4 (jeweils vor und nach Stimulation mit SEB) gemessen. Dabei wird sich strikt an das Protokoll des Herstellers (BD Biosciences) gehalten. Die Ergebnisse werden zur weiteren statistischen Auswertung in eine Excel Tabelle übertragen.

4.7 Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)

Der Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech) ist eine Methode, die es ermöglicht sezernierte – und damit biologisch aktive – Zytokine auf Einzelzellniveau quantitativ nachzuweisen. Dazu bindet in einem ersten Schritt ein bispezifischer Antikörper an die Zelloberfläche, dessen einer Arm gegen ein ubiquitäres Lymphozytenantigen gerichtet ist. Somit befindet sich jetzt auf jeder Zelle eine einem zytokinspezifischen „Fangnetz“ vergleichbare Catch-Matrix. Während der Sekretionsphase bindet das von der Zelle sezernierte Zytokin an den zweiten Arm des Antikörpers. Ein PE-markierter Sekundärantikörper, dessen Bindungsstelle spezifisch für ein zweites Epitop des Zytokins ist, ermöglicht den durchflusszytometrischen Nachweis der Zytokin-positiven Zellen.

Durchführung:

Die im Folgenden beschriebenen Wechsel zwischen der Arbeit auf Eis und bei 37°C sind kritisch und peinlich genau einzuhalten. Nach Stimulation werden die Proben in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Der folgende Ansatz wird auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 1000µl Puffer und gründlicher Durchmischung werden die Zellen bei 4°C und 300g pelletiert. Dieser Waschschrift wird nach vollständigem Absaugen des Überstandes wiederholt.

Nach Resuspendierung der Zellen in 80µl (IL-4 und IL-10 Assay) bzw. 90µl (IFN-γ Assay) wird der bispezifische Catch-Antikörper in einer Menge von 20µl (IL-4 und IL-10) bzw. 10µl (IFN-γ) hinzupipettiert. Nach sorgfältigem Mischen inkubieren die Proben 5min auf Eis.

Während der Inkubationszeit wird in 15ml Tubes 5ml (für die Messung von IL-4 und IL-10) bzw. in 50ml Tubes 10ml (Messung von IFN-γ) warmes Kulturmedium vorgelegt, in welches die Proben anschließend überführt werden. Es folgt eine 45min Sekretionsphase bei 37°C in einem Zellschüttler. Um eine Agglomeration der Zellen, deren Folge es wäre, dass einzelne Zellen auch Zytokine der Nachbarzelle an der Oberfläche binden, zu vermeiden, werden diese mit 150rpm bewegt.

Um die Zytokinsekretion möglichst prompt zu stoppen, werden die Reaktionsgefäße anschließend mit kaltem (4°C) Puffer aufgefüllt und in der gekühlten (4°C) Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet in Eppendorf Reaktionsgefäße

überführt und mit 1000 μ l Puffer bei 300g erneut gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wird das Pellet in 90 μ l (IFN- γ) bzw. 80 μ l (IL-4, IL-10) kaltem Puffer resuspendiert und 10 μ l (IFN- γ) bzw. 20 μ l (IL-4/IL-10) eines zytokinspezifischen mit Phycoerythrin markierten Antikörpers (sog. detection reagens) zugegeben.

Um eine genauere Immunophänotypisierung der Zellen zu erreichen, werden zusätzliche Oberflächenantigene gefärbt. Tabelle 4 zeigt das exakte Färbeschema:

<i>IFN-γ</i>	<i>IL-4, IL-10</i>
10 μ l detection reagens (PE)	20 μ l detection reagens (PE)
10 μ l CD45RO-APC (1:10)	10 μ l CD45RO-APC (1:10)
10 μ l CD4-FITC (1:30)	10 μ l CD4-FITC (1:30)

Tab. 4: ***Färbeschema, Sekretions Assay***

Nach Mischen folgt eine 10min Inkubation auf Eis und ein Waschschrift mit 1000 μ l kaltem Puffer (4°C und 300g). Die Pellets der IFN γ -spezifischen Proben werden nun in 300 μ l kaltem Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bei 4°C bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

4.8 Magnetische Anreicherung IL-4, IL-10 sezernierender Zellen

Trotz Stimulation ist die Frequenz der IL-4- und IL-10-positiven Zellen so niedrig, dass sie durchflusszytometrisch nicht sicher nachzuweisen sind. Deshalb ist es notwendig diese anzureichern. Dazu werden die Zellen mit einem gegen Phycoerythrin gerichteten Antikörper markiert, der mit ferromagnetischen Partikeln beladen ist (anti-PE-microbeads). In einer Säule durchlaufen die Zellen anschließend ein Magnetfeld, in dem diejenigen Zellen, die mit ferromagnetischen Antikörpern beladen sind und deshalb mit dem angelegten Magnetfeld interagieren, zurückgehalten werden. Unmarkierte Zellen durchlaufen die Säule ungehindert und werden verworfen. Entfernt man die Säule aus dem Magnetfeld, lassen sich die Zellen mit einem Stempel – vergleichbar einem Spritzenstempel – mechanisch aus der Säule eluieren.

Durchführung:

Die Pellets der IL-4- und IL-10-spezifischen Proben werden in 100µl kaltem Puffer resuspendiert. Um Proben vor und nach magnetischer Anreicherung vergleichen zu können, werden 20µl entnommen, in FACS-Röhrchen überführt und mit 300µl kaltem Puffer verdünnt. Die verbleibenden 80µl werden in Eppendorf Reaktionsgefäßen mit je 20µl anti-PE-microbeads für 15min auf Eis inkubiert. Durch Waschen mit 1000µl kaltem Puffer (4°C und 300g) wird der überschüssige Antikörper entfernt. Der Überstand wird komplett abgenommen und die Zellen werden in 500µl kaltem Puffer aufgenommen. Die Probengefäße verbleiben auf Eis.

Nach Installation der Säule (MiniMACS, Miltenyi Biotech) im Magnetfeld, wird diese mit 500µl kaltem Puffer äquilibriert. Wie bei allen folgenden Schritten ist auch hier sorgfältig darauf zu achten, dass das Reservoir der Säule vollständig entleert ist, bevor erneut Proben oder Puffer aufgebracht werden. Nach Durchlauf der Probe wird die Säule dreimal mit je 500µl kaltem Puffer gewaschen, während sie sich noch im Magnetfeld befindet. Dieser Schritt dient der Entfernung von negativen Zellen, die auf Grund von unspezifischen Adhäsionskräften möglicherweise in der Säule verblieben sind. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Positivfraktion mit 1000µl kaltem Puffer durch schnelles Herunterdrücken des Stempels herausgedrückt. Die Probe wird dabei direkt im FACS-Röhrchen

aufgefangen.

Zytokine Sekretions Assay: Graphische Darstellung der Methodik

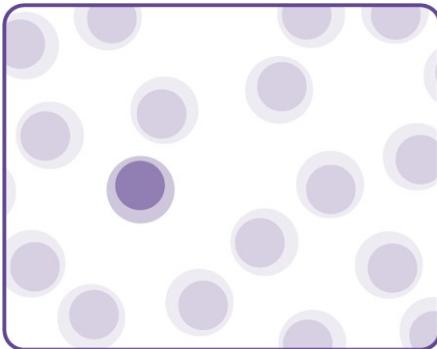


Abb.A: nach Stimulation mit SEB

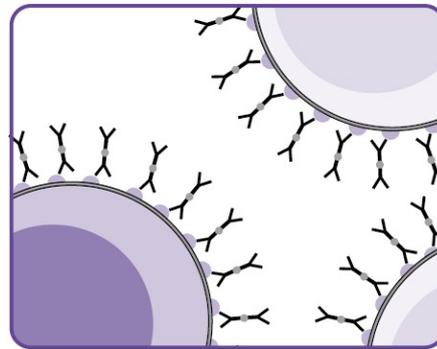


Abb.B: Catch-Matrix

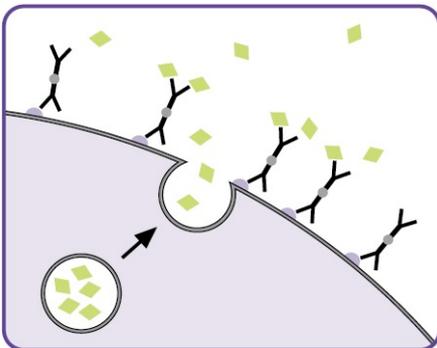


Abb.C: Sekretions Phase

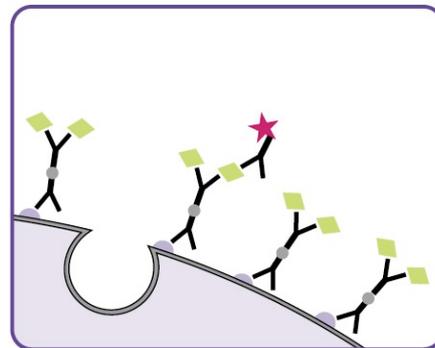


Abb.D: Labeling mit PE-Ab

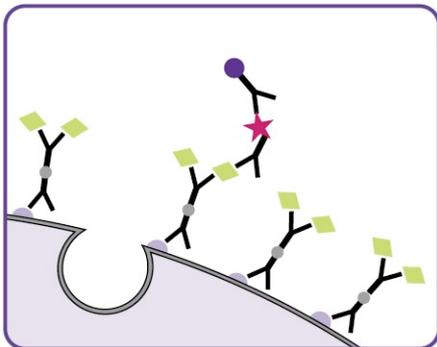


Abb.E: Markierung mit ferro-magnetischen beads

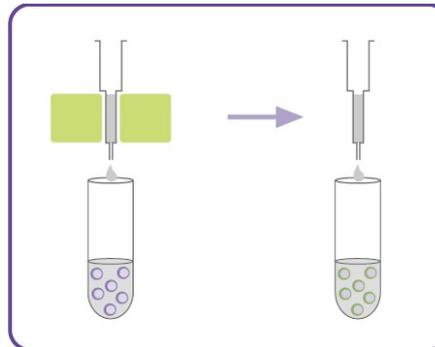


Abb.F: Magnetische Anreicherung mit Säulen

Abb.1: **Zytokin Sekretions Assay:** Nach Stimulation mit Staphylokokken Enterotoxin (Abb.A) wird mit einem bivalenten Antikörper Dimer eine Catch Matrix auf der Zelloberfläche fixiert (Abb.B). Diese bindet in der folgenden Sekretionsphase das sezernierte Zytokin (Abb.C). Nach Markierung mittels eines PE-markierten Antikörpers (Abb.D) sowie Aufbringen der anti-PE beads (Abb.E), die mit einem Magnetfeld interagieren (Abb.F), kann die Probe durchflusszytometrisch analysiert werden (alle Graphiken mit freundlicher Genehmigung von Miltenyi Biotec).

4.9 Durchflusszytometrische Messung

Direkt vor Durchführung der Analyse werden in allen Proben tote Zellen mit je 10µl Propidiumiodid gefärbt. In einem elektronischen Lymphozytengate (G1=R1) – gesetzt nach Zellgröße und Granulationsgrad – werden 12000 Ereignisse aufgenommen. Bei den angereicherten Fraktionen erreicht man auf Grund der niedrigen Frequenz der positiven Zellen meist nur eine Zahl von 5000-8000 Ereignissen.

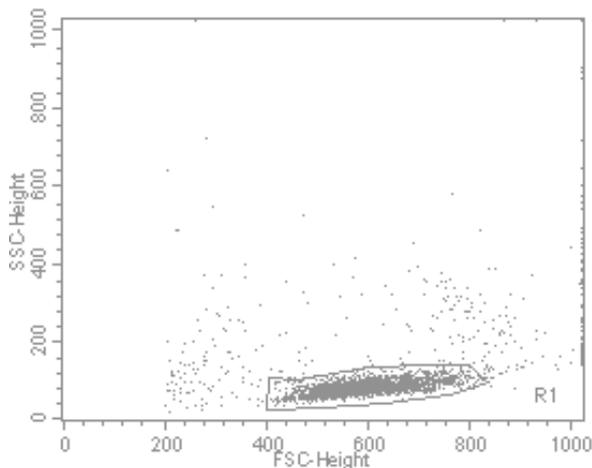


Abb.2: Lymphozytengate nach FSC/SSC

In einem weiteren dot-plot, in dem FL2 gegen FL3 aufgetragen ist, wird ein Gate (G2=R2) auf die lebenden Zellen gesetzt. Propidiumiodid gefärbte – und damit tote Zellen, die die Integrität der Zellmembran verloren haben – stellen sich als Wolke dar, die im 45° Winkel von der doppelt negativen Wolke in die rechte obere Ecke zieht.

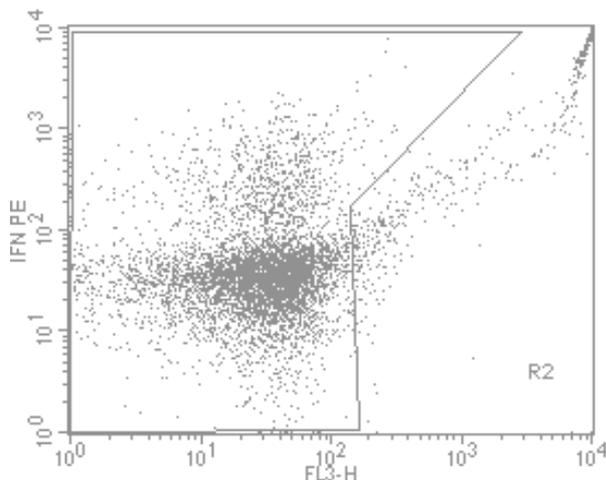


Abb.3: Gate zur Selektion der vitalen Zellen

Allen weiteren dot-plots liegt die Schnittmenge aus dem Lymphozytengate und dem Gate auf die lebenden Zellen zugrunde (G3=R1 AND R2). Alle Prozentzahlen beziehen sich also auf die Gesamtheit der vitalen Lymphozyten.

Jetzt trägt man in einem dritten dot-plot CD4-FITC gegen Zytokin-PE auf und bestimmt – nach Definition eines weiteren logischen Gates – den Prozentsatz der CD4+/Zytokin+ Zellen.

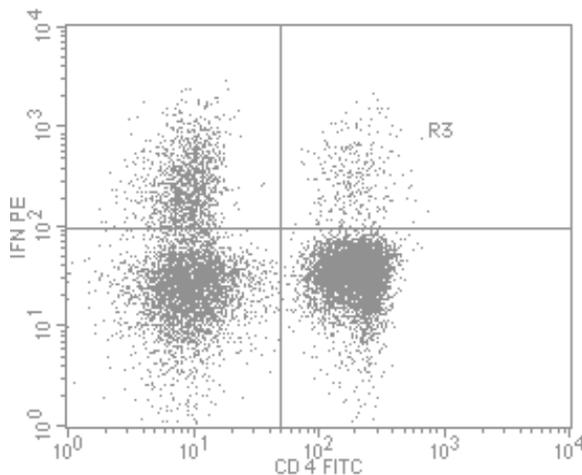


Abb.4: **Prozentsatz der Zytokin+/
CD4+ Zellpopulation**

Ein weiteres logisches Gate (G4=R1 AND R2 AND R3) ermöglicht die Unterteilung der Zytokin+/CD4+ Population in naive Zellen und Gedächtniszellen in einem weiteren dot-plot anhand des Markers CD45RO.

Alle gewonnenen Daten werden anschließend zur weiteren Auswertung in eine Excel Tabelle übertragen.

Die Analyse der Oberflächenmarker im Vollblut erfolgt analog: Zuerst wird die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC selektiert. Danach erfolgt die Auswertung nach den Fluoreszenzmarkern im jeweiligen Analysat. Alle Ergebnisse werden zur weiteren statistischen Auswertung in eine Excel Tabelle übertragen.

4.10 Statistische Auswertung

Da bei den vorliegenden Fallzahlen nicht von einer Normalverteilung der Werte auszugehen ist, werden Mediane (sowie die Spannweite der Werte) angegeben. Zum Vergleich zweier Gruppen wird der nicht parametrische Mann-Whitney-U Test für unverbundene Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau wird bei $p < 0,05$

festgelegt. Alle Berechnungen werden mit SPSS 11.5 (SPSS Inc.) vorgenommen. Alle Diagramme werden mit Prism 4.0 (Graph Pad Software) sowie Excel XP (Microsoft) erstellt.

4.11 Material

4.11.1 Glas- und Plastikmaterial

- Zellkulturplatte, 96-Well, u-bottom (NUNC)
- Zellkulturplatte, 48-Well, flat-bottom (Greiner Labortechnik)
- Reaktionsgefäß, 1,5ml (Eppendorf)
- Reaktionsgefäß, 15ml (Greiner Labortechnik)
- Reaktionsgefäß, 50ml (Greiner Labortechnik)
- FACS-Röhrchen, FALCON (Becton-Dickinson)
- Einfriertubes, 1,8ml (NUNC)
- Einmalplastikpipette, 10ml (Roth)
- Pipettenspitzen, kristallin, gelb, blau (Eppendorf)
- MACS Column MS (Miltenyi Biotech)
- Neubauer Zählkammer (Marienfeld)

4.11.2 Apparative Einrichtungen

- Gefrierschrank, -80°C (Kendro)
- Gefrierschrank, -20°C (Bosch)
- Kühlschranks, +4°C (Bosch)
- Kühlzentrifuge, MR1812 (Jouan)
- Kühlzentrifuge, Varifuge 20RS (Heraeus)
- Brutschrank (uni equip)
- Zellschüttler, Innova 400 (New Brunswick Scientific)
- Laminar Air Flow, Class 100 (Gelaire)
- Coulter Counter (Fa. Beckmann)
- MACS Multi Stand, zugehörige Magnete (Miltenyi Biotech)
- Pipettierhilfe, Easypet (Eppendorf)
- Pipetten, 0-10µl, 10-100µl, 20-1000µl (Eppendorf)

4.11.3 Reagenzien

- Medium, RPMI 1640 (Gibco)
- Fetal Bovine Serum (Gibco)
- Phosphate Buffer Saline
- Puffer: Phosphate Buffer Saline, 0,5% FCS, 2mM EDTA
- Ammoniumchlorid-Lysepuffer
- Ficoll Hypaque™ PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB)
- Staphylokokkenenterotoxin B (Sigma)
- Propidium Iodide Staining Solution (Pharmingen)

4.11.4 Antikörper

Spezifität	Spezies/Typ	Herkunft
CD4-PE	Maus, IgG1	Pharmingen
CD4-FITC	Maus, IgG1	Becton-Dickinson
CD8-PC5	Maus, IgG1	Immunotech
CD45RO-APC	Maus, IgG2a	Pharmingen
CD19-PE	Maus, IgG1	Immunotech
IgG1-FITC/IgG2a-PE	Maus, IgG1/IgG2a	Immunotech
CAD9-FITC	Ratte, IgG2a	GSF, E.Kremmer
CCR3-FITC	Ratte, IgG2a	R&D Systems
CXCR3-FITC	Maus, IgG1	R&D Systems
CCR4-PE	Maus, IgG2a	Pharmingen
CCR5-PE	Maus, IgG2a	Pharmingen
IgG2a-APC	Maus, IgG2a	Pharmingen

Tab. 5: **Antikörper**

4.11.5 Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)

- IFN- γ catch/label Reagenz
- IL-4 catch/label Reagenz
- IL-10 catch/label Reagenz
- Anti-PE-Microbeads

4.11.6 Cytometric Bead Array (BD Biosciences)

- Human IFN- γ und IL-4 Capture Beads
- Human T_H1/T_H2 PE Detection Reagent
- Human T_H1/T_H2 Cytokine Standards
- Cytometer Setup Beads
- PE positive Control
- FITC positive Control
- Wash Buffer
- Assay Diluent

5 Ergebnisse

5.1 Gruppen

5.1.1 Erwachsene

In die erwachsene Kontrollgruppe wurden 10 gesunde männliche Probanden mit negativer Allergianamnese eingeschlossen. Der Altersmedian betrug 28a (26-42). Davon waren 6 Raucher und 4 Nichtraucher. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern ließen sich mit dem *Mann-Whitney-U Test* nur bei der Subpopulation der CD4+/CXCR3+ Zellen nachweisen ($p=0,01$).

Alter*	Raucher	Leukozyten*	Lymphozyten*	Lymphozyten*	Hämoglobin*
in Jahre(n)		(mal $10^3/\mu\text{l}$)	(mal $10^3/\mu\text{l}$)	(in %)	(g/dl)
28 (26-42)	n=6	7,3 (6,3-9,6)	2,5 (1,5-3,6)	30,9 (25-39,3)	16,1 (14,9-17,0)

Tab.6: **Charakterisierung der Erwachsenen**

* Medianwerte (Spannweite)

Anamnestisch bestanden bei keinem der Probanden Hinweise auf eine akute Infektion. Eine Leuko- oder Lymphozytose lag nicht vor.

5.1.2 Neugeborene

Die Gruppe der Neugeborenen bestand aus 10 gesunden, vaginal entbundenen Kindern, von denen 7 weiblich und 3 männlich waren. Die Mütter wiesen keinerlei Zeichen einer manifesten Infektion auf. Der Median des Gestationsalters war 39+6 Wochen (35+6-41+4).

Statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts bestanden nicht. Auch hinsichtlich des Allergierisikos – eine Erhöhung desselben wurde angenommen bei einem Nabelschnur IgE>0,9ku/l und/oder einer positiven Anamnese mindestens eines Elternteils – erreichte kein Unterschied ein statistisch signifikantes Niveau. Dasselbe galt für das Rauchverhalten des Vaters (Mütter alle Nichtraucher) und für die Farbe des Fruchtwassers (grünlich tingiert versus klar; dick grünliches Fruchtwasser war ein Ausschlusskriterium).

Geschlecht (m/f)	Gestationsalter*	Gewicht* (in g)	Größe* (in cm)	APGAR 10min	pH im Blut*
3/7	39+6 (35+6 - 41+4)	3450 (2770-3890)	53 (47-55)	10	7,35 (7,1-7,89)

Alter Mutter (Jahre)	Allergierisiko hoch/niedrig	Vater raucht/nicht	Fruchtwasser (klar/grün)	IgA (mg/dl)	IgE* (kU/l)
30 (21-36)	3/7	5/5	6/3 1 unbekannt	4,2/4,8 n=8 IgA<4,2	0,39 (0,14-1,8) n=4 IgE<0,1

Leukozyten* (mal 10 ³ /µl)	Lymphozyten* (mal 10 ³ /µl)	Lymphozyten* (in %)	Hämoglobin* (g/dl)
15 (9,0-23,5)	5,4 (2,5-8,9)	35,1 (25,4-39,4)	14,5 (11,6-17,6)

Tab.7: **Charakterisierung der Neugeborenen**

*Medianwerte (Spannweite)

Die IgA-Messungen in allen Proben ergaben Werte unterhalb oder knapp oberhalb der Nachweisgrenze von 4,2 mg/dl. Folglich wurden sie als nicht mit mütterlichem Blut kontaminiert erachtet und in die Studie eingeschlossen.

5.2 CD4- und CD8-positive T-Zellen

Wir untersuchten die prozentuale Häufigkeit der CD4- und CD8-positiven T-Zellen im Vollblut von Erwachsenen und Neugeborenen. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

	CD4	CD8	CD4/CD8
CB*	33,1 (25,4-50,0)	16,1 (10,7-27,3)	2,25 (1,08-3,15)
PBMC*	36,6 (25,8-50,9)	21,7 (12,5-28,9)	1,81 (1,19-2,92)
p-Wert	0,353	0,165	0,315

Tab.8: **CD4- und CD8-positive Zellen**

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Weder der Prozentsatz der CD4- oder CD8-positiven Zellen noch die CD4/CD8 ratio unterschieden sich signifikant im Blut von Erwachsenen und Neugeborenen.

5.3 CD45RO-positive T-Zellen

Die Gesamtlumphozytenpopulation wurde auch hinsichtlich des Oberflächenmarkers CD45RO, einem Marker für Gedächtniszellen, untersucht. Folgende Befunde konnten im Vollblut erhoben werden:

	CD45RO+	CD4+/CD45RO+	CD8+/CD45RO+	CD45RO+ (bez. a. CD4+)	CD45RO+ (bez. a. CD8+)
CB*	7,12 (2,38-9,96)	5,34 (1,34-6,77)	0,67 (0,07-2,15)	12,3 (3,6-22,7)	4,6 (0,5-13,0)
PBMC*	35,71 (17,27-97,86)	23,41 (11,64-36,21)	9,7 (1,70-22,99)	64,9 (41,50-100)	40,1 (9,3-99,9)
p-Wert	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tab.9: **CD45RO-positive T-Zellen**

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Sowohl die Gesamtheit der CD45RO-positiven Zellen als auch der Prozentsatz der CD4+/CD45RO+ respektive CD8+/CD45RO+ Zellen war im Nabelschnurblut im Vergleich zum Blut gesunder Erwachsener hoch signifikant vermindert (s. Tab.9).

Um Einflüsse unterschiedlicher Konzentrationen von CD4+ und CD8+ Zellen auszuschalten, wurde auch der Anteil der Gedächtniszellen bezogen auf CD4- und CD8-positive Zellen ermittelt.

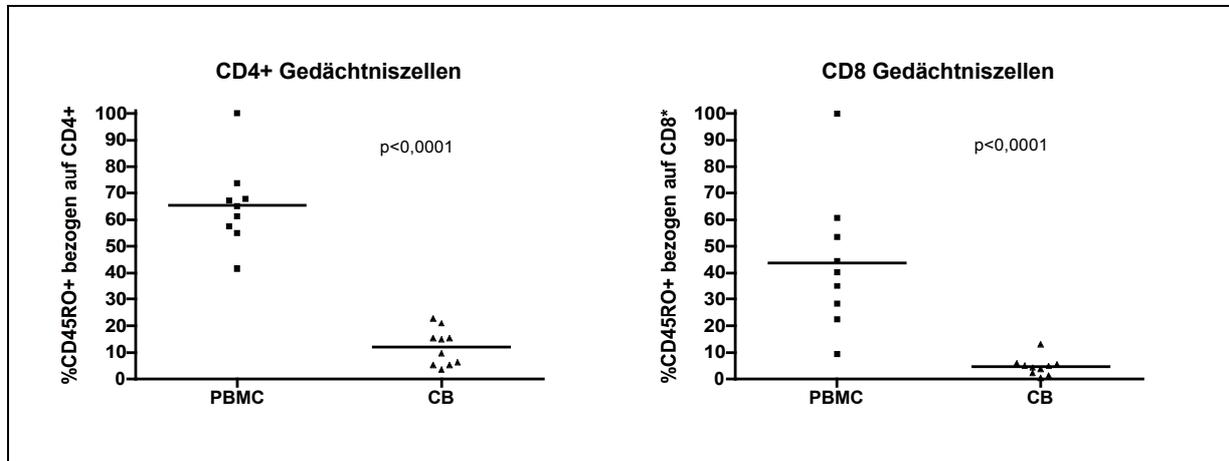


Abb.5: **CD4- und CD8-positive Gedächtniszellen**

Abbildung 5 zeigt, dass der Anteil der Gedächtniszellen sowohl in der Untergruppe der CD4+ als auch der CD8+ Zellen im Nabelschnurblut hoch signifikant niedriger ist als bei der Vergleichsgruppe der Erwachsenen ($p < 0,0001$).

5.4 CD19-positive B-Zellen

Hinsichtlich des prozentualen Anteils der B-Zellen, bezogen auf die Gesamtlymphozytenpopulation, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Nabelschnurblut und peripherem Blut einer gesunden erwachsenen Vergleichsgruppe ($p = 0,315$.) Im Nabelschnurblut betrug der Median 11,91% (5,21-17,86), bei der Kontrollgruppe 12,9% (10,21-19,23).

5.5 Chemokinrezeptoren

Um zu überprüfen, ob die Chemokinrezeptoren CCR5, CXCR3, CCR4 und CCR3 differente Expressionsmuster in Nabelschnurblut und Vollblut Erwachsener zeigen, verglichen wir deren Expression auf T-Zellen in diesen zwei Gruppen. Weiterhin unterschieden wir in den Subsets der CD4+ bzw. der CD8+ Zellen, durch Gegenfärbung mit Anti-CD45RO, Gedächtniszellen und naive Zellen.

5.5.1 CCR5

Bei der CCR5 Expression auf T-Zellen ergaben sich im Vollblut folgende Ergebnisse:

	CD4+/CCR5+	CCR5+ (bez. a. CD4+)	CD8+/CCR5+	CCR5+ (bez. a. CD8+)
CB*	0,1 (0,00-0,40)	0,37 (0,0-3,27)	0,08 (0,02-2,27)	0,37 (0,00-13,98)
PBMC*	3,4 (0,60-6,30)	9,43 (3,65-20,63)	6,44 (0,90-12,41)	26,01 (6,41-43,00)
p-Wert	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tab.10: **CCR5 auf T-Zellen**

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Abbildung 6 stellt den Unterschied in der Expression von CCR5 auf CD4- und CD8-positiven Zellen in Nabelschnurblut und bei Erwachsenen dar:

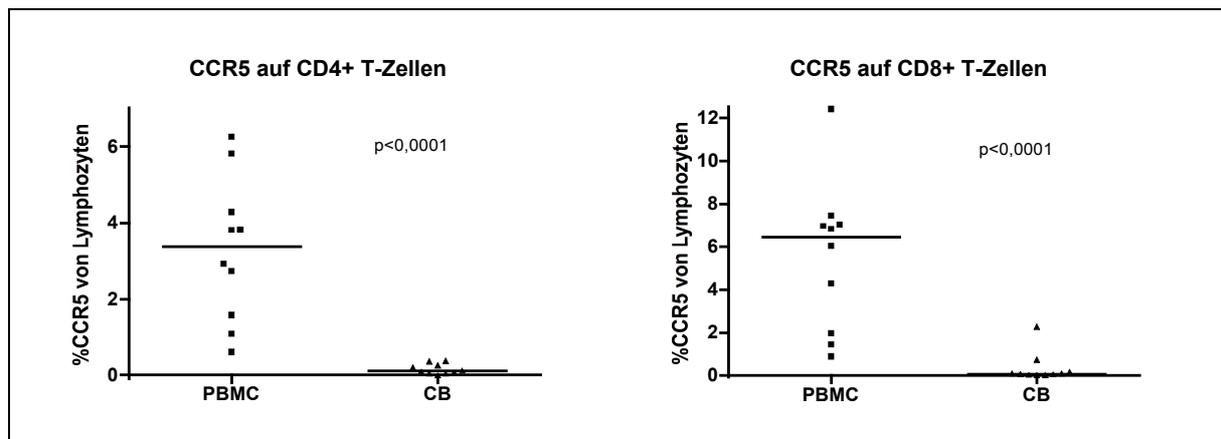


Abb.6: **CCR5 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen**

Sowohl bezogen auf CD4- als auch auf CD8-positive Zellen zeigt sich im Nabelschnurblut ein hoch signifikant geringerer Anteil an Zellen, die den Chemokinrezeptor CCR5 exprimieren (p<0,0001).

Eine weitere Unterteilung hinsichtlich Gedächtniszellen und naiver Zellen war bei den geringen Mengen von CCR5-positiven Zellen in Nabelschnurblut nicht möglich.

5.5.2 CXCR3

Bei der CXCR3 Expression auf T-Zellen ergaben sich im Vollblut folgende Ergebnisse:

	CD4+/CXCR3+	CXCR3+ (bez. a. CD4+)	CD8+/CXCR3+	CXCR3+ (bez. a. CD8+)
CB*	1,11 (0,59-7,77)	3,13 (1,88-21,84)	11,73 (5,21-21,75)	71,72 (56,15-85,20)
PBMC*	12,55 (9,27-16,93)	27,53 (23,55-40,14)	13,72 (9,55-20,49)	68,02 (51,73-79,66)
p-Wert	<0,0001	<0,0001	0,105	0,315

Tab.11: **CXCR3 auf T-Zellen**

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Abbildung 7 stellt den Unterschied zwischen der Chemokinrezeptorexpression CXCR3 auf CD4- und CD8-positiven Zellen in Nabelschnurblut und bei Erwachsenen dar:

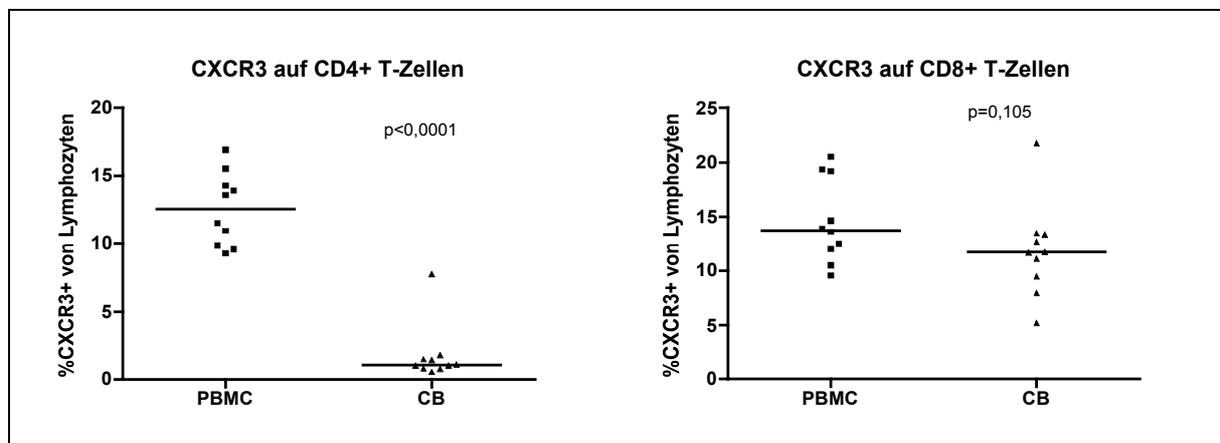


Abb.7: **CXCR3 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen**

CXCR3 wird in Nabelschnurblut auf einem hoch signifikant geringeren Prozentsatz der CD4+ Zellen exprimiert als in der erwachsenen Vergleichsgruppe ($p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu lassen sich auf CD8+ Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisen.

Zur genaueren Charakterisierung der CXCR3-positiven Zellen wurde der Anteil der Gedächtniszellen durch Gegenfärbung mit Anti-CD45RO bestimmt:

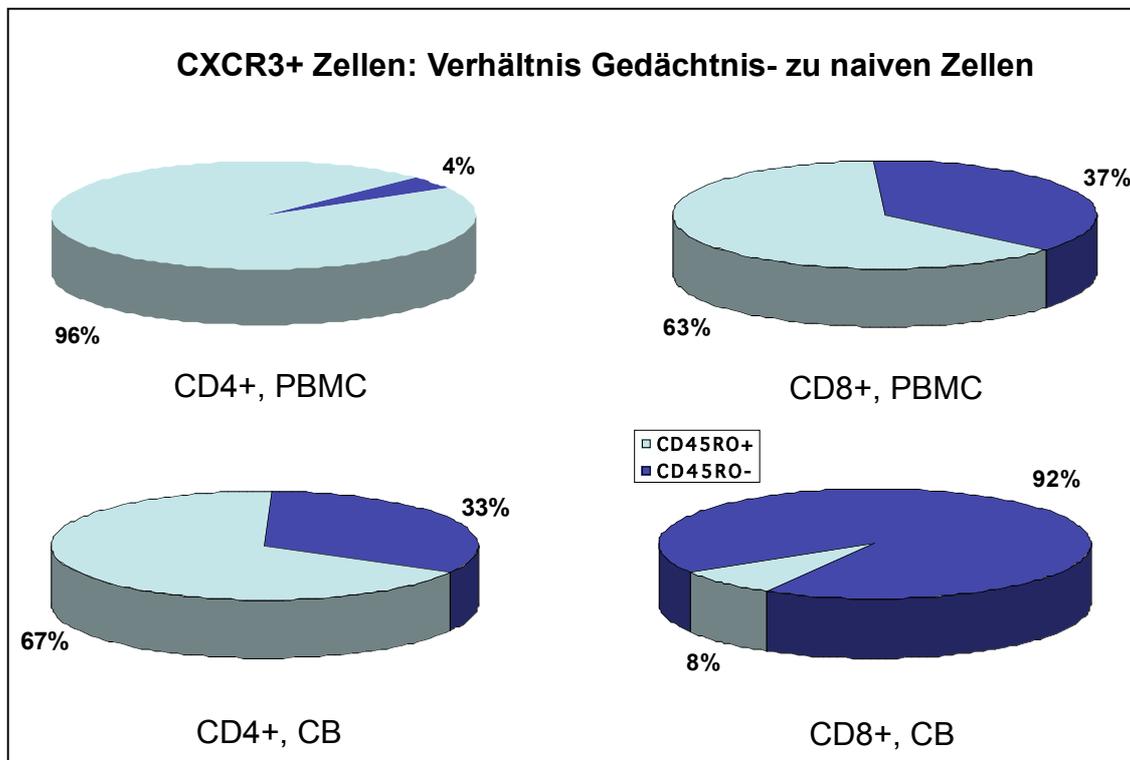


Abb.8: **Anteil CD45+ an CXCR3+**
dargestellt sind Medianwerte

Der Anteil der Gedächtniszellen an den CXCR3-positiven Zellen ist sowohl bei den CD4- als auch bei den CD8-positiven Zellen im Nabelschnurblut hoch signifikant geringer als im Blut der Erwachsenen ($p < 0,0001$ für CD4+ und $p = 0,0002$ für CD8+).

5.5.3 CCR4

Die Messung der CCR4 Expression auf T-Zellen – auch hier wurden CD4+ und CD8+ Zellen getrennt betrachtet – ergab folgende Ergebnisse:

	CD4+/CCR4+	CCR4+ (bez. a. CD4+)	CD8+/CCR4+	CCR4+ (bez. a. CD8+)
CB*	2,33 (1,57-3,75)	6,46 (3,24-17,22)	0,5 (0,1-1,9)	1,63 (0,23-4,15)
PBMC*	9,06 (7,12-13,21)	25,93 (17,82-28,57)	1,3 (0,4-4,8)	5,23 (1,92-14,56)
p-Wert	<0,0001	<0,0001	0,014	0,003

Tab.12: **CCR4+ auf T-Zellen**

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Abbildung 9 stellt den Unterschied zwischen der Chemokinrezeptorexpression CCR4 auf CD4- und CD8-positiven Zellen in Nabelschnurblut und bei Erwachsenen graphisch dar:

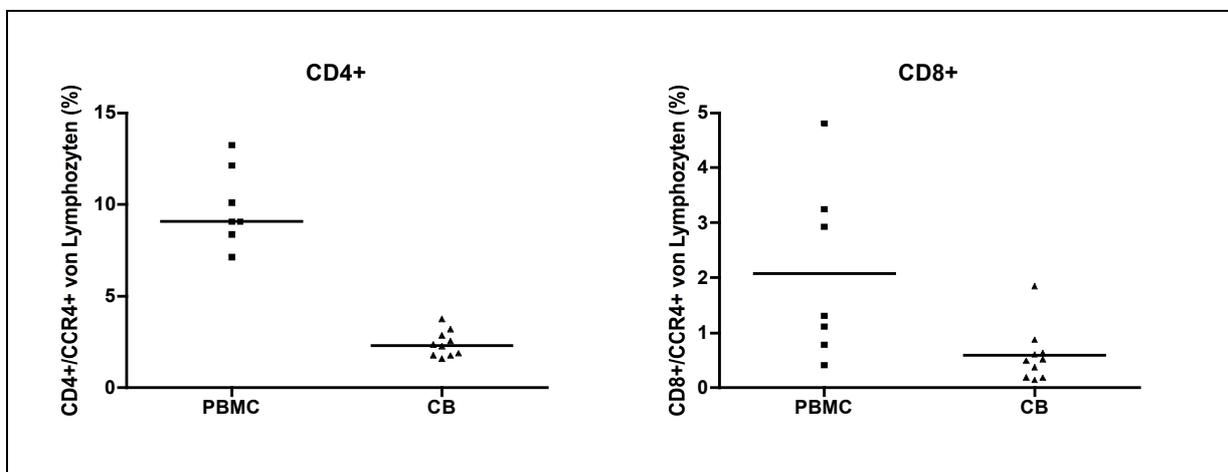


Abb.9: **CCR4 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen**

Sowohl bezogen auf CD4+ als auch auf CD8+ Zellen, ist der Prozentsatz der Zellen, die CCR4 exprimieren, hoch signifikant niedriger als bei der Vergleichsgruppe der Erwachsenen (s. Abb.9).

Zur genaueren Charakterisierung der CCR4-positiven Zellen wurde der Anteil der Gedächtniszellen durch Gegenfärbung mit Anti-CD45RO bestimmt:

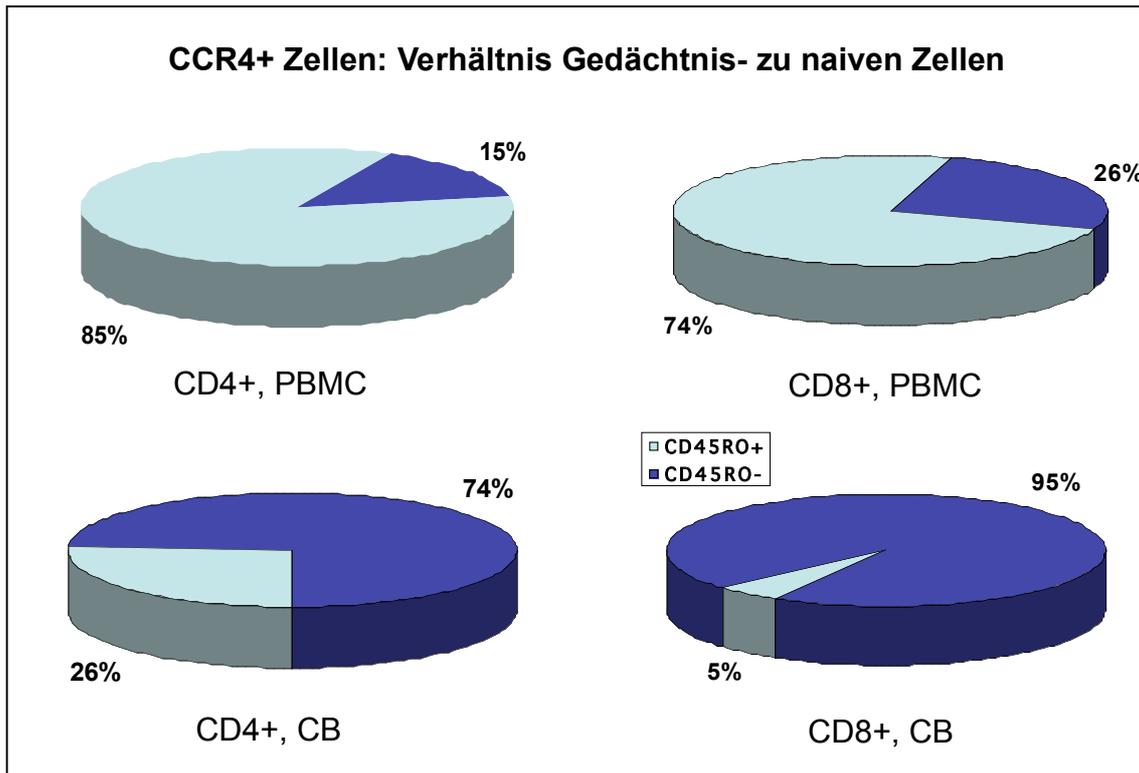


Abb.10: **Anteil CD45RO+ an CCR4+**
dargestellt sind Medianwerte

Der Anteil der Gedächtniszellen ist sowohl bei den CD4+ ($p=0,0001$) als auch bei den CD8+ ($p=0,0001$) Zellen im Nabelschnurblut signifikant geringer als im Blut Erwachsener.

5.5.4 CCR3

Weder in Nabelschnurblut, noch im Blut der erwachsenen Vergleichsgruppe war die Expression von CCR3 sicher von der Isotypkontrolle zu unterscheiden. Dies gilt auch für die Untergruppen der CD4+ und CD8+ T-Zellen.

5.6 Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)

Die Messung der Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-10 nach Isolierung der mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Stimulation mit SEB zeigte folgende Ergebnisse:

5.6.1 Kinetik

Um die ideale Dauer der Stimulation festzulegen, wurde in zwei Blutproben aus Nabelschnurblut der Prozentsatz der IFN γ -positiven Zellen bezogen auf CD4+ Zellen nach 6, 12 und 24 Stunden bestimmt. Die in Abbildung 11 gezeigten Prozentwerte entsprechen der Differenz aus mit SEB stimulierter Probe und der unstimulierten Kontrolle.

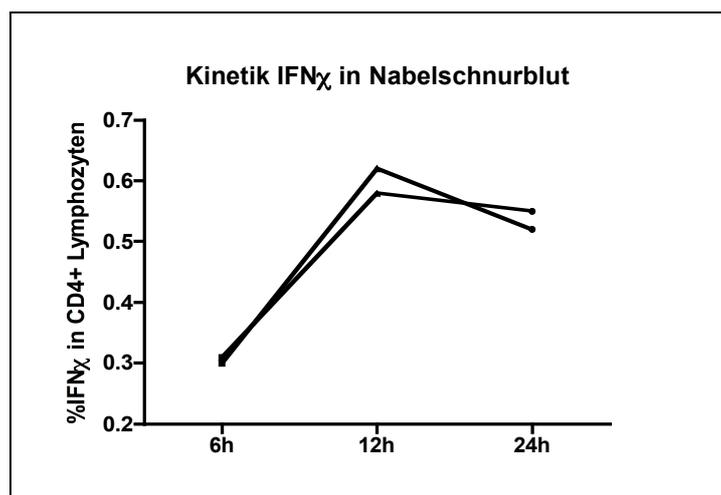


Abb.11: *IFN- γ Kinetik*

jede Linie entspricht dem Zeitverlauf der IFN- γ Sekretion in einer Probe

In beiden Proben lag das Maximum der IFN- γ Sekretion bei 12h. Aus logistischen Gründen wurde eine Stimulationszeit von 10h gewählt.

5.6.2 Intra Assay Kontrolle

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde an drei aufeinander folgenden Tagen die Zytokinsekretion im Blut eines gesunden erwachsenen Probanden gemessen. Dies erbrachte folgendes Ergebnis:

Messung	Δ IFN- γ	Δ IL-4	Δ IL-10
Tag1	1,36	0,011	0,32
Tag2	1,37	0,012	0,24
Tag3	1,73	0,008	0,20

Tab.13: **Intra Assay Kontrolle**

Die angegebenen Werte entsprechen der Differenz aus stimulierter Probe und unstimulierter Kontrolle; Anteil der CD4+/Zytokin+ Zellen bezogen auf alle CD4+ Zellen (in %); IL-4 und IL-10 Werte nach Anreicherung.

Trotz der Komplexität der experimentellen Anordnung lieferte der Assay relativ stabile Ergebnisse – sowohl vor als auch nach Anreicherung mittels ferromagnetisch markierter Antikörper.

5.6.3 Interferon Gamma (IFN- γ)

Die Messung der IFN- γ -produzierenden Zellen in Prozent der CD4+ Zellen ergab folgende Ergebnisse:

	IFN- γ + unstimuliert	IFN- γ + stimuliert	Δ IFN- γ +	IFN- γ +/ CD45RO+ ^a
CB*	0,12 (0-0,47)	0,99 (0,28-1,97)	0,77 (0,21-1,72)	13,25 (2,70-57,14)
PBMC*	0,15 (0,32-1,11)	3,97 (0,83-11,17)	3,65 (0,68-10,06)	83,73 (72,9-96,4)
p-Wert	0,393	0,002	0,002	<0,0001

Tab.14: **Auswertung IFN- γ** (Werte in %, bezogen auf CD4+)

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

^a Anteil der Gedächtniszellen an den IFN- γ +/
CD4+ Zellen

Vor Stimulation zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,393$) zwischen der IFN- γ Produktion von CD4+ T-Zellen in Nabelschnurblut (Median: 0,12%) und der Kontrollgruppe (Median: 0,15%). Nach Stimulation konnten wir im Nabelschnurblut jedoch einen hoch signifikant ($p=0,002$) niedrigeren Anteil an CD4+/IFN- γ + Zellen (Median: 0,99%) messen als in der Vergleichspopulation (Median: 3,97%).

Dieser Unterschied war auch baseline bereinigt (Δ IFN- γ =IFN- γ _{stimuliert} – IFN- γ _{unstimuliert}) nachzuweisen ($p=0,002$).

Abbildung 12 stellt die Unterschiede in der IFN- γ Produktion der CD4+ Zellen in Nabelschnurblut und dem Blut der erwachsenen Vergleichsgruppe graphisch dar.

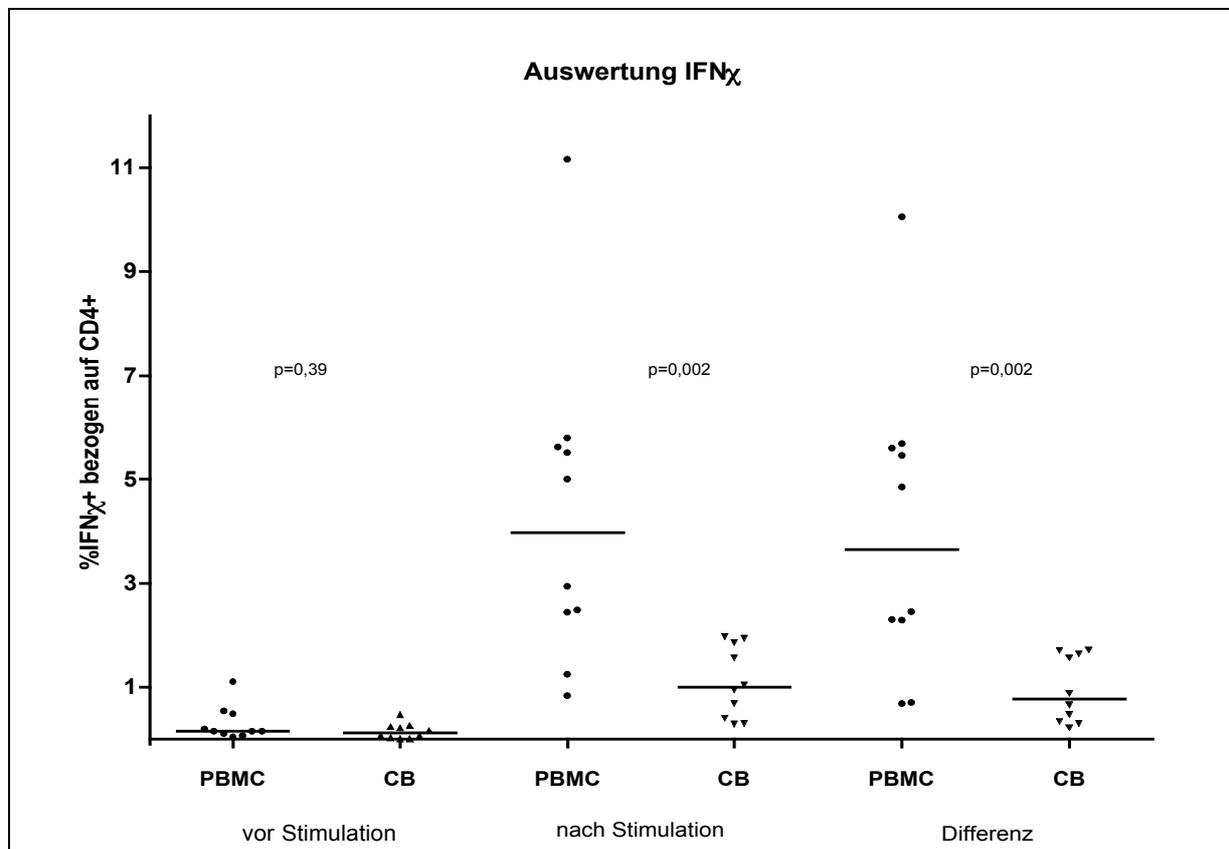


Abb.12: **Auswertung IFN- γ**

Durch Gegenfärbung mit anti-CD45RO wurde der Anteil der Gedächtniszellen an den CD4+/IFN- γ + Zellen bestimmt (s. Abb. 13); hierbei zeigte sich, dass der Anteil der CD45RO+ an den CD4+/IFN- γ + Zellen bei Erwachsenen (Median: 83,73%) hoch signifikant ($p<0,0001$) höher lag als bei Neugeborenen (Median: 13,25%).

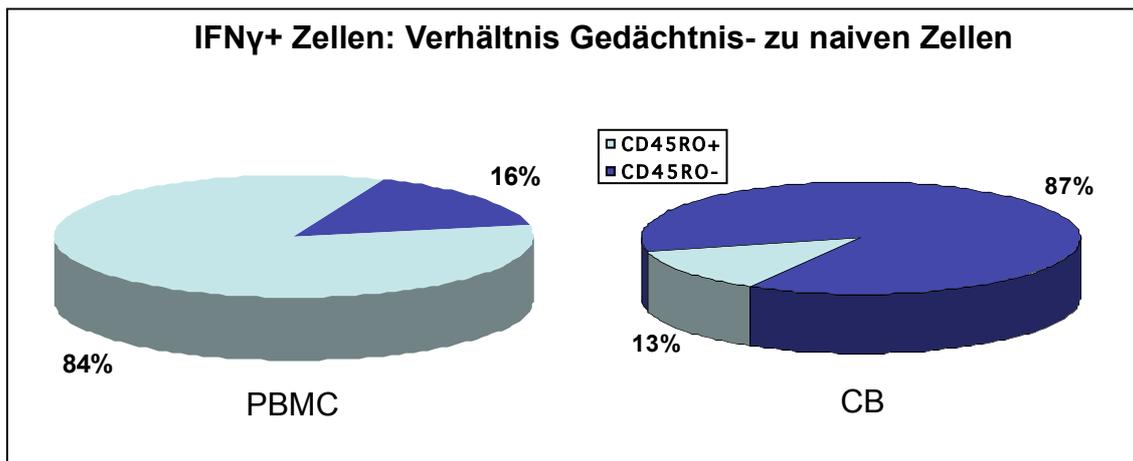


Abb.13: **Anteil CD45RO+ an CD4+/IFN- γ + Zellen**

dargestellt sind Medianwerte

5.6.4 Interleukin 4 (IL-4)

Bei der Messung der IL-4-produzierenden Zellen vor Anreicherung stellte sich heraus, dass deren Frequenz so gering ist, dass sich die stimulierte Probe in Nabelschnurblut nicht signifikant ($p=0,166$) von der unstimulierten Kontrolle unterschied. Tabelle 15 zeigt deshalb nur den Anteil der IL-4+ Zellen an den CD4+ Zellen nach Anreicherung:

	IL-4+ unstimuliert	IL-4+ stimuliert	Δ IL-4+	IL-4+/CD45RO+ ^a
CB*	0,0015 (0-0,27)	0,0058 (0,0020-0,042)	0,0037 (0,0020-0,016)	26,33 (4,55-60,00)
PBMC*	0,00086 (0,00028-0,0012)	0,027 (0,0034-0,48)	0,026 (0,0024-0,047)	87,41 (66,67-97,98)
p-Wert	0,043	0,005	0,002	<0,0001

Tab.15: **Auswertung IL-4 nach Anreicherung** (Werte in %, bezogen auf CD4+)

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

^a Anteil der Gedächtniszellen an den IL-4+/CD4+ Zellen

Vor Stimulation zeigte sich, dass der Anteil der IL-4+ Zellen an den CD4+ Zellen (Median: 0,0015%) in Nabelschnurblut signifikant höher ($p=0,043$) war als in der erwachsenen Vergleichsgruppe (Median: 0,00086%). Nach Stimulation kehrte sich dieses Verhältnis um: Der Median in Nabelschnurblut betrug 0,0058%, wohingegen der Median in der Kontrollgruppe 0,27% betrug ($p=0,005$). Dieser Unterschied war

auch baseline bereinigt ($\Delta \text{IL-4} = \text{IL-4}_{\text{stimuliert}} - \text{IL-4}_{\text{unstimuliert}}$) nachzuweisen ($p=0,002$). Abbildung 14 stellt die Unterschiede in der IL-4 Produktion der CD4+ Zellen in Nabelschnurblut und dem Blut der erwachsenen Vergleichsgruppe graphisch dar.

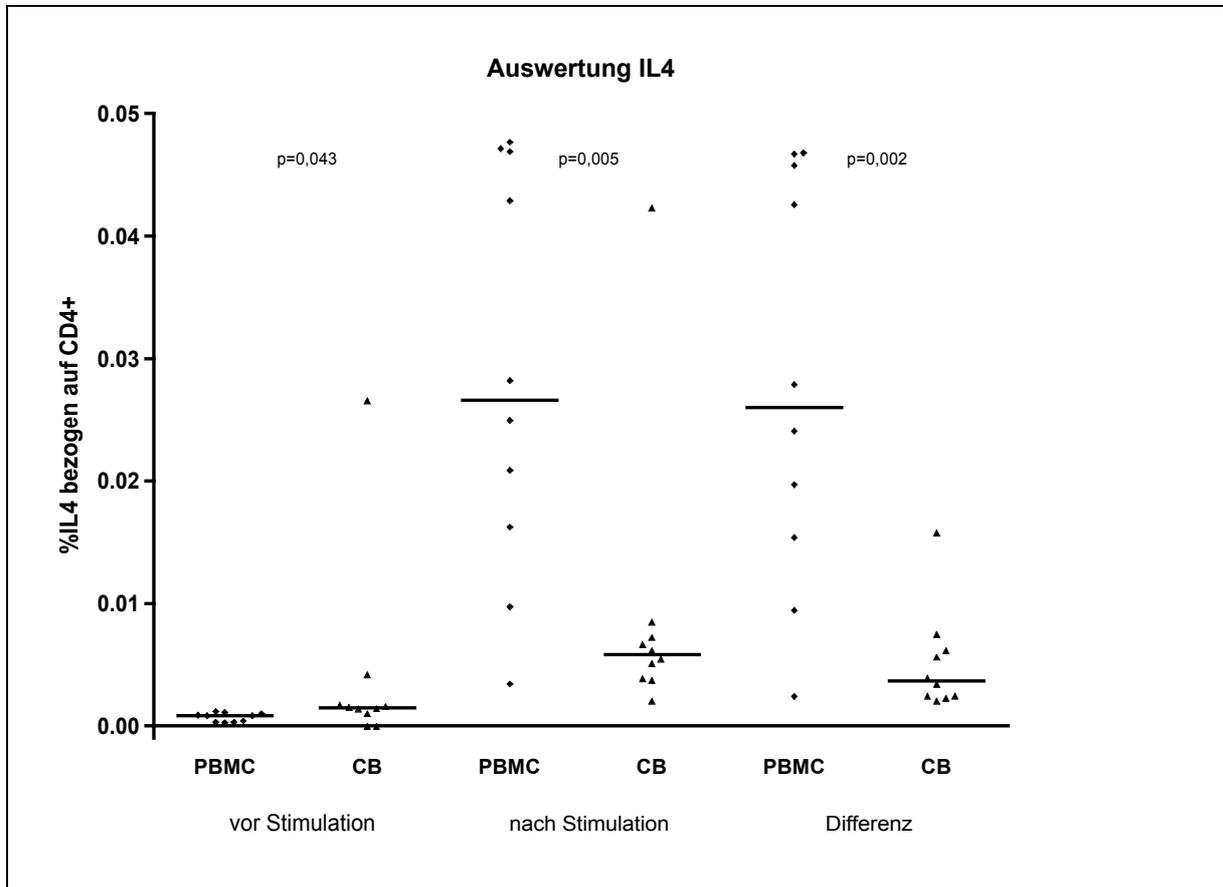


Abb.14: **Auswertung IL-4 (nach Anreicherung)**

Durch Gegenfärbung mit anti-CD45RO wurde der Anteil der Gedächtniszellen an den CD4+/IL-4+ Zellen bestimmt (s. Abb. 15). Hierbei zeigte sich, dass der Anteil der CD45RO+ an den CD4+/IL-4+ Zellen bei Erwachsenen (Median: 87,41%) hoch signifikant ($p<0,0001$) höher lag als bei Neugeborenen (Median: 26,23%).

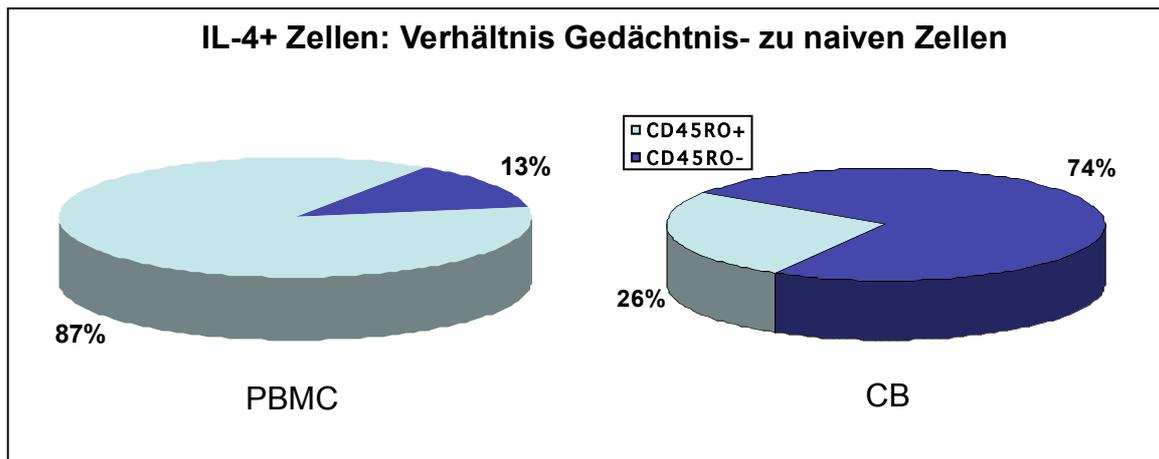


Abb.15: **Anteil CD45RO+ an CD4+/IL4+ Zellen**

dargestellt sind Medianwerte

5.6.5 Interleukin 10 (IL-10)

Auch bei der Messung der IL-10 produzierenden Zellen stellte sich heraus, dass deren Frequenz vor Anreicherung so gering ist, dass sich die stimulierte Probe in Nabelschnurblut nicht signifikant ($p=0,246$) von der unstimulierten Kontrolle unterschied. Tabelle 16 zeigt deshalb nur den Anteil der IL-10+ Zellen an den CD4+ Zellen nach Anreicherung:

	IL-10+ unstimuliert	IL-10+ stimuliert	Δ IL-10+	IL-10+/CD45RO+ ^a
CB*	0,0026 (0,00035-0,017)	0,027 (0,011-0,082)	0,025 (0,0051-0,067)	14,81 (3,76-38,10)
PBMC*	0,0036 (0,0021-0,020)	0,23 (0,12-0,45)	0,23 (0,11-0,45)	64,52 (46,23-86,80)
p-Wert	0,280	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tab.16: **Auswertung IL-10 nach Anreicherung** (Werte in %, bezogen auf CD4+)

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

^a Anteil der Gedächtniszellen an den IL-10+/CD4+ Zellen

Vor Stimulation zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,280$) zwischen dem Anteil der IL-10+ Zellen in Nabelschnurblut und der erwachsenen Vergleichsgruppe. Nach Stimulation konnten wir einen statistisch hoch signifikanten Unterschied ($p<0,0001$) zwischen den beiden Gruppen nachweisen. Der Median der IL-10+

Zellen im Nabelschnurblut betrug 0,027%, wohingegen der Median in der Vergleichsgruppe 0,23% betrug.

Auch baseline bereinigt ($\Delta \text{IL-10} = \text{IL-10}_{\text{stimuliert}} - \text{IL-10}_{\text{unstimuliert}}$) war dieser Unterschied nachzuweisen ($p < 0,0001$). Abbildung 16 stellt die Unterschiede in der IL-10 Produktion der CD4+ Zellen in Nabelschnurblut und dem Blut der erwachsenen Vergleichsgruppe graphisch dar.

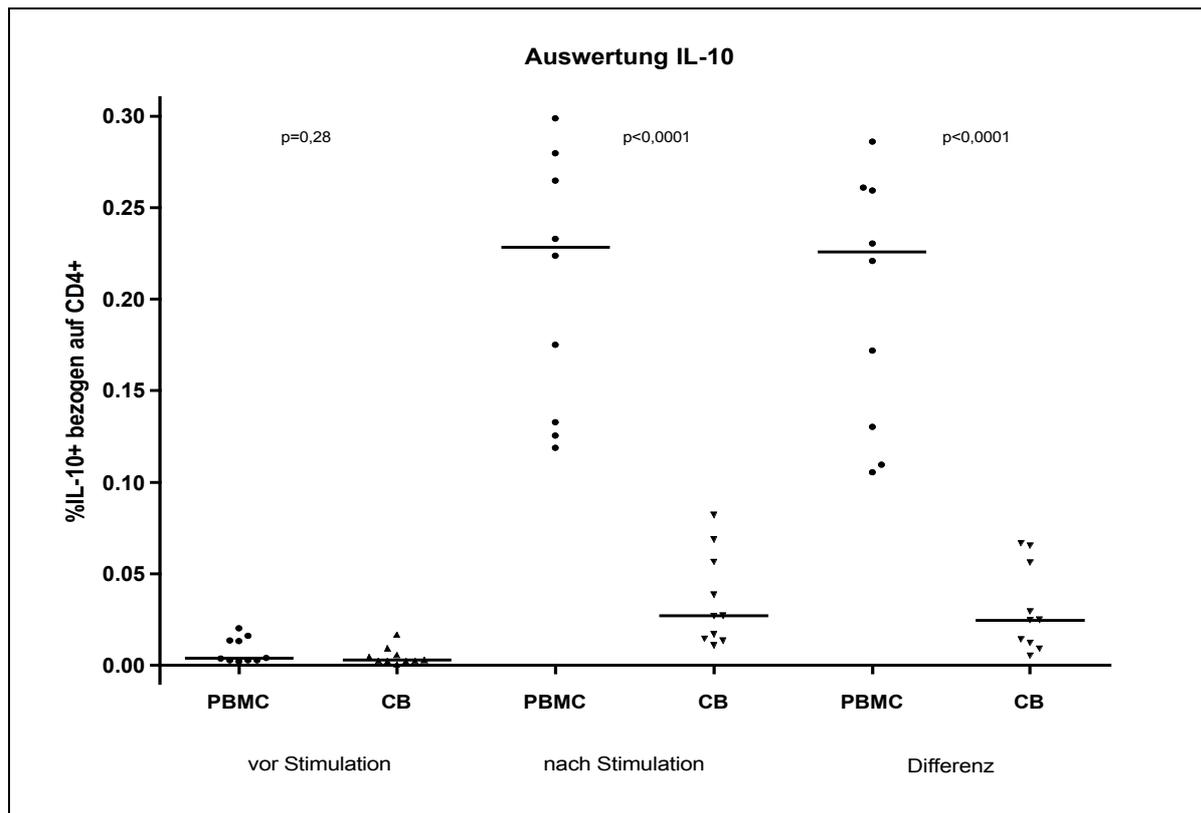


Abb.16: **Auswertung IL-10 (nach Anreicherung)**

Durch Gegenfärbung mit anti-CD45RO wurde der Anteil der Gedächtniszellen an den CD4+/IL-10+ Zellen bestimmt (s. Abb. 17). Hierbei zeigte sich, dass der Anteil der CD45RO+ an den CD4+/IL10+ Zellen bei Erwachsenen (Median: 64,52%) hoch signifikant ($p < 0,0001$) höher lag als bei Neugeborenen (Median: 14,81%).

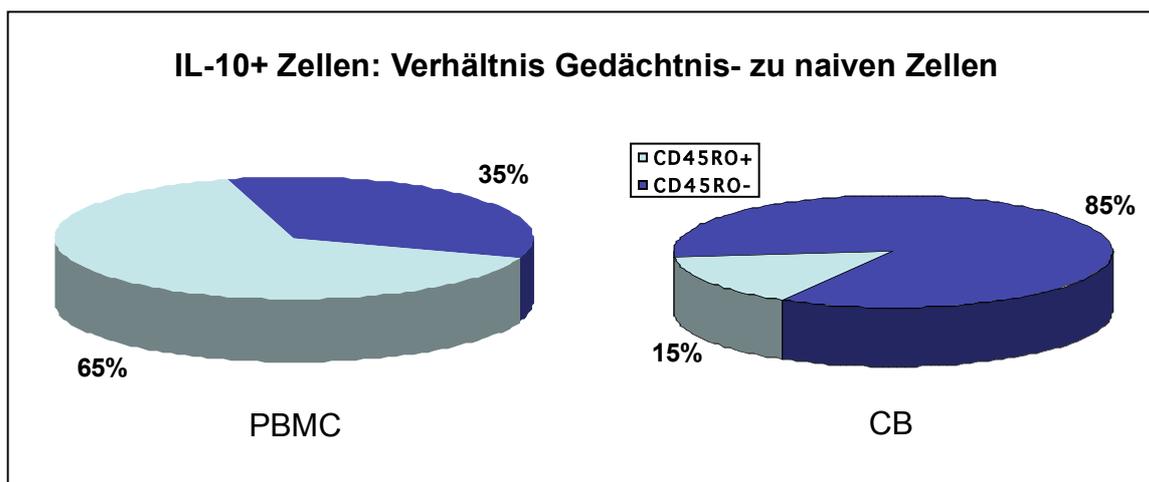


Abb.17: Anteil CD45RO+ an CD4+/IL-10+ Zellen

dargestellt sind Medianwerte

5.7 Cytometric Bead Array (BD Biosciences)

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden IFN- γ , IL-4 und IL-10 Werte nicht nur auf Einzelzellebene, sondern auch im Überstand der Zellkultur bestimmt. Dazu wurde ein Cytometric Bead Array der Firma BD Biosciences verwendet, der es ermöglicht, in einem Ansatz mehrere Zytokine quantitativ durchflusszytometrisch zu messen.

5.7.1 Interferon Gamma (IFN- γ)

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Interferon- γ Messungen in Nabelschnurblut und PBMC vor und nach Stimulation:

	IFN- γ (pg/ml) unstimuliert	IFN- γ (pg/ml) stimuliert	Δ IFN- γ (pg/ml)
CB*	27,95 (3,30-1990)	2520 (113,8-16320)	2323 (108,1-14330)
PBMC*	1477 (35,6-42200)	36810 (2120-68490)	24610 (2084-68170)
p-Wert	0,019	0,001	0,002

Tab.17: Auswertung IFN- γ , CBA

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Bereits vor Stimulation zeigte sich ein statistisch signifikantes Defizit der IFN- γ Produktion im Nabelschnurblut ($p=0,019$), das sich nach Stimulation mit SEB noch

verstärkte und ein hoch signifikantes Niveau erreichte ($p=0,001$). Damit im Einklang stand der statistisch signifikante ($p=0,002$) Unterschied zwischen Nabelschnurblut und PBMC in der Differenz aus stimulierter und unstimulierter Probe.

5.7.2 Interleukin 4 (IL-4)

In Tabelle 18 zeigt sich der Unterschied zwischen der IL-4 Produktion von Nabelschnurblut und PBMC vor und nach Stimulation:

	IL-4 (pg/ml) unstimuliert	IL-4 (pg/ml) stimuliert	Δ IL-4 (pg/ml)
CB*	4,3 (n=9) (2,4-5,1)	5,65 (n=10) (2,30-10,50)	1,5 (n=9) (-1,2-2,6)
PBMC*	4,3 (n=9) (1,9-30,8)	274,4 (n=4) (210,0-366,7)	270,9 (n=4) (179,2-362,3)
p-Wert	1,0	0,002	0,003

Tab.18: **Auswertung IL-4, CBA**

* Medianwerte (Spannweite); p-Wert: CB vs. PBMC (MWU-Test)

Vor Stimulation sah man keinerlei Unterschied in der Produktion von IL-4 zwischen Nabelschnurblut und der erwachsenen Vergleichsgruppe ($p=1$). Nach Stimulation zeigte sich im Nabelschnurblut ein statistisch signifikantes Defizit der IL-4 Produktion ($p=0,002$). Der Unterschied zwischen der IL-4 Produktion in Nabelschnurblut vor und nach Stimulation war jedoch so gering, dass eine statistische Signifikanz nicht erreicht wurde ($p=0,09$).

5.8 T_H1/T_H2 -Quotient

Um eine Verschiebung der Immunitätslage in Richtung T_H1 oder T_H2 zu erkennen, wurde der Quotient aus Parametern gebildet, die primär mit den entsprechenden Zellpopulationen verknüpft sind.

5.8.1 Chemokinrezeptoren

CXCR3 wird präferentiell auf T_H1-Zellen exprimiert, wohingegen CCR4 mit T_H2-Zellen assoziiert ist. Abbildung 18 zeigt den Unterschied dieses T_H1/ T_H2-Quotienten zwischen Nabelschnurblut und der erwachsenen Vergleichsgruppe (unstimuliert):

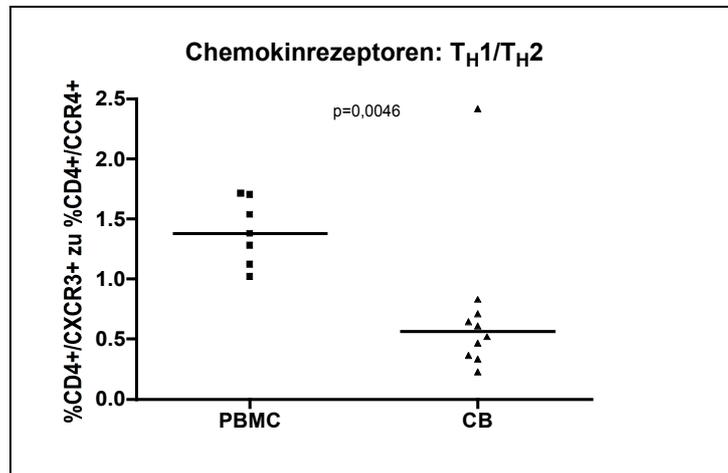


Abb.18: T_H1/T_H2-Quotient: CKR

Der T_H1/T_H2-Quotient – gebildet aus $\frac{\%CD4 + CXCR3 +}{\%CD4 + CCR4 +}$ – war in Nabelschnurblut signifikant niedriger als bei der erwachsenen Vergleichsgruppe ($p=0,0046$). Hinsichtlich der Chemokinrezeptorexpression zeigte Nabelschnurblut daher einen T_H2- Bias.

5.8.2 Zytokin Sekretions Assay (Miltenyi Biotech)

T_H1-Zellen sezernieren IFN- γ , T_H2-Zellen dagegen IL-4. Der Quotient aus IFN- γ und IL-4 ermöglicht somit eine Aussage darüber, welcher Zelltypus überwiegt. Abbildung 19 zeigt diesen Quotienten vor und nach Stimulation, in Nabelschnurblut und in der Kontrollgruppe.

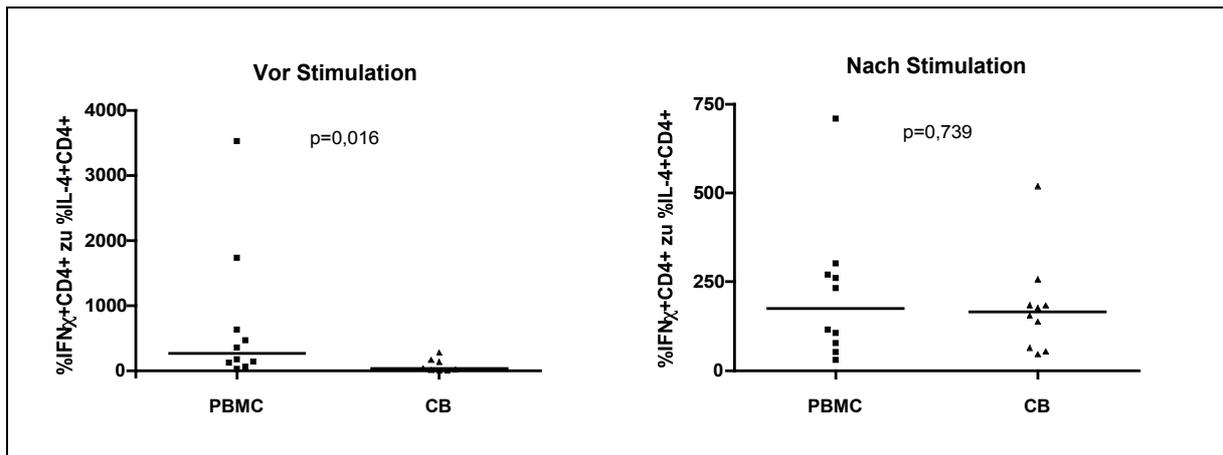


Abb.19: T_H1/T_H2 -Quotient: Zytokine, gemessen auf Einzelzellebene

Vor Stimulation zeigte der Quotient T_H1/T_H2 – gebildet aus $\frac{\%CD4 + IFN\chi +}{\%CD4 + IL - 4 +}$ – eine statistisch signifikante Verschiebung ($p=0,016$) in Richtung T_H2 in Nabelschnurblut im Vergleich zu PBMC Erwachsener. Dieser Unterschied verschwand nach Stimulation ($p=0,739$). Im Gegensatz zu Nabelschnurblut, dessen T_H1/T_H2 Quotient sich vor und nach Stimulation signifikant unterschied ($p=0,043$), fand sich bei Erwachsenen kein signifikanter Unterschied vor und nach Stimulation ($p=0,315$).

5.8.3 Cytometric Bead Array (CBA)

Abbildung 20 zeigt den T_H1/T_H2 -Quotienten – gebildet aus $\frac{IFN\chi(pg/ml)}{IL - 4(pg/ml)}$ – im

Überstand der Zellkultur:

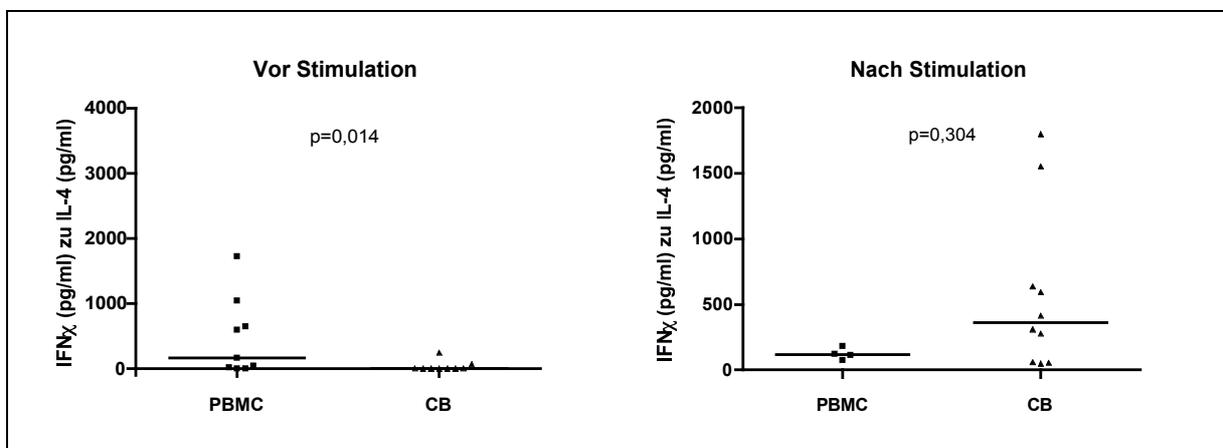


Abb.20: T_H1/T_H2 -Quotient: Zytokine, gemessen im Überstand (CBA)

Vor Stimulation zeigte sich eine signifikante ($p=0,014$) Verschiebung in Richtung T_H2 -Achse in Nabelschnurblut im Vergleich zu PBMC Erwachsener. Diese verschwand nach Stimulation ($p=0,304$). Im Gegensatz zu den Proben der erwachsenen Vergleichsgruppe, in denen sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem T_H1/T_H2 -Quotienten vor und nach Stimulation zeigte ($p=0,94$), fand sich im Nabelschnurblut ein signifikanter Unterschied vor und nach Stimulation ($p=0,001$).

6 Diskussion

6.1 Studienpopulation

Alle Zytokine unterliegen physiologischerweise einer hohen individuellen Spannweite. Deshalb ist es bei allen funktionellen Messungen von Zytokinspiegeln von entscheidender Bedeutung, die Studienpopulation hinsichtlich der Faktoren, welche die Zytokinsekretion beeinflussen, exakt zu definieren, respektive Störfaktoren a priori zu erkennen und auszuschließen.

Bei der erwachsenen Vergleichspopulation wurde ein Kollektiv von jungen männlichen Probanden ohne bisherige Atopieanamnese gewählt; ausschlaggebend für die Auswahl ausschließlich männlicher Probanden war dabei, dass sich in Vorexperimenten erhöhte Frequenzen von IL-4 positiven Zellen bei Frauen – möglicherweise Ausdruck von zyklusabhängigen Hormonschwankungen – gezeigt hatten.

Eine floride Infektion wurde klinisch und anhand eines Blutbildes ausgeschlossen. Die in der Literatur beschriebenen höheren Spiegel von Interleukin 4⁽¹¹⁾ bei Rauchern konnten in unserer Population wohl aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht nachvollzogen werden.

Da das Rauchverhalten der Mutter einen entscheidenden Einfluss auf die fetale Zytokinproduktion zu haben scheint⁽⁶⁶⁾, wurden nur Neugeborene von Müttern, die während der Schwangerschaft nicht rauchten, untersucht (Eigenanamnese der Mütter zum Zeitpunkt der Geburt). Weiterhin wurde bei der Gruppe der Neugeborenen eine Infektion klinisch sowie mittels eines Blutbildes ausgeschlossen, da ein Anstieg der zytokinproduzierenden T-Zellen bei manifester Infektion⁽⁶⁰⁾ in der Literatur beschrieben ist. Ein vorzeitiger Blasensprung, der sowohl Ursache als auch Folge einer intrauterinen Infektion sein kann und damit einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Zytokinproduktion hat⁽¹²³⁾, war in dieser Pilotstudie ein Ausschlusskriterium. Um eine Verzerrung aufgrund der beschriebenen Unterschiede^(10;49;52) bei unterschiedlichem Modus der Entbindung (vaginal vs. Sectio) zu vermeiden, wurden nur vaginal entbundene Neugeborene in unsere Studie eingeschlossen. Thornton et al. konnten keine Unterschiede hinsichtlich unterschiedlicher Entbindungsmodi in der IFN- γ Produktion nachweisen, berichteten jedoch über eine erhöhte Spannweite bei vaginaler Entbindung⁽¹⁰⁶⁾. Damit liegt die

Vermutung nahe, dass die Dauer der Wehen zu einer Veränderung der Zytokinspiegel führen kann.

Zusammenfassend wurden also zwei gut definierte Studienpopulationen untersucht, bei denen bekannte Faktoren, die einen Einfluss auf die Zytokinproduktion haben, weitestgehend ausgeschlossen wurden. Die Tatsache, dass es sich damit um Untergruppen einer Population handelt, wurde in diesem Setting zugunsten einer exakten Definition der Gruppen bewusst in Kauf genommen.

6.2 Methodik

6.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung zellulärer Oberflächenantigene und hat bereits auf mehreren Gebieten Eingang in die klinische Routinediagnostik gefunden. Als Beispiele sind hier die quantitative Bestimmung der CD4+ Zellen zur Verlaufsbeobachtung bei HIV-Infektionen oder die exakte Immunophänotypisierung maligner Knochenmarkszellen zu nennen.

Die Bestimmung von Chemokinrezeptoren auf mononukleären Zellen ist in unserem Labor etabliert⁽⁶⁾. Intra Assay sowie Inter Observer Varianz wurden überprüft und sprechen für die Reliabilität der Messwerte.

6.2.2 Stimulation mit SEB und Zytokin Secretions Assay

Wie in Kapitel 2.5 ausgeführt, bestehen bei der Quantifizierung der Zytokinproduktion von Lymphozyten zwei grundsätzliche Probleme: Zur Detektion der Zytokine auf Einzelzellebene werden hoch artifizielle Stimulationsmethoden benötigt, wohingegen eine Stimulation mit spezifischen Antigenkomplexen/Allergenen eine verlässliche Messung auf Proteinebene nur im Überstand einer Zellkultur ermöglicht, ohne eine Immunophänotypisierung der sezernierenden Zelle zu erlauben.

Eine Stimulation mit bakteriellen Superantigenen schien aufgrund der beschriebenen methodischen Problematik als gangbarer Kompromiss. Bakterielle Superantigene wie Staphylococcus Enterotoxin B sind potente T-Zell-spezifische Stimulantien, die durch eine Vernetzung der T-Zell-Rezeptoren mit MHC II Molekülen zu einer polyklonalen Aktivierung von T-Zellen führen^(22;35). Damit kommt diese Stimulationsmethode einer physiologischen antigenspezifischen Aktivierung eines T-Lymphozyten am nächsten;

dass SEB auch in Nabelschnurblut zu einer Aktivierung führt (gemessen an der Änderung der Zytokinspiegel), ist belegt^(50;91). Einzelne Arbeiten deuten jedoch darauf hin, dass sich die Immunantwort in CB und PBMC nach Stimulation mit SEB quantitativ und qualitativ unterscheidet^(50;100).

Sowohl im Nabelschnurblut als auch bei der erwachsenen Kontrollpopulation unterscheiden sich die Zytokinlevel vor und nach Stimulation mit SEB statistisch signifikant; dies gilt für die Frequenz der zytokinsezernierenden CD4+ Zellen und die Zytokinspiegel im Kulturüberstand gleichermaßen. Damit konnten wir – wie auch in der Literatur beschrieben⁽⁹¹⁾ – zeigen, dass eine Stimulation mit SEB sowohl im Nabelschnurblut als auch bei Erwachsenen zu einem Anstieg der Zytokinproduktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 führt. Die Zahl der IL-4-positiven Zellen ist dabei so gering, dass die Aktivierung durch SEB nur nach Anreicherung nachweisbar ist (s. 5.6.3).

Der Zytokin Sekretions Assay wurde in der Mitte der 90er Jahre entwickelt, um Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion zu analysieren und mit Hilfe ferromagnetischer Partikel anzureichern^(9;54). Der Vorteil dieser Methode besteht in der Bestimmung sezernierter und damit biologisch funktioneller Zytokine auf Einzelzellebene und der simultanen Möglichkeit der Immunophänotypisierung. Die einzige Methode, mit der die gleichzeitige Bestimmung von Zytokinen und Oberflächenantigenen bisher möglich war, ist der durchflusszytometrische Nachweis intrazytoplasmatischer Zytokine. Neben dem schon angesprochenen Problem des Nachweises fehlerhaft transkribierter oder fehlgefalteter Proteine besteht bei dieser Technik das Problem, dass tote Zellen nicht abgegrenzt werden können. Daher ist eher von falsch positiv gemessenen Zytokinwerten auszugehen. Nichtsdestoweniger konnten mehrere Arbeitsgruppen eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen sezerniertem und intrazytoplasmal detektiertem Zytokin zeigen. Für IFN- γ belegten dies Scheffold et al.⁽⁸⁸⁾, für IL-4 Ouyang et al.⁽⁶⁹⁾.

Trotz der komplexen Versuchsanordnung erhielten wir mit dem „Cytokine Secretion Assay“ gut reproduzierbare Ergebnisse, auch nach Magnetanreicherung der Zytokin-positiven Zellen. Drei Versuche mit Blutproben desselben Spenders an drei aufeinander folgenden Tagen zeigten die Wiederholbarkeit des Experiments. Für IFN- γ sind die von uns gefundenen Zahlen hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch in der Literatur belegt⁽¹⁹⁾. Desombere et al. konnten durch „Recovery Versuche“ in derselben Arbeit zeigen, dass der Sekretions Assay nicht nur

eine ausgezeichnete Inter Assay Variabilität (Präzision), sondern auch eine hohe Genauigkeit besitzt: Dazu wurde eine bekannte Menge (artifiziiell erzeugter) IFN- γ -positiver Zellen einer Negativfraktion zugesetzt und analysiert und der gewonnene Wert mit dem zu erwartenden verglichen. Dabei konnte eine „Wiederfindungsrate“ von beinahe 100% bestimmt werden.

Zusammenfassend steht mit dem „Cytokine Secretion Assay“ somit eine gut validierte Methode zur Verfügung, die die Bestimmung sezernierter Zytokine auf Einzelzellebene mit hoher Reproduzierbarkeit und Genauigkeit ermöglicht. Eine simultane Phänotypisierung der Zellen ist methodisch unproblematisch. Nachteile der Methode sind jedoch ein hoher Zeitaufwand und eine relativ komplexe Versuchsanordnung.

6.2.3 Cytometric Bead Array (CBA)

Zur Quantifizierung der Zytokinsekretion mononukleärer Zellen in Nabelschnurblut und bei einer erwachsenen Vergleichspopulation nach Stimulation mit einem bakteriellen Superantigen wurde im Überstand der Zellkultur ein partikelbasierter Multiplex-Assay durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode beruht auf der geringen Menge des benötigten Analysats und des relativ geringen labortechnischen Aufwandes aufgrund der Möglichkeit, bis zu sechs Zytokine in einem Versuch zu quantifizieren. Etwaige Auftau- und Einfrierzyklen und die damit verbundene Zytokindegredation können somit auf ein Minimum reduziert werden.

Sowohl hinsichtlich Sensitivität als auch Spezifität scheint die Methode mit handelsüblichen ELISA Kits vergleichbar zu sein^(37;62).

6.3 Ergebnisse der Immunphänotypisierung

6.3.1 CD4- und CD8-positive Zellen, sowie CD4/CD8-Ratio

Sowohl beim Prozentsatz der CD4+ als auch der CD8+ Zellen fanden wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Nabelschnurblut und dem Blut einer gesunden erwachsenen Vergleichsgruppe. Dies zeigt eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur genannten Werten. So fanden Zhao et al. in Nabelschnurblut einen Anteil von 25,9% CD4+ und 15,7% CD8+ Zellen bezogen auf die

Lymphozytenpopulation⁽¹²⁴⁾. Andere Gruppen berichten vergleichbare Werte⁽⁹⁷⁾, auch in Nabelschnurblut von Kindern afrikanischer Abstammung⁽¹⁰⁷⁾, ohne statistisch signifikanten Unterschied zwischen Nabelschnurblut und PBMC hinsichtlich des Prozentsatzes der CD4+ und CD8+ Subpopulationen⁽¹⁵⁾.

Auch hinsichtlich der CD4/CD8-Ratio fanden wir bei tendenziell höheren Werten im Nabelschnurblut keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Trotz Daten, die eine Veränderung der CD4/CD8-Ratio mit zunehmendem Gestationsalter nahelegen⁽¹²⁴⁾, finden sich in der Literatur kontroverse Angaben, ob dieser Unterschied im Vergleich reifer Neugeborener und einer erwachsenen Vergleichsgruppe noch statistisch signifikant ist^(4;15).

Zusammenfassend legen die vorhandenen Daten nahe, dass es zum Zeitpunkt der Geburt keine signifikanten Unterschiede in der Subpopulation der T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen in Nabelschnurblut und einer erwachsenen Normalpopulation gibt.

6.3.2 CD19-positive B-Zellen

In Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur^(15;68) fanden wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Anteil der B-Zellen in Nabelschnurblut und der erwachsenen Vergleichsgruppe.

6.3.3 CD45RO-positive Memory-Zellen

Das CD45 Oberflächenantigen wird auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert^(104;105). In Stimulationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Isoform CD45RA und CD45RO, die invers miteinander korrelieren und durch alternatives Splicing entstehen, auf naiven respektive Memory-Zellen exprimiert werden. Nach polyklonaler Stimulation mit Mitogenen zeigt sich eine deutlich höhere Fraktion an CD45RO-positiven Gedächtniszellen bei gleichzeitiger Verminderung der naiven Subpopulation^(65;81).

Wir fanden in Nabelschnurblut einen statistisch hoch signifikant niedrigeren Anteil Gedächtniszellen im Vergleich zur erwachsenen Vergleichsgruppe, wie in der Literatur beschrieben⁽⁹⁶⁾. Untersucht man die Untergruppen der CD4- und CD8-positiven Zellen, bestätigt sich dieser Unterschied. In Nabelschnurblut zeigten sich in unserer Pilotstudie 12,3% der CD4-positiven Zellen CD45RO-positiv, in PBMC 64,9% ($p < 0,0001$); für die CD8-positiven Zellen fanden sich 4,6% CD45RO-positiv

in Nabelschnurblut, sowie 40,1% in PBMC ($p < 0,0001$), vergleichbar den Angaben der Literatur. So fanden D'Areola et al. 12,3% CD4+CD45RO+ in CB und 55,2% in PBMC⁽¹⁵⁾.

Zusammenfassend findet man in Nabelschnurblut einen statistisch signifikant geringeren Anteil an Gedächtniszellen, auch in den Subpopulationen der CD4- und CD8-positiven Zellen. Dies legt trotz der vereinfachenden Gleichsetzung naiver Zellen mit CD45RO-negativen Zellen die relative Unreife des Immunsystems des Neugeborenen nahe – respektive den Mangel an stattgehabtem Antigenkontakt, der die Konversion der Isotypen von CD45RA zu CD45RO initiiert.

6.3.4 Chemokinrezeptor CCR5 und CXCR3

Die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 sind an der entzündungsabhängigen Rekrutierung von T-Zellen bzw. dem Auswandern der Effektor-Zellen in das entzündlich veränderte Gewebe beteiligt. Sie werden hauptsächlich auf CD45RO-positiven Memory-Zellen exprimiert⁽⁷⁴⁾. Die Assoziation dieser Rezeptoren mit dem T_H1-Subset ist gut belegt^(39;48). Zahlreiche Arbeiten haben die Assoziation von CCR5 und CXCR3 mit Krankheiten belegt, die von einer T_H1-dominierten Immunantwort geprägt sind. So ließen sich CCR5- und CXCR3-positive Zellen sowohl in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis⁽⁷⁴⁾ als auch in Hirnläsionen von Patienten mit Multipler Sklerose nachweisen; passend dazu zeigen Patienten erhöhte IFN- γ Spiegel vor einem akuten Schub der Multiplen Sklerose^(3;3).

In Übereinstimmung mit Angaben der Literatur fanden wir in Nabelschnurblut eine deutlich geringere Expression von CCR5^(61;95) und CXCR3⁽⁸⁶⁾ auf CD4-positiven Zellen im Vergleich zu der erwachsenen Kontrollpopulation. Die präferentielle Expression von CXCR3 auf Gedächtniszellen konnten wir bestätigen, wobei in Nabelschnurblut ein größerer Anteil der CXCR3-positiven Zellen einen naiven CD45RO-negativen Phänotyp aufwies (CB 33% vs. PBMC 4%).

Trotz des nachgewiesenen Allergenkontakts an der plazentaren Schranke⁽⁹⁹⁾ ist der geringere Prozentsatz an Gedächtniszellen bei weitgehend fehlendem Antigenkontakt vereinbar mit der Naivität des Immunsystems der Neugeborenen.

6.3.5 Chemokinrezeptor CCR4

Eine Assoziation des Rezeptors CCR4 mit IL-4-produzierenden T_H2-T-Zellen ist in der Literatur beschrieben^(7;14). Mehrere Untersuchungen an Kollektiven, die an T_H2-

assoziierten Krankheiten – wie z.B. atopischer Dermatitis – leiden, legen eine Beteiligung des Rezeptors CCR4 an deren Pathogenese nahe. So konnten Okazaki et al. und Nakatani et al. eine höhere Zahl an CCR4-positiven Zellen im peripheren Blut von Patienten, die an atopischer Dermatitis leiden, nachweisen^(64;67). Vestergaard et al. zeigten eine Anreicherung CCR4-positiver Zellen in atopischen Hautläsionen⁽¹¹⁰⁾. Matsumoto et al. zeigten, dass die Expression des CCR4-kodierenden Gens mit dem Schweregrad der atopischen Dermatitis korreliert⁽⁵⁹⁾. Wakugawa et al. bestätigten dies auf zellulärer Ebene⁽¹¹⁶⁾.

Andere Gruppen berichten über eine CCR4 Expression auch auf T_H1-Zellen⁽²⁾ und eine Beteiligung an psoriatiformen Läsionen⁽⁸²⁾, so dass trotz gut belegter Assoziation von CCR4 mit einer T_H2-Antwort die Betrachtungsweise von CCR4-positiven Zellen als ausschließliche T_H2-Marker sicher eine Vereinfachung darstellt.

Wir fanden in Nabelschnurblut auf CD4-positiven Zellen eine deutlich geringere Expression von CCR4 (CB 6,46 vs. PBMC 25,93%). In der Kontrollgruppe zeigten im Gegensatz zu Nabelschnurblut die meisten Zellen eine Koexpression von CD45RO (CB 26 vs. PBMC 85%). Es findet sich somit in Nabelschnurblut eine geringere Zahl an CCR4-positiven Zellen, die darüber hinaus einen weitaus höheren Anteil an naiven Zellen zeigen.

6.4 Ergebnisse der Zytokinmessungen

6.4.1 Interferon γ

IFN- γ bewirkt die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen. Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, das präferentiell in einem T_H1-dominierten Mikromilieu sezerniert wird. In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben über Unterschiede der IFN- γ Spiegel in Nabelschnurblut und einer erwachsenen Kontrollpopulation. Dies ist möglicherweise in erster Linie auf erhebliche methodische Unterschiede zurückzuführen, insbesondere bei der Art der Stimulation.

So konnten mehrere Arbeitsgruppen, nach Stimulation mit PMA/Ionomycin und folgender intrazytoplasmatischer Zytokinfärbung, ein statistisch signifikantes Defizit an IFN- γ -positiven Zellen in Nabelschnurblut zeigen^(12;24;87). Gasparoni et al. berichteten über vergleichbare Befunde⁽²⁵⁾. Diese Befunde konnten auf Ebene der mRNA nachvollzogen werden⁽²⁸⁾. Protonotariou et al. konnten diesen Unterschied

auch für unstimulierte Zellen bestätigen⁽⁷³⁾. Kotiranta et al. fanden deutliche Unterschiede bei unterschiedlichen Stimulationen: Bei vergleichbaren IFN- γ Spiegeln für unstimulierte Zellen berichteten sie über eine höhere IFN- γ Sekretion in Nabelschnurblut nach Aktivierung mit LPS, fanden jedoch eine niedrigere Sekretion nach Stimulation mit ConA⁽⁴⁰⁾. Sowohl Protonotariou als auch Kotiranta bestimmten IFN- γ im Vollblut bzw. Überstand einer Zellkultur, so dass keine differenzierten Aussagen zum Phänotyp der sezernierenden Zellen möglich waren.

Im Überstand der Zellkulturen fanden wir sowohl für unstimulierte als auch für stimulierte Zellen ein signifikantes Defizit der IFN- γ Sekretion in Nabelschnurblut. Hinsichtlich des Prozentsatzes der IFN- γ -positiven Zellen der CD4-positiven Zellen vor Stimulation fanden wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Nabelschnurblut und der Vergleichsgruppe. Nach Stimulation mit SEB zeigte sich jedoch ein signifikantes Defizit im Nabelschnurblut. Die gewonnenen Werte lagen in derselben Größenordnung wie die intrazellulär gemessenen Werte von Gasparoni⁽²⁵⁾. Weiterhin ergab sich, dass die Zytokin sezernierenden Zellen in Nabelschnurblut, im Gegensatz zur Vergleichsgruppe, zum Großteil naiv sind.

Zusammenfassend zeigte sich, dass im Nabelschnurblut ein geringerer Prozentsatz der Zellen auf eine Stimulation mit SEB mit der Produktion des T_H1-Zytokins IFN- γ reagiert und dass ein Großteil der reaktiven Zellen einen naiven Phänotyp hat.

6.4.2 Interleukin 4

T_H2-Zellen sind definiert als IL-4-produzierende CD4-positiv Zellen. IL-4 spielt eine entscheidende Rolle beim Isotyp-Switch zu IgE in B-Zellen. Sowohl bei einer erfolgreichen Schwangerschaft⁽¹¹⁸⁾ als auch bei der Entstehung der Typ I Allergie spielen T_H2-Zellen eine wichtige Rolle. Bisherige Studien bezüglich IL-4 Spiegel in Nabelschnurblut erbrachten diskrepante Ergebnisse.

Krampera et al. und Chalmers et al. berichteten unter Stimulationsbedingungen mit PMA/Ionomycin und intrazytoplasmatischer Zytokinfärbung über eine signifikant geringere Zahl an IL-4-positiven Zellen in Nabelschnurblut^(12;41). Schatt et al. kamen zu vergleichbaren Ergebnissen⁽⁸⁷⁾. Gasparoni et al. bestätigten dies nach Stimulation mit ConA⁽²⁵⁾. Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse von Protonotariou et al., die über erhöhte IL-4-Spiegel in Nabelschnurblut im Vergleich zu einer erwachsenen Kontrollpopulation berichteten⁽⁷³⁾. Rizos et al. konnten bei unstimulierten Zellen im

Überstand von Nabelschnurblut höhere Konzentrationen von IL-4 nachweisen als bei einer adulten Kontrollpopulation⁽⁷⁸⁾.

Im Überstand der Zellkulturen fanden wir bei unstimulierten Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen Nabelschnurblut und der erwachsenen Vergleichsgruppe. Nach Stimulation zeigte sich ein Defizit der IL-4 Produktion in Nabelschnurblut. Einschränkend ist hier festzustellen, dass die IL-4 Werte nach Stimulation tendenziell höher lagen, dieser Unterschied aber kein statistisch signifikantes Niveau erreichte. Betrachtet man den Prozentsatz der IL-4-positiven Zellen an den T-Helfer-Zellen, zeigte sich vor Stimulation ein höherer Wert in Nabelschnurblut. Nach Stimulation kehrte sich dies um, da PBMC eine deutlich ausgeprägtere Reaktion auf Aktivierung mit SEB zeigte. Die IL-4-produzierenden Zellen waren in PBMC überwiegend CD45RO-positive Gedächtniszellen, wohingegen sich in Nabelschnurblut ein weitgehend naiver Typ fand.

Zusammenfassend zeigte sich bei unstimulierten Zellen eine höhere Basisaktivität der T_H2-Achse des Immunsystems mit deutlich niedrigerer Fähigkeit zur Hochregulation nach Stimulation mit SEB. Im Gegensatz zur Vergleichspopulation wiesen in Nabelschnurblut die meisten Zytokin-positiven Zellen einen naiven Phänotyp auf.

6.4.3 Interleukin 10

Interleukin 10 gilt als immunmodulatorisches Zytokin mit differenzierter Wirkung sowohl auf T_H1- als auch auf T_H2-Zellen. Von Mosman et al. ursprünglich als „cytokine secretion inhibiting factor“ bezeichnet, konnte sowohl eine hemmende Wirkung auf die Zytokinfreisetzung aus Monozyten und Makrophagen gezeigt werden⁽¹⁶⁾ als auch (im Mausmodell) eine hemmende Wirkung auf die allergische Entzündungsreaktion in Atemwegen⁽¹²⁶⁾. IL-10 stellt sich somit als potenter Immunmodulator in T_H1- und T_H2-dominierten Entzündungsreaktionen dar. Ling et al.⁽⁴⁶⁾ fanden, dass sich IL-10-sezernierende regulatorische T-Zellen von Atopikern und Nichtatopikern in ihrer Fähigkeit zur Unterdrückung einer T_H2-Immunreaktion unterscheiden. Diese Fähigkeit war bei den von Atopikern isolierten Zellen deutlich reduziert, was einen Zusammenhang von IL-10-positiven regulatorischen T-Zellen und einer erhöhten Neigung zu Atopie nahelegt.

Die Datenlage zu IL-10 Spiegeln in Nabelschnurblut – gerade im Vergleich zu PBMC – ist sehr dünn. Gasparoni et al. berichteten über eine Reduktion der IL-10+/CD4+

Zellen mit zunehmendem Gestationsalter⁽²⁵⁾ bei gleichzeitiger Zunahme der IL-10+/CD8+ Zellen. Dies lässt sich als Hinweis auf eine zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossene Reifung des Immunsystems auch hinsichtlich des IL-10 Netzwerks verstehen. Kotiranta et al. berichteten über deutlich reduzierte IL-10 Spiegel in Nabelschnurblut im Vergleich zu einer erwachsenen Kontrollpopulation, gemessen im Überstand und damit nicht auf Einzelzellniveau⁽⁴⁰⁾. Eine andere Gruppe berichtete über eine erhöhte Menge von IL10, gemessen mit einem Multiplex-Assay, und interpretierte dieses Ergebnis als mögliche Erklärung für eine geringere Graft versus Host Reaktion nach Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurblut⁽⁷⁵⁾.

In unserem Versuchsaufbau zeigte sich, dass bei unstimulierten Zellen kein signifikanter Unterschied in dem Prozentsatz der CD4+/IL-10+ Zellen zwischen Nabelschnurblut und der erwachsenen Kontrollpopulation nachzuweisen ist. Nach Stimulation fand sich jedoch in Nabelschnurblut eine statistisch signifikant geringere Reaktion auf SEB in Nabelschnurblut. In Nabelschnurblut waren die IL-10-produzierenden Zellen überwiegend naiven Phänotyps. Bei der Vergleichspopulation fand sich ein geringerer Anteil an naiven Zellen.

Zusammenfassend zeigte sich bei vergleichbarer Zytokinsekretion in unstimulierten Zellen eine deutlich geringere Reaktion von mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut nach Stimulation mit SEB hinsichtlich der Produktion des IL-10. Weiterhin war der Anteil an naiven Zellen, die IL-10 sezernieren, in Nabelschnurblut reduziert im Vergleich zur Population der Erwachsenen.

6.5 Zeigt Nabelschnurblut eine balancierte Immunantwort vor und nach Stimulation mit SEB?

Wie oben ausgeführt, zeigten PBMC aus Nabelschnurblut trotz vergleichbarer Zytokinsekretion ohne Stimulation, hinsichtlich der Zytokinsekretion (auf Einzelzellebene) nach Stimulation mit SEB, einen deutlich geringeren Anstieg. Die Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren unterschieden sich ebenso.

Die Frage jedoch, ob die unstimulierte Zytokinsekretion in Nabelschnurblut hinsichtlich der T_H1/T_H2 -Verteilung mit einer erwachsenen Kontrollgruppe vergleichbar ist bzw. nach Stimulation mit dieser vergleichbar wird und ob von einer „balancierten“ Chemokinrezeptorexpression gesprochen werden kann, bleibt unbeantwortet, insbesondere weil die Messung einzelner Zytokine nur ein

unzureichendes Bild des Gleichgewichts zwischen der T_H1- und der T_H2-Antwort des Immunsystems liefert.

Ein Wert, der diese Balance quantifizierbar macht, zumindest im direkten Vergleich mit einer Kontrollgruppe, ist auf Rezeptorebene der Quotient aus CXCR3 und CCR4, jeweils bezogen auf die Gruppe der Gedächtniszellen, und auf Zytokinebene der Quotient aus IFN- γ und IL-4 – ebenso bezogen auf die Subpopulation der Gedächtniszellen.

6.5.1 T_H1/T_H2-Quotient auf Ebene der Chemokinrezeptoren

Sowohl CXCR3 als auch CCR4 wurden in Nabelschnurblut im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einem geringeren Prozentsatz der CD4-positiven Zellen exprimiert. Betrachtet man den Quotienten $\frac{\%CD4 + CXCR3 +}{\%CD4 + CCR4 +}$, sieht man im Nabelschnurblut im Vergleich zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Verschiebung in Richtung T_H2-Antwort.

Auf Ebene der Chemokinrezeptoren kann also in unstimulierten Blutproben von einem T_H2-Bias in Nabelschnurblut gesprochen werden.

6.5.2 T_H1/T_H2-Quotient auf Ebene der Zytokinsekretion

Auf Ebene der Zytokinsekretion ist zu unterscheiden zwischen einer Basissekretion ohne Stimulation und der Sekretion von Zytokinen nach Stimulation mit SEB. Bei der Auswertung der Ergebnisse des „Cytokine Secretion Assay“ wurde der Quotient $\frac{\%CD4 + IFN\gamma +}{\%CD4 + IL - 4 +}$ jeweils in unstimulierten und stimulierten Zellfraktionen bestimmt.

Vor Stimulation fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Nabelschnurblut und der Kontrollpopulation: Unstimuliertes Nabelschnurblut zeigte bei vergleichbaren Absolutwerten von IFN- γ und IL-4 eine Verschiebung in Richtung T_H2 (p=0,016). Nach Stimulation mit SEB verschwand dieser Unterschied (p=0,739). Dies legt den Schluss nahe, dass Nabelschnurblut trotz geringerer absoluter Zytokinsekretion auf Stimulation mit einer balancierten Immunantwort reagiert. Diese fiel jedoch schwächer aus als in der Vergleichsgruppe. Betrachtete man obigen Quotienten vor und nach Stimulation, fand man in Nabelschnurblut – im Gegensatz

zur Kontrollgruppe – einen statistisch signifikanten Unterschied (CB $p < 0,05$ vs. CBMB $p = 0,315$). Diese Befunde wurden durch die Ergebnisse des „Cytometric Bead Array“ bestätigt: Auch hier zeigte Nabelschnurblut vor Stimulation eine signifikante Verschiebung in Richtung T_H2 -Immunantwort, die nach Stimulation verschwand.

Chipeta et al. berichteten über quantitativ vergleichbare Zytokinsekretion nach Restimulation von Zellkulturen aus Nabelschnurblut und einer erwachsenen Kontrolle⁽¹³⁾, bei deutlich abgeschwächter Immunantwort des Nabelschnurblutes vor Stimulation. Daraus schloss der Autor, dass Nabelschnurblut, obwohl dominiert von naiven Zellen, zu einer balancierten Immunantwort fähig ist. Unsere Ergebnisse stehen damit in Einklang.

Zusammenfassend zeigte nicht aktiviertes Nabelschnurblut somit einen T_H2 -Bias, der jedoch nach Stimulation mit SEB verschwand, wobei Nabelschnurblut im Vergleich zur Kontrollpopulation nur zu einer reduzierten Immunantwort fähig war. Dies lässt sich als indirekten Beleg für die Sinnhaftigkeit der Hygienehypothese verstehen: Ständige Exposition mit bakteriellen Antigenen – mit SEB wurde ein potenter Vertreter dieser Gattung verwendet – führt zu einer, im Vergleich zur Immunantwort unstimulierter Zellen, T_H1 -dominierten, in unserem Bezugssystem als balancierte Antwort angesehenen Immunreaktion.

Dafür, dass bakterielle Antigene die immunologische Ruhelage nach wiederholten Kontakten dauerhaft in Richtung T_H1 -Immunantwort verschieben, gibt es starke Indizien: Die von Roponen et al.⁽⁸⁰⁾ gefundene Assoziation zwischen dem Anstieg der IFN- γ Produktion in den ersten drei Lebensmonaten und dem Aufwachsen auf einer Farm respektive der Endotoxinkonzentration im Hausstaub weist in diese Richtung. Ebenso konnten Kawamoto et al.⁽³⁶⁾ zeigen, dass die Zahl der T_H1 -Zellen mit zunehmendem Lebensalter der Probanden, und somit wiederholtem Kontakt mit mikrobiellen Produkten, zunimmt – im Gegensatz zur Zahl der T_H2 -Zellen. Rizos et al., die in unstimuliertem Nabelschnurblut eine deutliche Verschiebung in Richtung T_H2 -Antwort beobachteten, fanden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Erwachsener Hinweise, dass diese Verschiebung transienter Natur ist und sich bereits nach 5 Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen Nabelschnurblut und der Kontrollgruppe nachweisen lässt⁽⁷⁸⁾. Diese Verschiebung der Immunitätslage in Richtung T_H1 -Immunantwort scheint somit der „natürlichen“ Entwicklung zu entsprechen. Welche Faktoren eine Persistenz der T_H2 -dominierten Reaktion bedingen, bleibt zu zeigen.

7 Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung:

Die im Mausmodell entwickelte Modellvorstellung zur Unterteilung der T-Helfer-zell-gebundenen Immunität in T_H1 - und T_H2 -Zellen ist für das Verständnis immunologischer Vorgänge wesentlich. Sowohl Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis als auch die Schwangerschaft als physiologischer Vorgang sind durch eine Verschiebung der Immunitätslage in Richtung T_H2 -Antwort geprägt. Das T_H2 -assoziierte Zytokin IL-4 bewirkt den Isotyp-Switch von IgG zu IgE und fördert damit die IgE-vermittelte Histaminliberation bei allergischen Erkrankungen. Bei einer Schwangerschaft bewirkt die T_H2 -dominierte Immunitätslage eine gewisse Toleranz des hemi-allogenen Feten durch die Mutter; dies scheint die physiologische Erklärung für die beschriebene T_H2 -Dominanz sowohl bei Schwangeren als auch bei Neugeborenen zu sein.

In dieser Arbeit sollte als Pilotprojekt untersucht werden, ob mit einem einzelzellbasierten Zytokin Sekretions Assay in der Literatur beschriebene Unterschiede zwischen der Immunantwort Neugeborener und Erwachsener nachweisbar sind bzw. ob Nabelschnurblut auf Stimulation mit SEB zu einer balancierten Immunantwort fähig ist. Das langfristige Ziel ist dabei, Imbalancen der T_H1/T_H2 -Immunantwort bei Neugeborenen mit einer späteren atopischen Erkrankung zu korrelieren.

Methodik:

In einer Population von 10 reifen vaginal entbundenen Neugeborenen und 10 erwachsenen, gesunden Probanden wurde im Vollblut der Prozentsatz der T_H1 -assoziierten Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 sowie der T_H2 -assoziierten Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR4 auf Lymphozyten bestimmt. Ferner wurden in isolierten PBMC vor und nach Stimulation mit SEB mit einem Zytokin Sekretions Assay auf Einzellzebene der Anteil der Zytokin sezernierenden (IFN- γ , IL-4, IL-10) T-Helfer-Zellen bestimmt. Eine weitere Phänotypisierung erfolgte mittels Gegenfärbung mit CD4, CD8 und CD45RO als Marker für Gedächtniszellen. Zum Vergleich wurde im Überstand der Kultur mit Hilfe eines Multiplex-Assays IFN- γ und IL-4 bestimmt.

Ergebnisse:

Hinsichtlich der Oberflächenexpression der T_H1 - und T_H2 -assoziierten Chemokinrezeptoren zeigen sich prozentuell deutliche Unterschiede zwischen Nabelschnurblut und der Kontrollpopulation. Sowohl für CCR3 als auch für CXCR3 und CCR4 findet sich ein geringerer Prozentsatz chemokinrezeptorexprimierender T-Helfer-Zellen in Nabelschnurblut. Der Quotient von CXCR3 und CCR4, als Marker für eine immunologische Imbalance bezüglich des T_H1/T_H2 -Gleichgewichts, ist in Nabelschnurblut signifikant niedriger, was Ausdruck einer Verschiebung in Richtung T_H2 -Immunantwort ist.

Vor Stimulation mit SEB findet man in Nabelschnurblut einen vergleichbaren Prozentsatz an IFN- γ - und IL-10-positiven T-Helfer-Zellen. Der erhöhte Prozentsatz an IL-4-positiven Zellen in Nabelschnurblut bedingt eine Verschiebung in Richtung T_H2 -Immunantwort. Nach Stimulation mit SEB verschwindet dieser T_H2 -Bias – trotz absolut reduzierter Reaktion der Lymphozyten in Nabelschnurblut. Die Quantifizierung der Zytokine im Zellkulturüberstand bestätigt diese Ergebnisse.

In der Immunophänotypisierung bestätigen sich die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse. Verglichen mit der Kontrollpopulation zeigt Nabelschnurblut einen weitgehend naiven Phänotyp (CD45RO negativ). Hinsichtlich des Prozentsatzes an CD4+, CD8+ T-Zellen finden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Erwachsenengruppe; dies gilt ebenso für die CD4/CD8-Ratio.

Schlussfolgerungen:

- T-Zellen in Nabelschnurblut zeigen weitgehend einen naiven Phänotyp (CD45RO negativ).
- Quantitativ ist die Expression der Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4 und CXCR3 – ausgedrückt als Prozentsatz der CKR+ Zellen – deutlich erniedrigt. Funktionell findet sich in Nabelschnurblut ein T_H2 -Bias auf Ebene der Rezeptorexpression.
- Vor Stimulation zeigt sich in Nabelschnurblut ein erhöhter Prozentsatz an IL-4 sezernierenden Lymphozyten und damit eine Verschiebung des Zytokingleichgewichts in Richtung T_H2 -Immunantwort.
- Nach Stimulation verschiebt sich das immunologische Gleichgewicht im Nabelschnurblut in Richtung T_H1 -Antwort. Damit liefern T-Helfer-Zellen in Nabelschnurblut nach Stimulation mit SEB eine balancierte Immunantwort, die

allerdings quantitativ reduziert ist im Vergleich zu einer erwachsenen Kontrollpopulation.

- Der „Cytokine Secretion Assay“, der Zytokinnachweis im Überstand der Zellkultur mit einem Multiplex-Assay und die Analyse des Prozentsatzes T_H1/T_H2 -assoziierter Chemokinrezeptoren zeigen konkordante Ergebnisse.

Aufgrund des hohen methodischen und finanziellen Aufwandes des „Cytokine Secretion Assay“ eignet sich dieser nur sehr bedingt für große Studien und bleibt speziellen Fragestellungen vorbehalten. Kann auf einen Zytokin-Nachweis auf Einzelzellebene verzichtet werden, bietet sich bei konkordanten Ergebnissen der partikelbasierte Multiplex-Assay als effiziente und ökonomische Alternative an.

Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: **Zytokin Sekretions Assay**
- Abb.2: **Lymphozytengate nach FSC/SSC**
- Abb.3: **Gate zur Selektion der vitalen Zellen**
- Abb.4: **Prozentsatz der Zytokin+ /CD4+ Zellpopulation**
- Abb.5: ***CD4- und CD8-positive Gedächtniszellen***
- Abb.6: ***CCR5 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen***
- Abb.7: ***CXCR3 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen***
- Abb.8: ***Anteil CD45+ an CXCR3+***
- Abb.9: ***CCR4 auf CD4+ und CD8+ T-Zellen***
- Abb.10: ***Anteil CD45RO+ an CCR4+***
- Abb.11: ***IFN- γ Kinetik***
- Abb.12: ***Auswertung IFN- γ***
- Abb.13: ***Anteil CD45RO+ an CD4+/IFN- γ +***
- Abb.14: ***Auswertung IL-4 (nach Anreicherung)***
- Abb.15: ***Anteil CD45RO+ an CD4+/IL4+***
- Abb.16: ***Auswertung IL-10 (nach Anreicherung)***
- Abb.17: ***Anteil CD45RO+ an CD4+/IL-10+***
- Abb.18: ***T_H1/T_H2-Quotient: CKR***
- Abb.19: ***T_H1/T_H2-Quotient: Zytokine, gemessen auf Einzelzellebene***
- Abb.20: ***T_H1/T_H2-Quotient: Zytokine, gemessen im Überstand (CBA)***

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
CBA	Cytometric Bead Array
CBMC	cord blood mononuclear cells
CC	CC Chemokinrezeptor
CKR	Chemokinrezeptor
CXC	CXC Chemokinrezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
IFN- γ	Interferon- γ
IL-	Interleukin
NSB	Nabelschnurblut
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PE	Phycoerythrin
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
Th1/Th2	T-Helfer-Zelle Typ1/Typ2
TCR	T –Zell Rezeptor

Tabellenverzeichnis

Tab.1:	Immunophänotypisierung, Färbeschema
Tab.2:	<i>IFN-γ Assay</i>
Tab.3:	<i>IL-4, IL-10 Assay</i>
Tab.4:	<i>Färbeschema, Sekretions Assay</i>
Tab.5:	<i>Antikörper</i>
Tab.6:	<i>Charakterisierung der Erwachsenen</i>
Tab.7:	<i>Charakterisierung der Neugeborenen</i>
Tab.8:	<i>CD4-und CD8-positive Zellen</i>
Tab.9:	<i>CD45RO-positive T-Zellen</i>
Tab.10:	<i>CCR5 auf T-Zellen</i>
Tab.11:	<i>CXCR3 auf T-Zellen</i>
Tab.12:	<i>CCR4+ auf T-Zellen</i>
Tab.13:	<i>Intra Assay Kontrolle</i>
Tab.14:	<i>Auswertung IFN-γ</i>
Tab.15:	<i>Auswertung IL-4 nach Anreicherung</i>
Tab.16:	<i>Auswertung IL-10 nach Anreicherung</i>
Tab.17:	<i>Auswertung IFN-γ, CBA</i>
Tab.18:	<i>Auswertung IL-4, CBA</i>

Bibliographie

- (1) Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 1999; 353(9163):1485-8.
- (2) Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y et al. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol* 2001; 166(1):103-11.
- (3) Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6873-8.
- (4) Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):289-92.
- (5) Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Respir J* 1997; 10(1):6-12.
- (6) Bolte G, Krauss-Etschmann S, Konstantopoulos N, Bischof W, Fahlbusch B, Schendel DJ et al. Different effects of endotoxin versus mite and cat allergen exposure on T-cell differentiation in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(4):634-40.
- (7) Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187(1):129-34.
- (8) Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97(6):1288-96.
- (9) Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, Manz RA, Miltenyi S, Radbruch A et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol* 1999; 29(12):4053-9.
- (10) Brown MA, Rad PY, Halonen MJ. Method of birth alters interferon-gamma and interleukin-12 production by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14(2):106-11.
- (11) Byron KA, Varigos GA, Wootton AM. IL-4 production is increased in cigarette smokers. *Clin Exp Immunol* 1994; 95(2):333-6.
- (12) Chalmers IM, Janossy G, Contreras M, Navarrete C. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 1998; 92(1):11-8.

- (13) Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M. Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell Immunol* 2000; 205(2):110-9.
- (14) D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A et al. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 1998; 161(10):5111-5.
- (15) D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica* 1998; 83(3):197-203.
- (16) de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te VA, Figdor C et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174(4):915-24.
- (17) Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988; 140(12):4193-8.
- (18) Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L et al. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol* 1993; 23(7):1445-9.
- (19) Desombere I, Meuleman P, Rigole H, Willems A, Irsch J, Leroux-Roels G. The interferon gamma secretion assay: a reliable tool to study interferon gamma production at the single cell level. *J Immunol Methods* 2004; 286(1-2):167-85.
- (20) Devereux G, Hall AM, Barker RN. Measurement of T-helper cytokines secreted by cord blood mononuclear cells in response to allergens. *J Immunol Methods* 2000; 234(1-2):13-22.
- (21) Devereux G, Seaton A, Barker RN. In utero priming of allergen-specific helper T cells. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(11):1686-95.
- (22) Fleischer B. Superantigens. *Behring Inst Mitt* 1994;(94):104-12.
- (23) Fong TA, Mosmann TR. The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *J Immunol* 1989; 143(9):2887-93.
- (24) Garcia Vela JA, Delgado I, Bornstein R, Alvarez B, Auray MC, Martin I et al. Comparative intracellular cytokine production by in vitro stimulated T lymphocytes from human umbilical cord blood (HUCB) and adult peripheral blood (APB). *Anal Cell Pathol* 2000; 20(2-3):93-8.
- (25) Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G et al. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate* 2003; 84(4):297-303.

- (26) Gell PCR. *Clinical Aspects of Immunology*. 317-9. 1963. Oxford, Blackwell Scientific Publication.
Ref Type: Generic
- (27) Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355(9216):1680-3.
- (28) Gupta AK, Rusterholz C, Holzgreve W, Hahn S. Constant IFN γ mRNA to protein ratios in cord and adult blood T cells suggests regulation of IFN γ expression in cord blood T cells occurs at the transcriptional level. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):282-8.
- (29) Herz U, Joachim R, Ahrens B, Scheffold A, Radbruch A, Renz H. Prenatal sensitization in a mouse model. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3 Pt 2):S62-S65.
- (30) Hodge L, Salome CM, Peat JK, Haby MM, Xuan W, Woolcock AJ. Consumption of oily fish and childhood asthma risk. *Med J Aust* 1996; 164(3):137-40.
- (31) Holt PG. Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 6(2):59-70.
- (32) Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Rose AH, Robinson BW et al. Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy* 1992; 22(12):1093-9.
- (33) Jackson M. Allergy: the making of a modern plague. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(11):1665-71.
- (34) Jenkins C, Roberts J, Wilson R, MacLean MA, Shilito J, Walker JJ. Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2000; 73(6):1206-8.
- (35) Johnson HM, Russell JK, Pontzer CH. Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens. *FASEB J* 1991; 5(12):2706-12.
- (36) Kawamoto N, Kaneko H, Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T et al. Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17(2):125-33.
- (37) Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP, Jr. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 61(1):35-9.
- (38) Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy* 2002; 57(12):1130-5.

- (39) Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, Genovese MC, Andrew DP, Wu L et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 2001; 108(9):1331-9.
- (40) Kotiranta-Ainamo A, Rautonen J, Rautonen N. Imbalanced cytokine secretion in newborns. *Biol Neonate* 2004; 85(1):55-60.
- (41) Krampera M, Tavecchia L, Benedetti F, Nadali G, Pizzolo G. Intracellular cytokine profile of cord blood T-, and NK- cells and monocytes. *Haematologica* 2000; 85(7):675-9.
- (42) Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, Wilson CB. Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. *J Clin Invest* 1991; 87(1):194-202.
- (43) Lewis SA, Britton JR. Measles infection, measles vaccination and the effect of birth order in the aetiology of hay fever. *Clin Exp Allergy* 1998; 28(12):1493-500.
- (44) Liao SY, Liao TN, Chiang BL, Huang MS, Chen CC, Chou CC et al. Decreased production of IFN gamma and increased production of IL-6 by cord blood mononuclear cells of newborns with a high risk of allergy. *Clin Exp Allergy* 1996; 26(4):397-405.
- (45) Lim S, John M, Seybold J, Taylor D, Witt C, Barnes PJ et al. Increased interleukin-10 and macrophage inflammatory protein-1 alpha release from blood monocytes ex vivo during late-phase response to allergen in asthma. *Allergy* 2000; 55(5):489-95.
- (46) Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363(9409):608-15.
- (47) Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184(3):963-9.
- (48) Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391(6665):344-5.
- (49) Ly NP, Ruiz-Perez B, Onderdonk AB, Tzianabos AO, Litonjua AA, Liang C et al. Mode of delivery and cord blood cytokines: a birth cohort study. *Clin Mol Allergy* 2006; 4:13.
- (50) Macardle PJ, Wheatland L, Zola H. Analysis of the cord blood T lymphocyte response to superantigen. *Hum Immunol* 1999; 60(2):127-39.
- (51) Magnus P, Jaakkola JJ. Secular trend in the occurrence of asthma among children and young adults: critical appraisal of repeated cross sectional surveys. *BMJ* 1997; 314(7097):1795-9.

- (52) Malamitsi-Puchner A, Protonotariou E, Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G. The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum Dev* 2005; 81(4):387-92.
- (53) Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177(4):1199-204.
- (54) Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(6):1921-5.
- (55) Martinez FD, Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999; 354 Suppl 2:SII12-SII15.
- (56) Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Halonen M. Association of interleukin-2 and interferon-gamma production by blood mononuclear cells in infancy with parental allergy skin tests and with subsequent development of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(5 Pt 1):652-60.
- (57) Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P et al. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997; 314(7086):999-1003.
- (58) Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000; 320(7232):412-7.
- (59) Matsumoto Y, Oshida T, Obayashi I, Imai Y, Matsui K, Yoshida NL et al. Identification of highly expressed genes in peripheral blood T cells from patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(4):327-40.
- (60) Matsuoka T, Matsubara T, Katayama K, Takeda K, Koga M, Furukawa S. Increase of cord blood cytokine-producing T cells in intrauterine infection. *Pediatr Int* 2001; 43(5):453-7.
- (61) Mo H, Monard S, Pollack H, Ip J, Rochford G, Wu L et al. Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14(7):607-17.
- (62) Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* 2004; 110(3):252-66.
- (63) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7):2348-57.

- (64) Nakatani T, Kaburagi Y, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Mukaida N et al. CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107(2):353-8.
- (65) Newman I, Wilkinson PC. Locomotor responses of human CD45 lymphocyte subsets: preferential locomotion of CD45RO+ lymphocytes in response to attractants and mitogens. *Immunology* 1993; 78(1):92-8.
- (66) Noakes PS, Holt PG, Prescott SL. Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses. *Allergy* 2003; 58(10):1053-8.
- (67) Okazaki H, Kakurai M, Hirata D, Sato H, Kamimura T, Onai N et al. Characterization of chemokine receptor expression and cytokine production in circulating CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis: up-regulation of C-C chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(8):1236-42.
- (68) Osugi Y, Hara J, Kurahashi H, Sakata N, Inoue M, Yumura-Yagi K et al. Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children. *Clin Exp Immunol* 1995; 100(3):543-8.
- (69) Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A et al. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000; 12(1):27-37.
- (70) Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E et al. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(10):4538-42.
- (71) Pohl D, Bockelmann C, Forster K, Rieger CH, Schauer U. Neonates at risk of atopy show impaired production of interferon-gamma after stimulation with bacterial products (LPS and SEE). *Allergy* 1997; 52(7):732-8.
- (72) Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353(9148):196-200.
- (73) Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Rizos D, Sarandakou A, Makrakis E, Salamolekis E. Alterations in Th1/Th2 cytokine concentrations in early neonatal life. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 14(6):407-10.
- (74) Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998; 101(4):746-54.
- (75) Rainsford E, Reen DJ. Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2002; 116(3):702-9.
- (76) Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(2):194-200.

- (77) Rinas U, Horneff G, Wahn V. 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(2):60-4.
- (78) Rizos D, Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Trakakis E, Salamalekis E. Cytokine concentrations during the first days of life. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 131(1):32-5.
- (79) Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326(5):298-304.
- (80) Roponen M, Hyvarinen A, Hirvonen MR, Keski-Nisula L, Pekkanen J. Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(5):1048-52.
- (81) Rothstein DM, Sohen S, Daley JF, Schlossman SF, Morimoto C. CD4+CD45RA+ and CD4+CD. *Cell Immunol* 1990; 129(2):449-67.
- (82) Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, Kikuchi T, Krueger JG. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab Invest* 2001; 81(3):335-47.
- (83) Sallusto F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica* 1999; 84 Suppl EHA-4:28-31.
- (84) Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187(6):875-83.
- (85) Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992; 79(12):3101-9.
- (86) Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K et al. Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. *J Immunol* 2001; 166(3):1659-66.
- (87) Schatt S, Holzgreve W, Hahn S. Stimulated cord blood lymphocytes have a low percentage of Th1 and Th2 cytokine secreting T cells although their activation is similar to adult controls. *Immunol Lett* 2001; 77(1):1-2.
- (88) Scheffold A, Lohning M, Richter A, Assenmacher M, Manz R, Austrup F et al. Analysis and sorting of T cells according to cytokine expression. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9(3 Suppl):5-11.
- (89) Scott ME, Kubin M, Kohl S. High level interleukin-12 production, but diminished interferon-gamma production, by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 1997; 41(4 Pt 1):547-53.
- (90) Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996; 347(9018):1792-6.

- (91) Sharp MJ, Rowe J, Kusel M, Sly PD, Holt PG. Specific patterns of responsiveness to microbial antigens staphylococcal enterotoxin B and purified protein derivative by cord blood mononuclear cells are predictive of risk for development of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(4):435-41.
- (92) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275(5296):77-9.
- (93) Smart JM, Tang ML, Kemp AS. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in children with elevated immunoglobulin E but no atopic disease. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(11):1552-7.
- (94) Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299(6710):1259-60.
- (95) Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 2003; 31(8):708-14.
- (96) Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 2003; 31(8):708-14.
- (97) Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T cells as compared to adult peripheral blood. *Exp Hematol* 2003; 31(8):708-14.
- (98) Szepefalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R et al. Prenatal allergen contact with milk proteins. *Clin Exp Allergy* 1997; 27(1):28-35.
- (99) Szepefalusi Z, Pichler J, Elsasser S, van Duren K, Ebner C, Bernaschek G et al. Transplacental priming of the human immune system with environmental allergens can occur early in gestation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(3):530-6.
- (100) Takahashi N, Imanishi K, Nishida H, Uchiyama T. Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a superantigen. *J Immunol* 1995; 155(11):5213-9.
- (101) Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999; 14(2):309-14.
- (102) Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 1994; 180(2):711-5.
- (103) Tang ML, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994; 344(8928):983-5.

- (104) Thomas ML. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:339-69.
- (105) Thomas ML, Lefrancois L. Differential expression of the leucocyte-common antigen family. *Immunol Today* 1988; 9(10):320-6.
- (106) Thornton CA, Capristo CC, Power LL, Holloway JA, Popplewell EJ, Diaper ND et al. The effect of labor on neonatal T-cell phenotype and function. *Pediatr Res* 2003; 54(1):120-4.
- (107) Tsegaye A, Wolday D, Otto S, Petros B, Assefa T, Alebachew T et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes at birth, during childhood, and during adulthood in HIV-1-uninfected Ethiopians. *Clin Immunol* 2003; 109(3):338-46.
- (108) Tulic MK, Manoukian JJ, Eidelman DH, Hamid Q. T-cell proliferation induced by local application of LPS in the nasal mucosa of nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(5):771-6.
- (109) van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97(3):389-94.
- (110) Vestergaard C, Deleuran M, Gesser B, Gronhoj LC. Expression of the T-helper 2-specific chemokine receptor CCR4 on CCR10-positive lymphocytes in atopic dermatitis skin but not in psoriasis skin. *Br J Dermatol* 2003; 149(3):457-63.
- (111) Von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(2):187-93.
- (112) von Hertzen L, Klaukka T, Mattila H, Haahtela T. Mycobacterium tuberculosis infection and the subsequent development of asthma and allergic conditions. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(6):1211-4.
- (113) von Mutius E. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur Respir J* 2001; 18(5):872-81.
- (114) von Mutius E, Martinez FD, Fritzscher C, Nicolai T, Reitmeier P, Thiemann HH. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994; 308(6930):692-5.
- (115) von Mutius E, Martinez FD, Fritzscher C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(2 Pt 1):358-64.
- (116) Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, Tamaki K. CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2001; 117(2):188-96.
- (117) Warner JA, Miles EA, Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy* 1994; 24(5):423-30.

(118) Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7):353-6.

(119) Wickens K, Pearce N, Crane J, Beasley R. Antibiotic use in early childhood and the development of asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(6):766-71.

(120) Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990; 144(12):4651-6.

(121) Woolcock AJ, Peat JK. Evidence for the increase in asthma worldwide. *Ciba Found Symp* 1997; 206:122-34.

(122) Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T et al. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68(4):568-74.

(123) Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Otsubo Y, Miura A, Kuwabara Y et al. Changes in the proportion of T helper 1 and T helper 2 cells in cord blood after premature rupture of membranes. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 267(4):217-20.

(124) Zhao Y, Dai ZP, Lv P, Gao XM. Phenotypic and functional analysis of human T lymphocytes in early second- and third-trimester fetuses. *Clin Exp Immunol* 2002; 129(2):302-8.

(125) Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F et al. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* 1998; 161(2):547-51.

(126) Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaftig BB et al. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest* 1995; 95(6):2644-51.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Jakob Florian Säckl
Adresse	Baaderstr. 36 80469 München
Telefon	089 / 20 23 22 22
Mobil	0172 / 868 55 16
E-Mail	jakobsaeckl@hotmail.com
Nationalität	deutsch
Geburtsdatum	08.11.1975, Erlangen
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Herwig Säckl, geboren 26.11.1944, OStD a.D. Waltraut Säckl-Rösler, geboren 14.07.1941, OStRin a.D.
Geschwister	Judith Christina, geboren 11.01.1978, StRefin

AUSBILDUNG / UNIVERSITÄT

1982 – 1986	Grundschule Prüfening, Regensburg
1986 – 1995	Goethe-Gymnasium, Regensburg
06 / 1995	Abitur, Note 1,0
06 / 1995	Stipendium für Besonders Begabte des Bayerischen Staates
1995 – 1996	Zivildienst am Klinikum der Universität Regensburg
1996 – 1998	Medizinstudium an der Universität Regensburg (Vorklinik)
08 / 1998	Ärztliche Vorprüfung (Physikum), Note 1,66
1998 - 2003	Medizinstudium an der TU München
08 / 1999	1. Staatsexamen, Note 2,0
04 / 2002	2. Staatsexamen, Note 1,0

04 / 2002 – 03 / 2003 Praktisches Jahr (Innere Medizin, Chirurgie und Anästhesie)

05 / 2003 3. Staatsexamen, Note 1,0

PRAKTISCHE ERFAHRUNG

04 / 1999 Famulatur, Augenklinik, Klinikum Universität Regensburg, 4 Wochen

10 / 1999 Famulatur, Chirurgie, Kantonales Spital Sursee, Schweiz, 4 Wochen

03 / 2001 Famulatur, Notfallmedizin, Gachon Medical School, Korea, 4 Wochen

09 / 2001 Famulatur, Ophtalmologische Praxis, München, 4 Wochen

04 – 08 / 2002 Tertian Innere Medizin, PJ, Station 2/5, Prof. Dr. M. Claasen, Station 3/2, Prof. Dr. A. Schömig, Klinikum Rechts der Isar, TU München

08 – 11 / 2002 Tertian Chirurgie, PJ, Station 1/1, Prof. Dr. J.R. Siewert, Station 1/17, Prof. Dr. S. von Gumpenberg, Klinikum Rechts der Isar, TU München

12 / 2002 – / 2003 Tertian Anästhesie (Wahlfach), Operationssaal, Intensivstation 6/0, Prof. Dr. E. Kochs, Klinikum Rechts der Isar, TU München

MEDIZINISCHE ZUSATZQUALIFIKATIONEN

1999 Englisch für Mediziner

2000 Laparoskopische Chirurgie für Anfänger und Fortgeschrittene

2000 Tropenmedizin

2005 Praktischer Kurs für Gefäßnahttechniken, Pontresina
Grundkurs/Spezialkurs im Strahlenschutz
