

**Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Universitätsklinikum Würzburg
Direktor Prof. Dr. med. C. P. Speer, FRCPE**

**T- Zell- Zytokinexpression
bei gestillten vs. nicht-gestillten
Kindern**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Julia Aulenbach
aus Bad Mergentheim
Würzburg, Juli 2014**

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Würzburg am: 26.05.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Würzburg

Referent: Univ.-Professor Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

Koreferent: Univ.-Professor Dr. med Thomas Meyer

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Die Promovendin ist Ärztin.

meinem Bruder Steffen gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung des Immunsystems	2
1.2 Einführung in die Grundlagen des Immunsystems	2
1.3 Bedeutung der in dieser Arbeit analysierten T-Zell-Zytokine	10
1.4 Einfluss der Muttermilch	12
2. Problemstellung und Ziel der Arbeit	14
3. Studienkohorte	16
3.1 Gesamtheit der erfassten Kinder	16
3.2 Ein- und Ausschlusskriterien	16
3.3 Gruppeneinteilung	17
3.4 Erfasste Daten des Fragebogens	17
4. Material und Herstellung der benötigten Reagenzien	19
4.1 Probenmaterial	19
4.2 Geräte	19
4.3 Laborbedarf	19
4.4 Zellkulturmedien und Zusätze	20
4.5 Stimulanzen	21
4.5.1 Tabelle Stimulanzen	21
4.5.2 Vorverdünnungen Stimulanzen	21
4.6 Antikörper	21
4.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien	23
4.8 Herstellung zusätzlich benötigter Reagenzien	23
4.8.1 Kulturmedium	23
4.8.2 HBSS	23
4.8.3 PFA	23
4.8.4 Saponinpuffer	24
4.8.5 Saponin- Gebrauchslösung	24

5. Methoden	25
5.1 Funktion des Durchflusszytometers	25
5.2 Immunstatus	27
5.2.1 Durchführung	27
5.2.2 Auswertung des Immunstatus	28
5.3 Zytokinfärbung	28
5.3.1 Prinzip der Zytokinfärbung	28
5.3.2 Anlage der Zellkultur zur Zytokinexpression (Tag 1)	29
5.3.3 Durchführung der Zytokinfärbung (Tag 2)	30
5.3.4 Auswertung der Zytokinfärbung	31
5.4 Statistik	32
6. Ergebnisse	33
6.1 Immunstatus	33
6.1.1 Prozentuale Verteilung der Zellpopulationen in Bezug auf die Altersgruppen	33
6.1.2 Verteilung der Zellpopulationen in absoluten Zahlen in Bezug auf die Altersgruppen	36
6.1.3 Vergleich der Ergebnisse des Immunstatus zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern	38
6.2 Zytokinexpression	38
6.2.1 Expression der einzelnen Zytokine in Bezug auf die Altersgruppen und das Kriterium Stillen	38
6.2.1.1 IL2	38
6.2.1.2 IFN γ	39
6.2.1.3 TNF α	42
6.2.1.4 IL4	44
6.2.1.5 IL10	46
6.2.1.6 TGF β , Ki67, IL17	47
6.2.2 TH1/TH2-Homöostase	48
6.2.2.1 Vergleich des IFN γ /IL4-Quotienten zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern unabhängig von deren Alter	49
6.2.2.2 Vergleiche des IFN γ /IL4-Quotienten in Bezug auf die Altersgruppen	50

7. Diskussion	54
8. Zusammenfassung	64
Abkürzungsverzeichnis	67
Abbildungsverzeichnis	69
Tabellenverzeichnis	71
Literaturverzeichnis	73
Anhang	80
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Das Bestreben den Aufbau, die Funktion sowie die Entwicklung des Immunsystems zu verstehen, steht schon lange Zeit im Zentrum des Interesses vieler Forschungsarbeiten, insbesondere um auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse neue Behandlungsansätze für immunologisch relevante Krankheitsbilder zu entwickeln.

Die Entwicklung des menschlichen Immunsystems beginnt bereits auf der Stufe des Embryos, setzt sich während der intrauterinen Reifung fort und ist auch einige Jahre nach der Geburt noch nicht vollständig abgeschlossen. Während sich der Fetus in einer sehr geschützten und keimfreien Umgebung entwickeln kann, wird das Kind mit seinem noch unreifen Immunsystem bereits während der Geburt mit einer Vielzahl an Mikroorganismen konfrontiert. Das Kind ist aufgrund der Unreife seines Immunsystems nicht immer in der Lage, diesen potentiell schädigenden Einflüssen adäquat zu begegnen. Um dem immuninkompetenten Kind bereits in dieser Phase Schutz zu bieten, erfolgt sowohl pränatal durch den diaplazentaren Transfer von mütterlichen Antikörpern (IgG) als auch postnatal mit der Muttermilch eine Übertragung von Stoffen, die das Kind sowohl passiv schützen (IgG, sekretorisches IgA) als auch aktiv (Details siehe Abschnitt 1.4) an der Reifung des Immunsystems Anteil nehmen (KELLY ET AL., 2000; HAMOSH, 2001; LÖNNERDAL, 2003).

Die Entwicklung der eigenen Immunkompetenz ist für das Kind selbst von zentraler Bedeutung. Eine entscheidende Rolle spielen in diesem Zusammenhang allgemeine Schutzmechanismen wie effektive Epithelbarrieren, die Besiedelung mit nützlichen Mikroorganismen, die Schulung des Immunsystems, zwischen Selbst (Akzeptanz) und Fremd (Abwehr) zu unterscheiden, sowie die Differenzierung, Reifung und Proliferation der Zellen der erworbenen Immunität. Diese Reifungsprozesse werden von diversen externen Prozessen beeinflusst wie zum Beispiel der Auseinandersetzung mit zahlreichen Antigenen, sowohl körpereigenen als auch körperfremden (Nahrungsantigene, Oberflächenmoleküle pathogener Erreger). Die Nahrung stellt dabei für die Beschaffenheit unseres Immunsystems, vor allem in den frühen Lebensjahren, einen der wichtigsten einflussnehmenden Umweltfaktoren dar, weshalb das Verständnis der immunologischen Vorteile der natürlichsten Form der Säuglingsernährung, des Stillens mit Muttermilch, von besonderem Interesse ist.

1.1 Bedeutung des Immunsystems

Das Immunsystem dient dem Organismus zur Abwehr potentiell schädigender Einflüsse. Die Bedeutung der exakten Regulation und Steuerung des Immunsystems wird insbesondere dann offenkundig, wenn es zu Fehlfunktionen innerhalb dieses komplexen Systems kommt. Am Eindrucksvollsten wird das an extremen Über- oder Fehlreaktionen, wie zum Beispiel im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen, sowie an abgeschwächten oder ineffektiven Immunreaktionen, beispielsweise bei Immundefizienz-Erkrankungen, einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionskrankheiten und bei Tumorerkrankungen deutlich.

Da das Immunsystem aus vielen verschiedenen Zellen und Botenstoffen besteht, welche aufeinander wirken und sich gegenseitig beeinflussen, gibt es im Umkehrschluss natürlich auch viele Stellen an denen eine Fehlfunktion auftreten und in der Folge zu teilweise schwerwiegenden Krankheitsbildern führen kann. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung des Verständnisses der Zusammenhänge der Reifung und Entwicklung des Immunsystems.

1.2 Einführung in die Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem lässt sich in zwei Kategorien unterteilen: die **angeborene** und die **erworbene Immunität**. Natürlich ist diese Einteilung aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen und der Komplexität des Immunsystems unzureichend, soll den Überblick in diesem Falle jedoch vereinfachen. Sowohl bei der angeborenen als auch bei der erworbenen Immunität spielen zelluläre und humorale Bestandteile eine Rolle.

Die zellulären Bestandteile des Immunsystems tragen auf ihren Oberflächen diverse spezifische Merkmale. Diese können durch fluoreszierende monoklonale Antikörper spezifisch markiert werden und sind in der Durchflusszytometrie erkennbar bzw. messbar (Details siehe Kapitel 5 – Methoden). In diesem Fall erfolgte die Markierung so genannter CD (cluster of differentiation)-Antigene. Bei diesen handelt es sich meistens um membrangebundene Glykoproteine, die verschiedenste Funktionen haben können, z.B. Rezeptor- oder Signalfunktionen. Einigen dieser Oberflächenantigene lassen sich anhand der CD-Klassifikation spezifische Zellpopulationen zuordnen (Siehe Tabelle 1.2). Auf diese Weise liefern sie Hinweise auf den gegenwärtigen Zustand der humoralen und zellulären Immunität. Die Markierung der Oberflächenmoleküle ermöglicht zudem Rückschlüsse auf den Entwicklungsstand der Subpopulationen, da zwischen naiven und aktivierten Effektorzellen unterschieden werden kann.

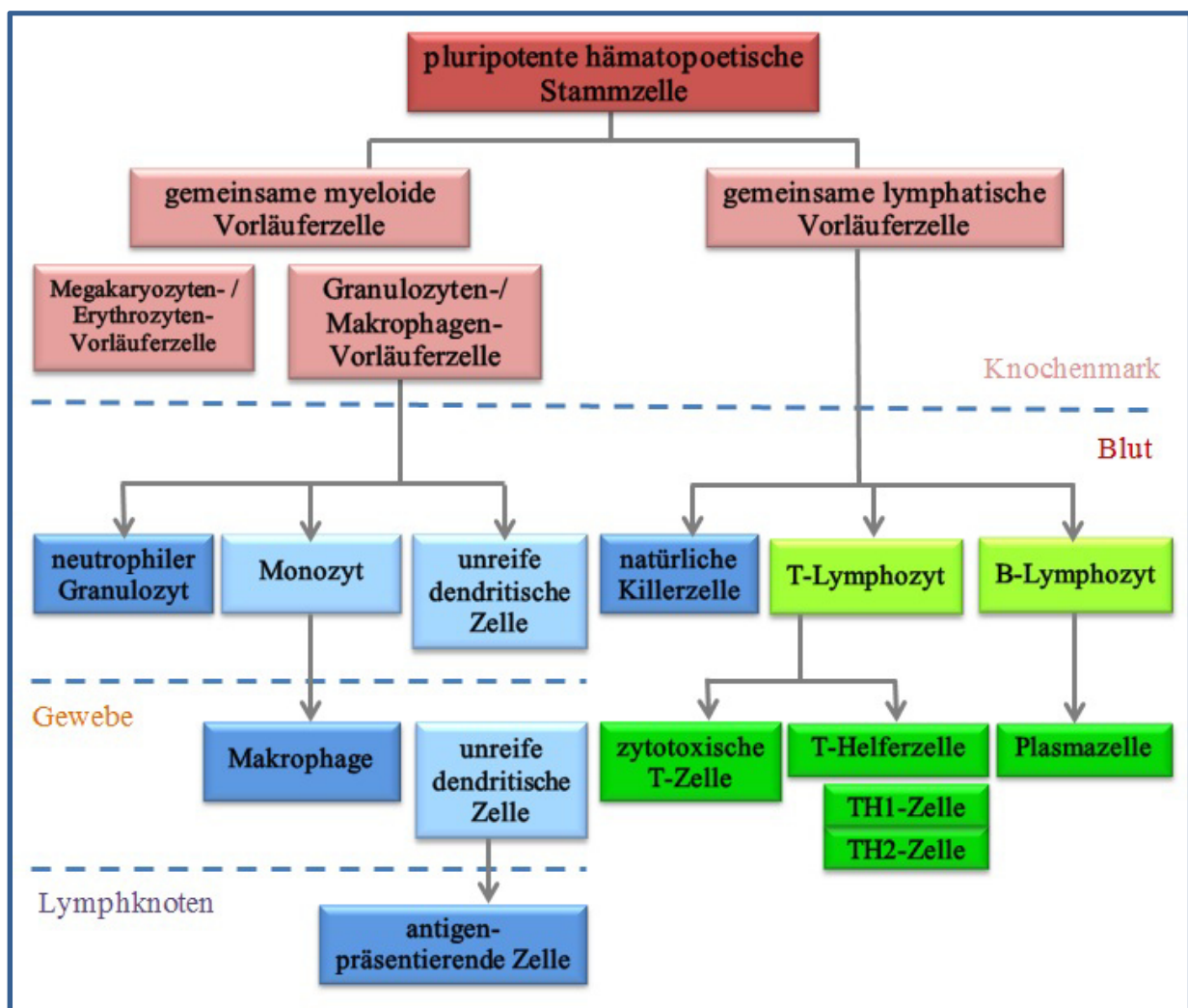
Kombination der Antigene	funktionelle Identität der Zellen
CD3 ⁺	T-Zelle
CD3 ⁺ CD8 ⁻ /CD3 ⁺ CD4 ⁺	T-Helferzelle*
CD3 ⁺ CD8 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁻	zytotoxische T-Zelle
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	naive T-Zelle
CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	T-Gedächtniszelle
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	natürliche Killerzelle
CD3 ⁺ HLA DR ⁺	aktivierte T-Zelle (MHC-II-Expression)
CD3 ⁻ CD19 ⁺	B-Zelle

Tab. 1.2 Zuordnung der antikörpermarkierten Oberflächenantigene zur Identität der Zellen

* Anmerkung: Da bei der Methodik der Zytokinfärbung (Kapitel 5, Abschnitt 5.3.3) im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Antikörper gegen CD8 verwendet wurden und die CD3⁺CD8⁻ Zellen fast ausschließlich CD4 positiven Zellen entsprechen, werden die CD3⁺CD8⁻ Zellen zur Vereinfachung und zum besseren Verständnis im Folgenden als CD3⁺CD4⁺ Zellen gewertet und als T-Helferzellen bezeichnet.

Einleitung

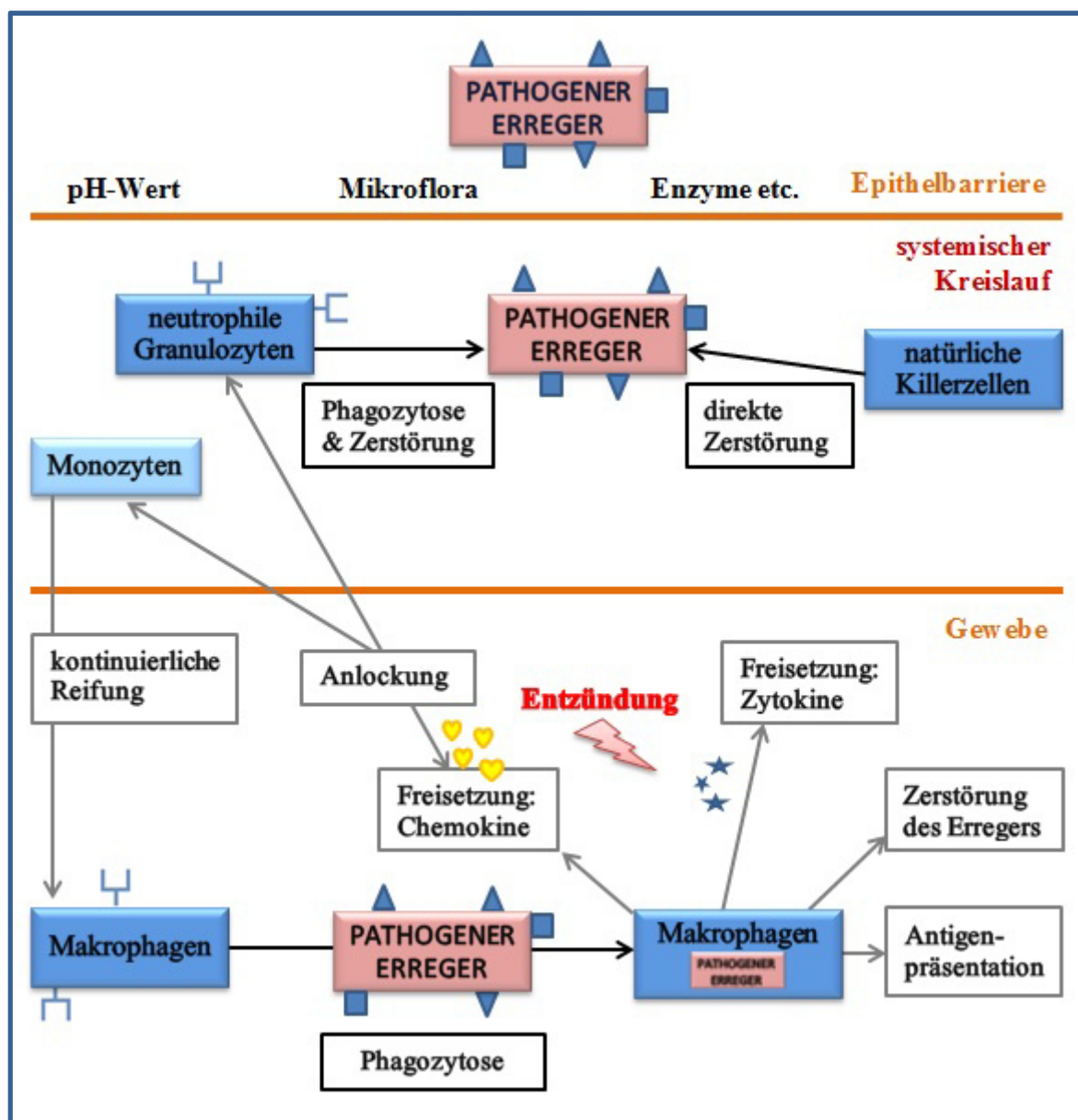
Die angeborene oder auch unspezifische Immunität besteht hauptsächlich aus Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen ($CD3^-CD16^+CD56^+$) und dem Komplementsystem, wohingegen die erworbene bzw. spezifische Immunität T- ($CD3^+$) und B-Lymphozyten ($CD3^-CD19^+$) umfasst. Während sich der Großteil der Zellen der angeborenen Immunität aus einer gemeinsamen myeloopoetischen Stammzelle entwickelt, entstehen die natürlichen Killerzellen aus einer lymphopoetischen Stammzelle, aus welcher sich auch die T- und B-Lymphozyten der erworbenen Immunität entwickeln. Die natürlichen Killerzellen werden jedoch aufgrund der fehlenden Antigen-spezifität zum unspezifischen Immunsystem gezählt (JANEWAY ET AL., 2002).



Grafik 1.2.1 Entstehung der zellulären Bestandteile des unspezifischen (blau) und des spezifischen (grün) Immunsystems, modifizierte Darstellung nach Janeway (JANEWAY ET AL., 2002)

Einleitung

Das **angeborene Immunsystem** bietet eine unmittelbare Form des Schutzes vor Infektionen und lässt sich grob in drei Komponenten gliedern: **1.** Oberflächenepithelien [physische Barriere] **2.** antimikrobielle Peptide und Proteine (z.B. niedriger pH-Wert, Enzyme) [chemische Barriere] **3.** Makrophagen, neutrophile Zellen, natürliche Killerzellen [mikrobiologische Barriere]. Die Wirkungen der unspezifischen zellulären Immunabwehr werden sowohl über den direkten Zellkontakt (z.B. Phagozytose, direkte Abtötung) als auch indirekt über Botenstoffe wie Zytokine (z.B. Anlockung weiterer Entzündungszellen) vermittelt (Siehe Grafik 1.2.2) (JANEWAY ET AL., 2002).



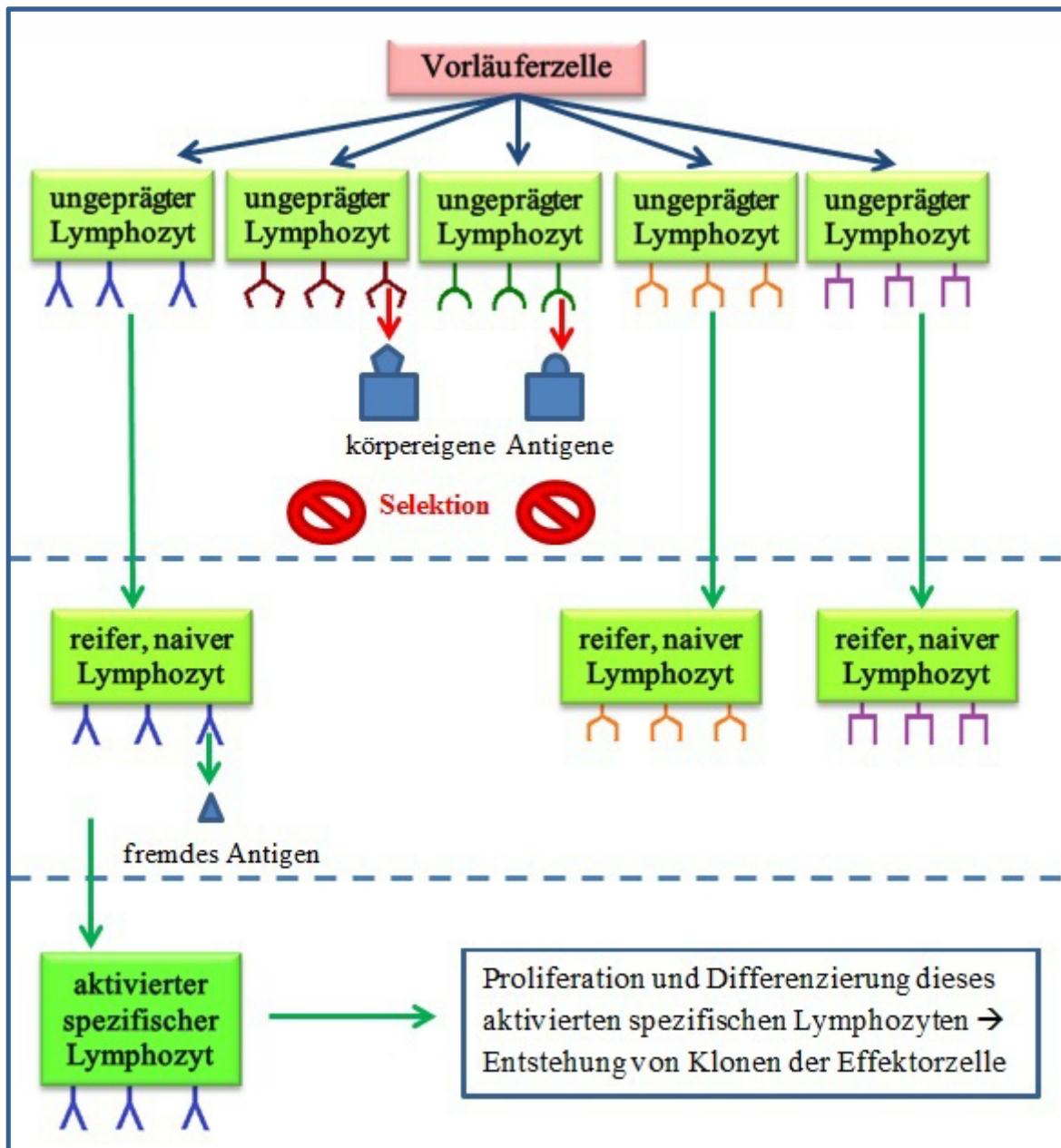
Grafik 1.2.2 Angeborenes bzw. unspezifisches Immunsystem (eigene vereinfachte Darstellung anhand von Information aus JANEWAY ET AL., 2002)

Einleitung

Das Komplementsystem, das sich primär als Teil des angeborenen Immunsystems entwickelt hat, schützt auf drei Arten vor einer Infektion: **1.** Opsonisierung: aktivierte Komplementproteine binden kovalent an Pathogene und markieren diese so für die Aufnahme durch Phagozyten. **2.** Wirkung als Chemoattraktor: kleine Fragmente einiger Komplementproteine locken weitere Phagozyten an den Ort der Komplementaktivierung und aktivieren diese. **3.** Zerstörung bestimmter Bakterien: die letzten Bestandteile des Komplements können Poren in der Bakterienmembran erzeugen und zerstören damit das Bakterium (JANEWAY ET AL., 2002).

Das **erworbene Immunsystem** besteht ebenso wie das angeborene aus zellulären und humoralen Komponenten. Während die T-Lymphozyten im Thymus ausdifferenzieren, entwickeln sich die B-Lymphozyten im Knochenmark. Thymus und Knochenmark bilden die zentralen lymphatischen Organe. T- und B-Lymphozyten lassen sich nicht nur anhand des Ortes ihrer Reifung und ihre unterschiedlichen Funktionen (siehe unten) unterscheiden, sondern auch durch die Moleküle, die sie auf ihren Oberflächen tragen, insbesondere den Antigenrezeptoren (T-Zellrezeptor [TCR] und B-Zellrezeptor [BCR]). Die Spezifität und Vielfalt dieser Rezeptoren resultiert dabei sowohl aus der Veränderung multipler Gensegmente, die für die Antigenbindungsstelle kodieren, als auch aus der klonalen Expansion von spezifischen T- und B-Zellen in den peripheren Lymphorganen (JANEWAY ET AL., 2002).

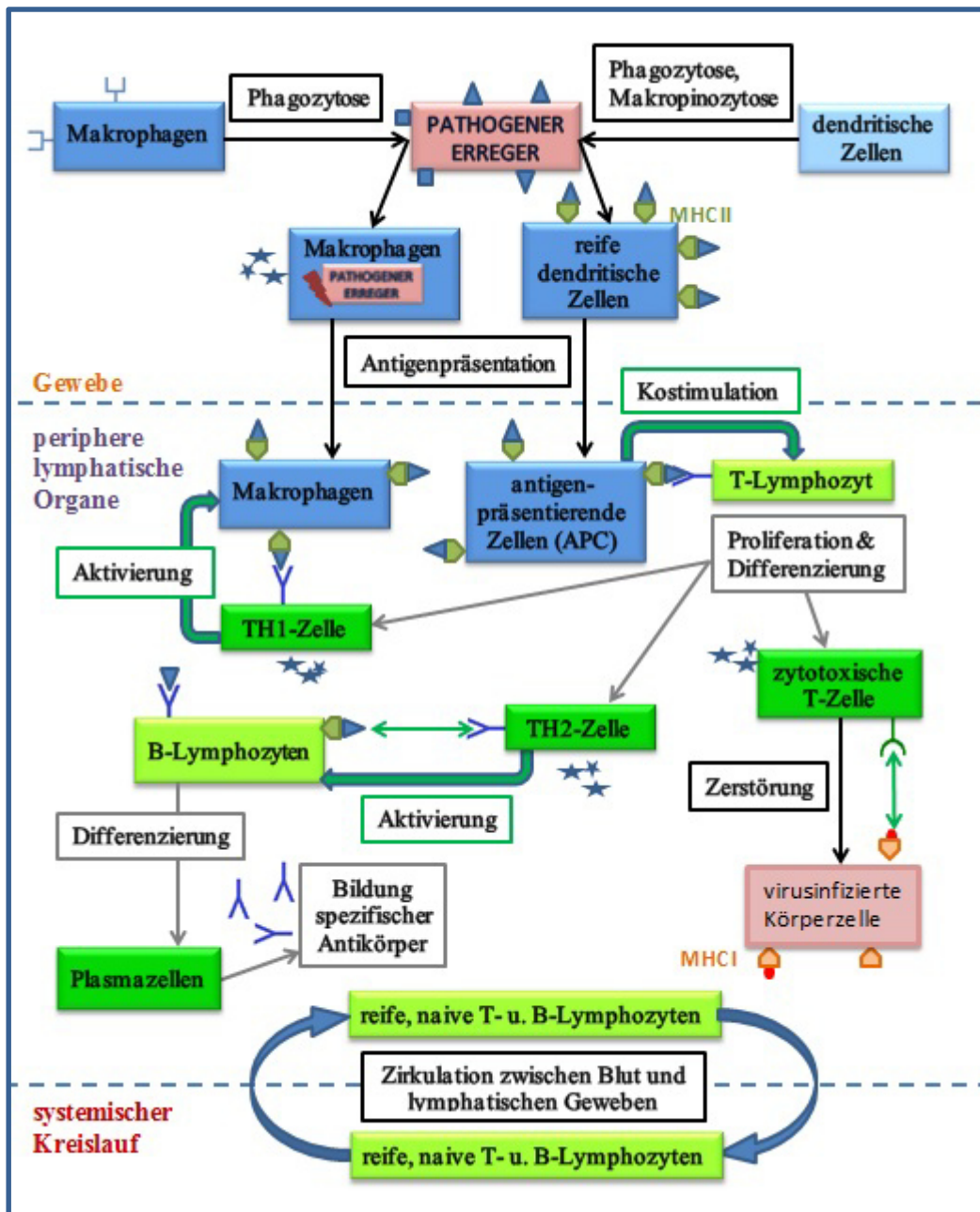
Innerhalb der ersten Lebensjahre kommt es zu einer Reifung sowie Prägung der spezifischen Immunität, die sich aufgrund der Interaktion der T- und B-Lymphozyten mit den verschiedensten Antigenen in den peripheren lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, lymphatische Gewebe der Schleimhäute) entwickelt. Im Rahmen dieser Reifung erlangen die Lymphozyten die Fähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremd zu differenzieren (positive bzw. negative Selektion). Dabei ist es wichtig, dass so genannte autoaggressive Zellen, die Rezeptoren tragen, die an körpereigene Antigene binden, selektioniert und durch Apoptose zerstört werden (negative Selektion; Siehe Grafik 1.2.3). Lymphozyten, die Rezeptoren tragen, die für Reaktionen mit fremden Antigenen besonders geeignet sind, empfangen hingegen Überlebenssignale (z.B. sezernierte Wachstumsfaktoren, Zytokine wie IL7) durch Zellen in den lymphatischen Geweben. Diese werden von den Antigenrezeptoren empfangen und hemmen die Apoptose (JANEWAY ET AL., 2002).



Grafik 1.2.3 Selektion, modifizierte Darstellung nach Janeway (JANEWAY ET AL., 2002)

Sowohl die reifen, naiven T-Lymphozyten ($CD45RA^+CD45RO^-$) als auch die reifen, naiven B-Lymphozyten zirkulieren mit dem Blutkreislauf und im lymphatischen System. Nach dem Zusammentreffen mit einem spezifischen Antigen, welches als körperfremd erkannt wird, proliferieren diejenigen T-Lymphozyten, die den passenden Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimiert haben, und differenzieren zu antigenspezifischen Effektorzellen ($CD45RA^-CD45RO^+$) (zellvermittelte Immunantwort) und die antigenspezifischen B-Lymphozyten differenzieren zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (humorale Immunantwort) (JANEWAY ET AL., 2002).

Einleitung



Grafik 1.2.4 Erworbenes bzw. spezifisches Immunsystem (eigene Darstellung anhand von Information aus JANEWAY ET AL., 2002)

Die Proliferation, Funktion und Differenzierung wird dabei durch den direkten Kontakt, aber auch durch zusätzliche Signale, zum Beispiel Botenstoffe wie Zytokine, vermittelt. Nach dem Verschwinden des Antigens überleben einige der Zellen als Gedächtniszellen. Sie bilden die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses, das eine schnellere und wirksamere Reaktion auf eine erneute Infektion mit demselben Krankheitserreger bietet und zu einer andauernden Immunität führt (JANEWAY ET AL., 2002).

Zu den T-Effektorzellen, die sich aus einem aktivierten, spezifischen T-Lymphozyten entwickeln, zählen die zytotoxischen T-Zellen (abstammend von naiven CD8⁺ T-Zellen) und die so genannten T-Helferzellen (TH1- und TH2-Zellen; abstammend von naiven CD4⁺ T-Zellen [TH0-Zellen]). Die Entscheidung, ob sich aus einem aktivierten CD4 positivem T-Lymphozyten eine TH1- oder eine TH2-Zelle entwickelt, ist von grundlegender Bedeutung für die Art der Immunantwort. Werden nur TH1-Zellen gebildet, so kommt es zu einer zellvermittelten Immunantwort, während die überwiegende Expression von TH2-Zellen eine humorale Immunität hervorruft (JANEWAY ET AL., 2002). Die Richtung der Entwicklung von TH0-Zellen kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen zum Beispiel die Interaktionen des Antigens mit dem T-Zellrezeptor, Zytokine, Kostimulatoren und die Induktion von Transkriptionsfaktoren (MURPHY ET AL., 2000; FARRAR ET AL., 2002; CARBALLIDO ET AL., 1997; KUCHROO ET AL., 1995). Es wird – auch aufgrund von in-vitro-Experimenten – vermutet, dass externe Faktoren (z.B. Nahrungsantigene, das Repertoire an vorhandenen Zytokinen) einen großen Anteil an diesen Vorgängen haben (JANEWAY ET AL., 2002). Die frühkindliche Prägung scheint dabei eine besondere Rolle zu spielen, da das Immunsystem in dieser Phase noch äußerst formbar ist. Wahrscheinlich haben diese frühen Vorgänge einen lebenslang bestehenden Einfluss auf das individuelle Immunsystem.

Die T-Effektorzellen tragen auf unterschiedliche Weise zu einer wirkungsvollen Immunreaktion bei. Die zytotoxischen T-Zellen können bestimmte Peptidfragmente der Erreger, die an MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche der infizierten Zelle gebunden sind, erkennen und sind in der Lage diese infizierten Zellen direkt abzutöten. Darüber hinaus können sie TH1-typische Zytokine und IL2 produzieren. Die TH1- und TH2-Zellen lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen Zytokinexpressionsmuster und Funktion unterscheiden. Während TH1-Zellen vor allem IL2, IFN γ , TNF β und TNF α produzieren, bilden TH2-Zellen vor allem IL4, IL5 und IL10 (MOSMANN ET AL., 1989; ROMAGNANI, 1991; Details zu den Funktionen der einzelnen Zytokine unter Abschnitt 1.3). TH0-Zellen können sowohl TH1 als auch TH2-Zytokine produzieren (MOSMANN ET AL., 1996). TH1-Zellen aktivieren über den Kontakt zu Antigenen, die an bestimmte Oberflächenmoleküle (sog. MHC-II-Moleküle) von Makrophagen gebundenen sind, die Makrophagen. Diese können dann die in ihnen enthaltenen intrazellulären Parasiten abtöten. Des Weiteren können TH1-Zellen die Bildung von IgG-Antikörpern in B-Zellen anregen. IgG-Antikörper können extrazelluläre Pathogene für die Aufnahme durch Phagozyten opsonisieren oder durch die Auslösung des Komplementsystems beseitigen. TH2-Zellen können über die Freisetzung bestimmter Zytokine naive antigen-

spezifische B-Zellen aktivieren. Diese durch Zytokine der TH2-Zellen (IL4 und IL5) vermittelte Aktivierung und/oder das direkte Erkennen eines Peptidfragments durch die B-Zelle selbst, führt dazu, dass die B-Lymphozyten zu Plasmazellen differenzieren, die antigenspezifische Antikörper (IgM, IgA, IgE, Subtypen von IgG) sezernieren (humorale Immunität). B-Zellen sind zudem in der Lage, Peptidfragmente aufgenommener Antigene gebunden an MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (JANEWAY ET AL., 2002).

1.3 Bedeutung der in dieser Arbeit analysierten T-Zell-Zytokine

Bei den komplexen Wechselwirkungen zwischen den Zellen des Immunsystems spielen Botenstoffe, wie zum Beispiel Zytokine, eine bedeutende Rolle. Zytokine sind Proteine mit einem niedrigen Molekulargewicht, die von verschiedenen Zellpopulationen produziert werden und sowohl auf parakrinem als auch auf autokrinem Weg durch die Bindung an spezifische Rezeptoren ihre Wirkung lokal, aber auch in weiterer Entfernung, entfalten und Zell-Interaktionen beeinflussen können (JANEWAY ET AL., 2002).

IL2 ist ein autokriner T-Zell-Wachstumsfaktor, der von T-Zellen (aktivierte TH0-, TH1-Zellen, einige naive CD8 positive T-Zellen) mittels Kostimulation, z.B. durch dendritische Zellen, selbst gebildet (Selbstaktivierungsweg) wird und deren Proliferation und Differenzierung steuert (JANEWAY ET AL., 2002). Mittlerweile wird vermutet, dass die Rolle von IL2 für CD4 positive Zellen vor allem in der Aufrechterhaltung der Toleranz liegt, indem es das Überleben von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) unterstützt (MALEK ET AL., 2004).

IFN γ wird insbesondere von TH1-Zellen (klassisches TH1-Zytokin), aber auch von zytotoxischen T-Zellen gebildet. IFN γ führt zu einer erhöhten Expression von Molekülen, die an der Peptidbeladung beteiligt sind (z.B. MHC-I, MHC-II) und von Komponenten des Antigenprozessierungssystems. Über IFN γ können zytotoxische T-Zellen die Virusreplikation direkt hemmen und das Virus ohne Zellzerstörung eliminieren. IFN γ aktiviert Makrophagen (wichtigstes Makrophagen-aktivierendes Zytokin), wodurch diese aufgenommene Bakterien zerstören und lockt weitere Makrophagen an den Infektionsherd. Es wirkt proinflammatorisch. Zudem hemmt IFN γ die Entwicklung von TH2-Zellen (FITCH ET AL., 1993; JANEWAY ET AL., 2002).

TNF α ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem von TH1-Zellen und zytotoxischen T-Zellen gebildet wird. TNF α aktiviert ebenfalls Makrophagen (in Kooperation mit IFN γ) sowie Endothelzellen, erhöht die Permeabilität der Gefäßwände und führt so zu einem verstärkten Einstrom von IgG, Komplement und Zellen in das Gewebe.

TNF α vermittelt lokale Entzündungen und systemische Effekte wie Fieber, die Mobilisierung von Metaboliten und – beim Auftreten einer Sepsis – den septischen Schock. Es stimuliert die Wanderung der dendritischen Zellen zu den Lymphknoten und deren Reifung zu hochgradig costimulierenden antigenpräsentierenden Zellen (JANEWAY ET AL., 2002).

IL4 ist das wichtigste Effektormolekül von TH2-Zellen (klassisches TH2-Zytokin). Es aktiviert ebenso wie IL5 (ebenfalls ein TH2-Zytokin) B-Zellen (siehe oben). IL4 hemmt zudem die Produktion von TH1-Zytokinen (JANEWAY ET AL., 2002) und stimuliert die Produktion von TH2-Zytokinen (SHEARER, 1997).

IL10 wird von TH2-Zellen gebildet und ist ein wirksamer Inhibitor der Funktionen von Makrophagen und beendet auf diese Weise eine begonnene proinflammatorische Immunantwort. Es hemmt zudem die Produktion von TH1-Zytokinen (STREET ET AL., 1991; SHEARER, 1997). Interessanterweise ist eine erhebliche Menge an IL10 in Muttermilch enthalten (GAROFALO ET AL., 1995).

TGF β wird von CD4 positiven T-Zellen produziert und kann das Zellwachstum sowie Entzündungen hemmen (JANEWAY ET AL., 2002). Bekannt wurde TGF β als Tumorsuppressormolekül. TGF β kann jedoch auch stimulierende Wirkungen haben und ist notwendig für das Überleben von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ebenso wie von CD4 positiven Effektorzellen (LI ET AL., 2006). TGF β ist wahrscheinlich eines der wichtigsten immunmodulierenden Zytokine. Zudem ist es, ebenso wie IL10, in einer erheblichen Menge in Muttermilch enthalten (ODDY ET AL., 2010). Eine Rolle spielt in diesem Zusammenhang, dass TGF β anti-entzündliche Eigenschaften besitzt und gemeinsam mit IL10 die IgE-Synthese herunterregulieren kann (BÖTTCHER ET AL., 2003).

IL17 wird von T-Gedächtniszellen (CD4⁺CD45RO⁺ und CD8⁺CD45RO⁺) produziert und ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es stimuliert Fibroblasten, epitheliale und endotheliale Zellen zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die an inflammatorischen und hämatopoetischen Prozessen beteiligt sind (FOSSIEZ ET AL., 1996; KORN ET AL., 2007).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Zytokine eine zentrale Rolle bei der Vermittlung zellulärer und physiologischer Antworten übernehmen und dass das Potenzial der verschiedenen Zellpopulationen gewisse Zytokine zu produzieren, die Effektivität des individuellen Immunsystems zumindest teilweise widerspiegeln kann.

1.4 Einfluss der Muttermilch

Muttermilch ist die natürlichste Art und Weise der Ernährung eines Neugeborenen bzw. Säuglings. Einen klaren Vorteil gegenüber künstlich erzeugter Muttermilchersatznahrung stellt ihre erhöhte Bioverfügbarkeit dar. Vor allem ist jedoch davon auszugehen, dass die in der Muttermilch enthaltenen bioaktiven Substanzen, neben ihrer nutritiven Funktion, wichtig für die Reifung und Funktion des kindlichen Immunsystems sind (HAMOSH, 2001). Die verschiedenartigen in der Muttermilch enthaltenen Faktoren sind in unterschiedlichen Mengen in verschiedenen Phasen der Laktation vorhanden (LAWRENCE ET AL., 2005).

Muttermilch enthält unter anderem Probiotika; Lactose; Lipide, z.B. Triglyceride und langkettige ungesättigte Fettsäuren; Oligosaccharide; Proteine, z.B. Immunglobuline (vor allem sekretorisches IgA, weniger IgM und IgG), Lactoferrin, Lysozym, α -Lactalbumin und Kasein; Nukleotide; Vitamine A, C und E; Enzyme, Hormone und Wachstumsfaktoren; Zytokine sowie lösliche Rezeptoren dieser Zytokine. Die immunologischen Vorteile werden dabei durch eine Vielzahl von Mechanismen vermittelt: direkte und indirekte antimikrobielle Aktivität, Stimulation der Entwicklung der Immunfunktion, antientzündliche Wirkungen, Verbesserung des Wachstums und der Entwicklung von Geweben des Kindes, Modulation der Immunfunktion (HAMOSH, 2001; LÖNNERDAL, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Muttermilch einen direkten Einfluss auf die Zusammenstellung der Darmflora des Kindes hat. Kinder, die gestillt wurden, zeigen im Gegensatz zu nicht-gestillten Kindern höhere Anteile an Lactobacillus und Bifidobakterien (MOUNTZOURIS ET AL., 2002). Oligosaccharide, Proteine, Peptide und Nukleotide tragen zum Wachstum von Lactobacillus und Bifidobakterium bei (MOUNTZOURIS ET AL., 2002). Des Weiteren sind in der Muttermilch Substanzen enthalten, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und TGF α , die die Reifung des Darmepithels und der Zellen im Darmtrakt verbessern (DONOVAN ET AL., 1994), was zu einer früher verfügbaren effektiven Barriere gegen schädliche Mikroorganismen beiträgt.

Es gibt viele zusätzliche in der Muttermilch enthaltene Stoffe, deren Nutzen und Funktion für das Kind bislang nicht geklärt sind. Die belegten Auswirkungen der Ernährung des Kindes mit Muttermilch, wie zum Beispiel eine Verringerung von Infektionskrankheiten (CHIEN ET AL., 2001; DUNCAN ET AL., 1993; CRUZ ET AL., 1988; BACHRACH ET AL., 2003; ASHRAF ET AL., 1991), die Senkung der Säuglingssterblichkeit (ARIFEEN ET AL., 2001), das geringere Vorkommen des plötzlichen Kindstods (ALM ET AL., 2002), einer Risikoverminderung für Diabetes Typ 1 (FIELD, 2005) und Typ 2, für Lymphome, Leukämien, Morbus Hodgkin (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005), für Übergewicht und Adipositas (HORTA ET AL., 2007), für

eine Hypercholesterinämie und Allergien (BERGMANN ET AL., 2003; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005), legen einen weitreichenderen Einfluss des Stillens auf die Entwicklung des Immunsystems nahe.

Obwohl der Einfluss der Muttermilch auf die Entwicklung eines gut funktionierenden Immunsystems ein wichtiges Thema ist, gibt es hierzu, vor allem hinsichtlich möglicher vorhandener Unterschiede in den Zytokinmustern bei gestillten und nicht-gestillten Kindern, nur wenige solide Daten.

2. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Stillen könnte ein wichtiger Faktor sein, der bei der Entwicklung und Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen und Zytokinmustern im Säuglings- und Kindesalter eine bedeutende Rolle spielt. Bislang gibt es nur wenige solide Daten zur Zytokinexpression bei gesunden Kindern (WIEGERING ET AL., 2009 [2]), vor allem Studien, die den Einfluss der Muttermilch auf die Reifung bzw. Prägung des Immunsystems untersuchen, sind rar (PABST ET AL., 1997; SRIVASTAVA ET AL., 1996). Die Zielsetzung der hier vorgelegten Promotionsarbeit war es, den potentiellen Effekt des Stillens auf die Entwicklung der Immunantwort bei gesunden Kindern zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Verteilung der T-, B- und NK-Zell-Subpopulationen analysiert. Als Surrogatmarker der Immunfunktion wurde, in einem zweiten Schritt, die Zytokinexpression von T-Zell-Populationen bei gestillten versus mit Formelnahrung ernährten Kindern ermittelt.

Da beschrieben wurde, dass das Stillen Kinder auf der einen Seite vor Allergien schützt (TH2 vermittelte Krankheit) (SILVERS ET AL., 2012; WRIGHT ET AL., 2001) und auf der anderen Seite gestillte Kinder während der Kindheit weniger anfällig für schwerwiegende bakterielle Infektionen (TH1-Immunantwort benötigt) (BACHRACH ET AL., 2003) und TH1-vermittelte Autoimmunerkrankungen (KOLETZKO ET AL., 1989; PISACANE ET AL., 1994) zu sein scheinen, lag ein besonderer Fokus darauf, typische TH1-Zytokine wie $IFN\gamma$, IL2 und $TNF\alpha$ sowie ein typisches TH2-Zytokin wie IL4 im Vergleich zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Studienkohorte von 196 gesunden Kindern untersucht (Patientencharakteristika siehe Kapitel 3 Tabelle 3.3, 3.4.1 und 3.4.2). Damit gewährleistet war, dass die Ergebnisse auf den Faktor „Stillen“ zurückgeführt werden können und kein Bias vorliegt, das durch andere Faktoren bedingt ist, wurden diese potentiellen Einflussgrößen, wie erhaltene Impfungen, Nikotinexposition und allergische Erkrankungen in der Familie, im Rahmen eines Fragebogens erfragt und auf ihre Signifikanz hin überprüft (Siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.4). Zwischen den beiden Studiengruppen (gestillt/nicht-gestillt) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf exogene Faktoren.

Zur Untersuchung der T-, B- und NK-Zell-Subpopulationen sowie der intrazellulären Zytokinexpression durch T-Zell-Populationen wurden Methoden genutzt, die schon zuvor von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Verena Wiegering im Stammzelllabor der Universitätskinderklinik zu Würzburg etabliert wurden (WIEGERING, 2009 [1]).

Alle immunologischen Parameter wurden in peripherem, heparinisiertem Blut untersucht. Zunächst wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) eine Phänotypisierung, anhand von antikörpermarkierten Oberflächenantigenen der T-, B- und NK-Zell-Subpopulationen („Immunstatus“), durchgeführt. Des Weiteren wurden die mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels PMA und Ionomycin stimuliert und die Zytokinsekretion durch Brefeldin blockiert. Durch FACS-Analyse wurde die nach 20-24 stündiger Anregung in der Kultur vorhandene intrazelluläre Zytokinexpression von IL2, IFN γ , TNF α , IL4, IL10, TGF β und IL17 in den T-Zell-Populationen, bei gleichzeitiger Oberflächenantigenmarkierung, ermittelt. In einem weiteren Schritt wurde der Quotient aus IFN γ und IL4 berechnet, um die relative Verteilung zwischen TH1 und TH2 zu analysieren.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, den potentiellen Effekt des Faktors Stillen auf die Entwicklung, die Verteilung und die Differenzierung von Zellpopulationen, die Expression von Zytokinen und einen möglichen Zytokinshift bei gesunden Kindern zu untersuchen.

3. Studienkohorte

3.1 Gesamtheit der erfassten Kinder

In diese Studie wurden 196 Kinder, 105 gestillte und 91 nicht-gestillte Kinder, in einem Alter zwischen 26 Tagen und 12 Jahren und 352 Tagen, eingeschlossen. Die verwendeten Blutproben stammen ausschließlich von gesunden Kindern, welche aufgrund von nicht-immunologisch relevanten Erkrankungen bzw. Eingriffen in der Ambulanz der Kinderklinik bzw. in der Kinderchirurgie der Universitätsklinik in Würzburg vorstellig wurden. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg (Studiennummer 133/04 vom 13.12.2004 mit Amendment vom 25.11.2005 bzw. 28.09.2007) liegt vor. Eine Einwilligung durch die Erziehungsberechtigten, den institutionellen Richtlinien in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki folgend, liegt in allen Fällen schriftlich vor.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Ein Hauptkriterium für die betrachtete Studienkohorte war die Stillzeit. Als nicht-gestillt* wurden Kinder gewertet, welche nicht oder weniger als drei Wochen gestillt wurden. Als vollgestillt galten Kinder, welche mindestens vier Monate bis maximal 12 Monate ausschließlich mit Muttermilch ernährt wurden. Fünf Kinder erfüllten dieses Kriterium nicht und wurden von der Studie ausgeschlossen. Die maximale Altersgrenze der Studienkohorte wurde auf 12 Jahre und 364 Tage festgelegt. Zwei Kinder lagen über dieser Altersgrenze und wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Bereits im Vorfeld wurde darauf geachtet, dass die erfassten Kinder keine Erkrankungen bzw. Zustände aufwiesen, die einen Einfluss auf ihr Immunsystem haben könnten. Von den im Rahmen dieser Studie evaluierten 198 Kindern wurden fünf aufgrund der Stillzeit und zwei aufgrund ihres Alters, welches mehr als 12 Jahre und 364 Tage betrug, ausgeschlossen. Um weiterhin alters- und geschlechtskompatible Gruppen zu erhalten, wurden Daten von fünf bereits zuvor, in der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Verena Wiegering, untersuchten Kindern hinzugenommen. Diese Kinder konnten aufgrund der passenden Stillzeiten, des passenden Alters und der gleichen Methoden der Bearbeitung der Blutproben eingeschlossen werden. Die im Folgenden ausgewertete Studienkohorte besteht somit aus insgesamt 196 gesunden Kindern, von denen 105 gestillt und 91 nicht-gestillt wurden, in einem Alter zwischen 26 Tagen und 12 Jahren und 352 Tagen.

**Anmerkung: Im Folgenden werden die Begriffe „nicht-gestillt“ und „Formula-ernährt“ synonym verwendet, da die als „nicht-gestillt“ bezeichneten Kinder mit Muttermilchersatznahrung, so genannter Formula-Nahrung, ernährt wurden.*

3.3 Gruppeneinteilung

Die in die Studie eingeschlossenen 196 Kinder wurden in vier Gruppen eingeteilt (Siehe Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4.1). Gruppe A umfasst dabei die Altersgruppe unter einem Jahr. Diese Gruppe besteht aus 45 Kindern, von denen 22 weiblich und 23 männlich sind. Von diesen Kindern wurden 22 gestillt und 23 wurden nicht gestillt. Das mediane Alter beträgt fünf Monate. Gruppe B beinhaltet die Altersgruppe zwischen einem Jahr und drei Jahren, sie umfasst 41 Kinder, von denen 21 weiblichen und 20 männlichen Geschlechts sind. 20 dieser Kinder wurden gestillt und 21 wurden nicht gestillt. Das mediane Alter beträgt hier 25 Monate. In Gruppe C sind die Kinder im Alter zwischen drei und sechs Jahren erfasst. Es handelt sich dabei um insgesamt 45 Kinder, von denen 23 weiblich und 22 männlich sind. Gestillt wurden in dieser Gruppe 24 Kinder und 21 wurden nicht gestillt. Das mediane Alter beträgt hier 56 Monate. Gruppe D besteht aus der Altersgruppe zwischen sechs Jahren und 12 Jahren und 352 Tagen, insgesamt 65 Kinder, von denen 30 weiblich und 35 männlich sind. 39 dieser Kinder wurden gestillt und 26 wurden nicht gestillt. Das mediane Alter beträgt in dieser Gruppe 118 Monate.

Stillen		nicht-gestillt	gestillt	Gesamtzahl	Signifikanz
Altersgruppen (Jahre)					
A	<1 Jahr	23	22	45	n.s.
B	1 - <3 Jahre	21	20	41	n.s.
C	3 - <6 Jahre	21	24	45	n.s.
D	6 - <13 Jahre	26	39	65	n.s.

Tab. 3.3 Verteilung der gestillten und nicht-gestillten Kinder innerhalb der Altersgruppen

3.4 Erfasste Daten des Fragebogens

Die Erziehungsberechtigten der Kinder, deren Blut in dieser Studie untersucht wurde, wurden gebeten, neben der Einverständniserklärung zur Verwendung des Blutes, einen Fragebogen (Abbildung im Anhang) auszufüllen. In diesem Fragebogen wurden, neben dem Hauptkriterium der Stillzeit, Parameter abgefragt, die einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnten. Es wurde unter anderem abgefragt, ob die Kinder vegetarisch ernährt werden, alle Impfungen vorhanden sind, Allergien bei dem Kind oder den Eltern zu finden sind, ob die Eltern rauchen und ob Nikotinabusus während der Schwangerschaft bestand. Die Verteilungen können den nachfolgenden Tabellen 3.4.1 und 3.4.2 entnommen werden.

Studienkohorte

Es konnte bei keinem Kriterium ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Altersgruppen bzw. den Faktor „Stillen“ gefunden werden.

Kriterium \ Altersgruppen (Jahre)	A <1 n=45	B 1- <3 n=41	C 3- <6 n=45	D 6- <13 n=65	Σ=196	Signifikanz
	medianes Alter (Monate)	5	25	56		
Stillen (nein/ja)	23/22	21/20	21/24	26/39	91/105	n.s.
Geschlecht (weiblich/männlich)	22/23	21/20	23/22	30/35	96/100	n.s.
vegetarische Ernährung (nein/ja)	44/1	41/0	45/0	62/3	192/4	n.s.
Impfung (nein/ja)	3/42	2/39	2/43	1/64	8/188	n.s.
Allergien (nein/ja)	45/0	39/2	38/7	53/12	175/21	n.s.
Atopie [Familie] (nein/ja)	43/2	35/6	38/7	55/10	171/25	n.s.
Nikotinabusus der Eltern (nein/ja)	41/4	30/11	31/14	47/18	149/47	n.s.
Nikotinabusus in der Schwangerschaft (nein/ja)	43/2	34/7	36/9	50/15	163/33	n.s.

Tab. 3.4.1 Verteilung der Kriterien in Bezug auf die verschiedenen Altersgruppen

Kriterium \ Stillen	nicht-gestillt	gestillt	Gesamtzahl	Signifikanz
	männlich	47		
weiblich	44	52	96	n.s.
medianes Alter (Monate)	55	61		n.s.
vegetarische Ernährung (nein/ja)	90/1	102/3	192/4	n.s.
Impfungen (nein/ja)	4/87	4/101	8/188	n.s.
Allergien (nein/ja)	84/7	91/14	175/21	n.s.
Atopie [Familie] (nein/ja)	82/9	89/16	171/25	n.s.
Nikotinabusus der Eltern (nein/ja)	64/27	85/20	149/47	n.s.
Nikotinabusus in der Schwangerschaft (nein/ja)	72/19	91/14	163/33	n.s.

Tab. 3.4.2 Verteilung der Kriterien in Bezug auf den Faktor „Stillen“

4. Material und Herstellung der benötigten Reagenzien

4.1 Probenmaterial

Die Blutproben wurden in Röhrchen, die Heparin als Antikoagulanzen enthielten, gesammelt und anschließend bis zur Bearbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

4.2 Geräte

Geräte	Gerätetyp	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD, Heidelberg
Gefrierschrank	- 20°C	GFL, Burgwedel
Kühlschrank	+ 4°C	Liebherr
Magnetrührer mit Wärmeplatte	RCT- Basis	KIKA- Werke
Pipetten	Eppendorf Research/ Reference 2,5µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Accu- Jet [®]	Braun, Melsungen
Sterile Werkbank	Hera Safe, Klasse 2 Typ H	Heraeus, Hanau
Vortexgerät	Vortex REAX control	Heidolph, Nürnberg
Waage	BP 1200	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Rotixa 50 RS	Hettich, Tuttlingen

Tab. 4.2 Geräte

4.3 Laborbedarf

Artikel / Beschreibung	Hersteller
Einmalhandschuhe	Kimberly- Clark, Zaventem, Belgien
Gewebekulturplatten, steril, 24Loch	NUNC. Roskilde, Dänemark

Tab. 4.3 Laborbedarf

Material und Herstellung der benötigten Reagenzien

Artikel / Beschreibung	Hersteller
Glaswaren (Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder) Schott Duran®	Schott, Mainz
Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss 15ml und 50ml	NUNC. Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	NUNC. Roskilde, Dänemark
Stangenpipetten 5ml, 10ml, 25ml	NUNC. Roskilde, Dänemark
Tubes 1ml	NUNC. Roskilde, Dänemark
Reagenzgläser	NUNC. Roskilde, Dänemark

Tab. 4.3 Laborbedarf (Fortsetzung)

4.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Reagenzien	Hersteller
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
HEPES Buffer 1M	Sigma, Taufkirchen
Kulturmedium RPMI 1640 Medium mit 2g/l NaHCO ₃	Biochrom AG, Berlin
L- Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin
Natriumpyruvat 100mM	Biochrom AG, Berlin
nicht- essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin
PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)	Sigma, Taufkirchen
Penicillin 10000 Units/ml Streptomycin 10mg/ml	Sigma, Taufkirchen

Tab. 4.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Material und Herstellung der benötigten Reagenzien

4.5 Stimulanzen

4.5.1 Tabelle Stimulanzen

Stimulans	Hersteller
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
Ionomycin (Calciumsalz)	Sigma, Taufkirchen
PMA (Phorbol- 12-Myristal- 13- Acetat)	Sigma, Taufkirchen

Tab. 4.5.1 Stimulanzen für die Zellkultur der Zytokinfärbung

4.5.2 Vorverdünnungen der Stimulanzen

Von den jeweiligen Stimulanzen wurden Stocklösungen angelegt, die dann portionsweise à 500µl in 1ml Tubes bei -20°C im Gefrierschrank gelagert wurden. Die Verdünnungen wurden folgendermaßen vorgenommen: 5mg Brefeldin A wurde mit 500µl Ethanol absolut verdünnt, 1mg Ionomycin mit 253µl DMSO und 1mg/ml PFA in DMSO.

4.6 Antikörper

CD-Antigene	Klon	Isotyp	Fluorchrom	Konzentration/ Volumen	Hersteller
CD3	UCHT1	Mouse IgG1,κ	PerCP	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD3	SK7	Mouse IgG1,κ	APC	0.5µg mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD4	RPA-T4	Mouse IgG1,κ	PE, PerCP	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD8	RPA-T8	Mouse IgG1,κ	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD16	3G8	Mouse IgG1,κ	PE	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD19	HIB19	Mouse IgG1,κ	FITC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD19	SJ25C1	Mouse IgG1,κ	APC	0.5µg mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD45	HI30	Mouse IgG2b,κ	APC	20µl/10x6Zellen	BD, Heidelberg

Tab. 4.6.1 Antikörper für CD-Antigene

Material und Herstellung der benötigten Reagenzien

CD-Antigene	Klon	Isotyp	Fluorchrom	Konzentration/ Volumen	Hersteller
CD45RA	HI100	Mouse IgG2b, κ	PE	20 μ l/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD45RO	UCHL1	Mouse IgG2a, κ	FITC	20 μ l/10x6Zellen	BD, Heidelberg
CD56	B159	Mouse IgG1, κ	PE	20 μ l/10x6Zellen	BD, Heidelberg

Tab. 4.6.1 Antikörper für CD-Antigene (Fortsetzung)

Zytokine	Klon	Isotyp	Fluorchrom	Konzentration/ Volumen	Hersteller
IL2	MQ1- 17H12	Rat IgG2a, κ	APC	0.1mg	BD, Heidelberg
IL4	MP4-25D2	Rat IgG1	FITC, APC	0.5 μ g mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
IL10	JES3-19F1	Rat IgG2a	APC	0.5 μ g mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
IL17	SCPL 1362	Mouse IgG1, κ	PE	0.5 μ g mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
IFNγ	B27	Mouse IgG1, κ	PE, APC	0.5 μ g mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
TNFα	Mab11	Mouse IgG1, κ	FITC, PE	0.5 μ g mAb/ 10x6Zellen	BD, Heidelberg
TGFβ	TB21	Mouse IgG1	PE		IQProducts, Niederlande

Tab. 4.6.2 Antikörper für Zytokine

sonstige Antigene	Klon	Isotyp	Fluorchrom	Konzentration/ Volumen	Hersteller
$\gamma\delta$ TCR	B1	Mouse IgG1, κ	FITC	0.1mg	BD, Heidelberg
$\alpha\beta$ TCR	T10B9.1A- 31	Mouse IgM, κ	PE	20 μ l/10x6Zellen	BD, Heidelberg
HLA DR	L243	Mouse IgG2a, κ	PerCP	20 μ l/10x6Zellen	BD, Heidelberg
Ki67	B56	Mouse IgG1, κ	PE	20 μ l/10x6Zellen	BD, Heidelberg

Tab. 4.6.3 Antikörper für sonstige Antigene

4.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Produkt	Hersteller
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	WAK-Chemie, Steinbach
FACS- Lysing Solution	BD, New Jersey, USA
FACS Flow	BD, New Jersey, USA
FACS Rinse	BD, New Jersey, USA
FACS Clean	BD, New Jersey, USA
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
Saponin	Sigma, Taufkirchen

Tab. 4.7 Chemikalien und sonstige Reagenzien

4.8 Herstellung zusätzlich benötigter Reagenzien

4.8.1 Kulturmedium

Das Kulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen an der Werkbank hergestellt. Hierzu wurde mit einer sterilen Stangenpipette 43ml RPMI 1640 mit 2g/l NaHCO_3 in ein 50ml Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss gegeben. Diesem wurden 5ml 10% FCS, 500 μ l 1% Penicillin/Streptomycin, 500 μ l 1% L-Glutamin, 500 μ l 1% Na-Pyruvat und 500 μ l 1% nicht-essentielle Aminosäuren mittels einer sterilen Pipette (1000 μ l) hinzugefügt. Das Kulturmedium wurde gut vermischt, das Röhrchen mit dem Schraubverschluss verschlossen und im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

4.8.2 HBSS

Zur Herstellung von „Hank’s balanced salt solution“ wurden zu 1l PBS genau 350mg NaHCO_3 hinzugefügt und diese Mischung im Anschluss im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

4.8.3 PFA (4%)

Für das Fixativ wurde 1g PFA mit der Waage abgewogen, in ein Becherglas oder einen Erlenmeyerkolben gegeben und mit HBSS auf 25ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Be-

Material und Herstellung der benötigten Reagenzien

hälter mit einer Plastikschutzfolie abgedeckt. Dann wurde die Mischung mit dem Magnetrührer auf der Wärmeplatte bei +50°C unter dem Abzug gerührt bis sich das PFA vollständig gelöst hatte. Etwa 10 Minuten abkühlen lassen bis das Reagenz klar war. Das gelöste PFA hält sich im Kühlschrank bei +4°C 3 Tage.

4.8.4 Saponinpuffer (10%)

Der Saponinpuffer wurde nach der gleichen Methode wie das 4%ige PFA hergestellt (Siehe 4.8.3), mit dem Unterschied, dass das Saponin mit 10ml HBSS aufgefüllt wurde um eine 10%ige Stocklösung zu erhalten. Die Saponinstocklösung ist im Kühlschrank bei +4°C etwa 2-3 Wochen haltbar.

4.8.5 Saponin-Gebrauchslösung (1%)

Kurz vor der Verwendung im Rahmen der Zytokinfärbung wurden 98ml HBSS (Siehe 4.8.2), 1ml 1M HEPES-Puffer und 1ml Saponinpuffer (Siehe 4.8.4) in einem Messbecher vermischt, um eine 1%ige Saponin-Gebrauchslösung zu erhalten.

5. Methoden

5.1 Funktion des Durchflusszytometers

Das Durchflusszytometer erlaubt die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen innerhalb kurzer Zeit. Es kann sowohl Streulichtsignale einzelner, fokussierter Zellen als auch Fluoreszenzsignale von mit den Zellen konjugierten Antikörpern multiparametrisch analysieren. Die zu untersuchenden Zellen fließen hintereinander durch eine dünne Messkammer, die sog. Flusszelle ("Flow Cell"). In dieser werden sie von einem Laser angestrahlt und erzeugen dabei, aufgrund ihrer jeweiligen physikalischen Eigenschaften, ein für jeden Zelltyp charakteristisches Streulicht ("Light Scatter"). Beeinflussende Faktoren der Lichtstreuung sind das Volumen und die Querschnittsfläche der Zelle, der Refraktionsindex und die Differenziertheit der Strukturen der Zellmembran sowie des Zytoplasmas. Auf diese Art und Weise wird Licht unterschiedlicher Quantität und Qualität emittiert. Je voluminöser eine Zelle ist und je differenzierter die Strukturen im Zytoplasma sind, desto größer ist das entstehende Streulicht.

Das Streulicht – Licht der Wellenlänge, das der Laser aussendet – wird von zwei Photodetektoren erkannt, der eine davon, der sog. "Sideward Scatter (SSC)", steht im 90° Winkel zum Laser und nimmt sämtliches auftreffendes Licht wahr, während der andere, sog. "Forward Scatter (FSC)", entlang des einfallenden Lichtes positioniert und durch Blockerstreifen vor dem Laser geschützt ist. Licht trifft auf diesen Detektor nur dann, wenn es durch eine fokussierte Zelle gebrochen wird. Das SSC, bei dem Lichtbrechung und Reflexion eine Rolle spielen, ist proportional zur Zellkomplexität oder -granularität, wohingegen der FSC, bei dem die Lichtbeugung wichtig ist, proportional zur Zelloberfläche bzw. -größe ist. So kann durch die beiden Photodetektoren, SSC und FSC, die Morphologie der durchfließenden Zelle bestimmt werden.

Leukozyten können nach diesem Prinzip, aufgrund ihrer individuellen Charakteristiken, in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterteilt werden. Zum Beispiel erzeugen Granulozyten mit ihrem irregulären Kern und den in ihnen enthaltenen Granula mehr Streulicht als Lymphozyten und weisen infolgedessen einen höheren SSC auf. Des Weiteren haben Monozyten einen höheren FSC als Lymphozyten, da der Grad der Brechung proportional zur Größe der Zelloberfläche ist. Durch die Messung des Streulichts kann so auf relativ einfache Weise eine Aussage über die Anzahl und Verteilung der verschiedenen Zelltypen in der Probe getroffen werden.

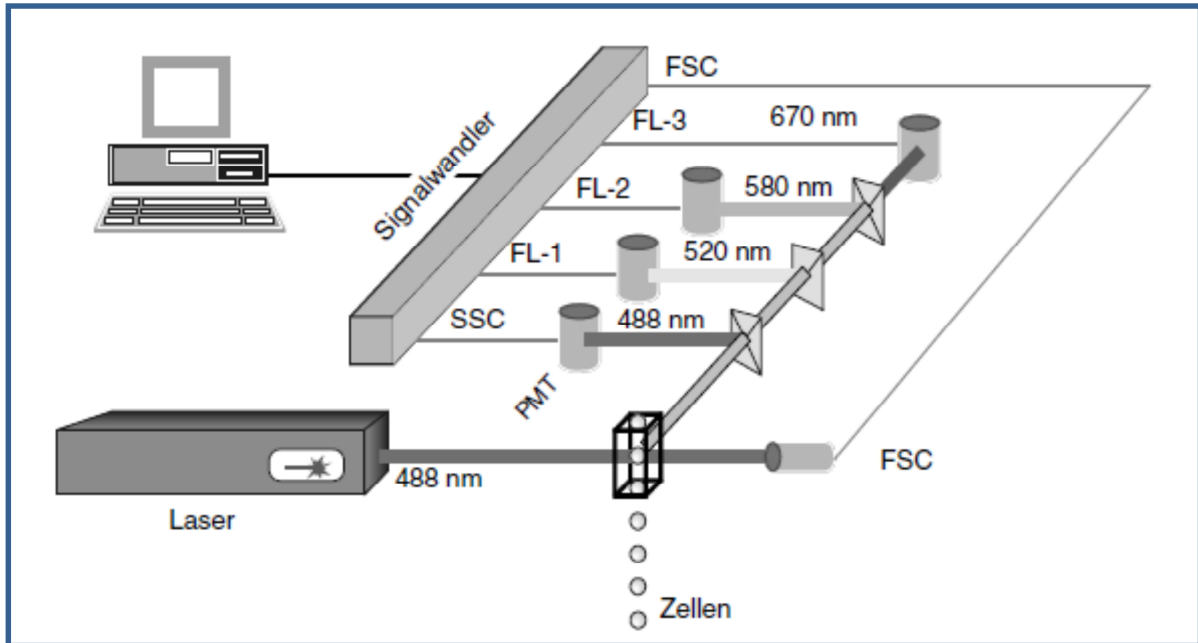


Abb. 5.1.1 Exemplarische Darstellung der Ausrichtung der Photodetektoren: hier am Beispiel eines Gerätes, das 3 Fluoreszenzfarben erfassen kann (SACK ET AL., 2007)

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer FACS Calibur[®] der Firma Becton Dickinson besitzt zudem vier weitere Photodetektoren, welche Licht einer anderen Wellenlänge detektieren, dieses Licht entsteht durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an bestimmte Antikörper gekoppelt sind. Die Fluoreszenzen werden in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht gemessen. In den nachfolgend geschilderten Methoden des Immunstatus (Siehe 5.2) und der intrazellulären Zytokinfärbung (Siehe 5.3) wurden Antikörper, welche an die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Perinidin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP) bzw. Allophycocyanin (APC) gekoppelt sind, zur Markierung genutzt. Diese Farbstoffe sind so aufgebaut, dass sie Licht einer Wellenlänge von 488nm absorbieren, jedoch Licht mit voneinander unterschiedlichen Wellenlängen emittieren. APC besitzt als Lichtquelle einen Helium- Neon- Zusatzlaser.

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe des emittierten Lichtes
FITC	488nm	495nm	ca. 520nm	grün
PE	488nm	564nm	575nm	gelb
PerCP	488nm	470nm	675nm	rot
APC	633nm (HeNeLaser)	650nm	660nm	orange-rot

Tab. 5.1.1 Wellenlängen in Bezug auf die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe

Die Photodetektoren wandeln die optischen Signale in elektrische Spannungsimpulse um, wozu verschiedene Verstärker benötigt werden. Ein logarithmischer Amplifikator sortiert die auftreffenden Fluoreszenzsignale entsprechend ihrer Intensität. Diese werden wiederum von einem analogen Digitalkonverter entsprechend der Stärke des Signals in bestimmte Gruppen eingeteilt. So entsteht ein Histogramm, in dem nach rechts die Intensität der Fluoreszenz und nach oben die Anzahl der Ereignisse aufgetragen ist. Außerdem kann die graphische Darstellung in Form eines sog. Dot-Plots erfolgen. Ein Dot-Plot ist eine zweidimensionale Darstellung von Messwerten, bei der jede Zelle entsprechend ihrer x- und y-Signalintensitäten als einzelner Punkt eingezeichnet wird. Hierbei steht jeder Punkt für eine bestimmte Zelle mit zwei ausgewählten Eigenschaften. Dabei können alle Parameter miteinander in Zusammenhang gesetzt werden. Die verschiedenen Fluoreszenzsignale müssen jedoch gegeneinander kompensiert werden, da sich die Bereiche des emittierten Lichtes der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zum Teil überschneiden. Zum Beispiel wird ein Teil des von FITC emittierten Lichtes auch von dem PE-Photodetektor erfasst und dann fälschlicherweise in ein PE-Signal übersetzt. Dies bezeichnet man als „spektrale Überstrahlung der Zytochrome“. Bei der Kompensation wird der Anteil des FITC-Signals, der sich mit dem PE-Signal überschneidet, abgezogen. Auf diese Art und Weise werden alle vier Fluoreszenzsignale miteinander abgeglichen.

Das hier verwendete 4-Farben-Durchflusszytometer ermöglicht also die Erhebung von sechs verschiedenen Parametern, um zum Einen die Morphologie von Zellen mittels SSC und FSC zu bestimmen und zum Anderen einzelne, fluoreszenzmarkierte Zelloberflächenmoleküle bzw. Zytokine diesen speziellen Zellen zuordnen zu können.

5.2 Immunstatus

5.2.1 Durchführung

Für den Immunstatus wurden für jede erhaltene Blutprobe fünf Reagenzgläser entsprechend der Nummerierung des Färbeprotokolls (Siehe Tabelle 5.2.1) mit den Ziffern 1-5 gekennzeichnet. In jedes dieser Reagenzgläser wurden 100µl des peripheren, heparinisierten Blutes aus den Probenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden den jeweiligen Reagenzgläsern entsprechend dem Färbeprotokoll je 4,5µl der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper hinzugefügt. Ausnahmen bildeten hierbei die Antikörper für $\gamma\delta$ -TCR, von denen 1µl benutzt wurde, CD16 und CD56, von denen jeweils 2,5µl verwendet wurden. Nachdem der Inhalt der Reagenzgläser gut mittels Vortexgerät vermischt worden war, erfolgte eine Inkubation für 15

Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden jeweils 1000µl FACS-Lyse hinzupipettiert, der Inhalt der Reagenzgläser gut vermischt und dann erneut für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Ende der Inkubation wurden die Reagenzgläser in der Zentrifuge (Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen) mit den Einstellungen: 531g, Bremse 9 für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend abgekippt und der Inhalt mit 2ml PBS aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden jedem Reagenzglas 100µl PBS hinzugegeben und anschließend die Signale mit dem Durchflusszytometer ausgezählt.

Fluoreszenz- färbung Nummer	FITC	PE	PerCP	APC
1	Iso	Iso	CD3	CD45
2	CD8	CD4	CD3	CD45
3	CD19	CD16/CD56	CD3	CD45
4	CD45RO	CD45RA	CD4	CD3
5	γδ TCR	αβ TCR	HLA DR	CD3

Tab. 5.2.1 Färbeprotokoll des Immunstatus

5.2.2 Auswertung des Immunstatus

Die bei der Auszählung der mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen erfassten Signale werden in einem sog. Dot-Plot dargestellt. Das Eingrenzen und somit die Auswahl bestimmter Punktwolken führt dazu, dass nur diese in die Analyse einbezogen werden. Dieser Vorgang wird als „Gating“ bezeichnet und wurde mit dem Programm CellQuestPro (Version 4.0.2, Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Diese Trennung von Messung und Datenanalyse erlaubt eine korrelierte Untersuchung der Messparameter für verschiedene Populationen oder Gruppen von Zellen unter verschiedenen Fragestellungen.

5.3 Zytokinfärbung

5.3.1 Prinzip der Zytokinfärbung

Zunächst werden die Zellen aus peripherem, heparinisiertem Blut in einer Zellkultur dazu angeregt Zytokine zu produzieren. Ionophore, wie das hier verwendete Ionomycin, können

Calcium-Ionen durch die Zellmembranen schleusen, das heißt es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Der Phorbolster PMA ähnelt strukturell dem Diacylglycerol (DAG) und kann zusammen mit dem Calcium die Proteinkinase C aktivieren. Diese spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation. Ionomycin und PMA dienen also der Stimulation der Zytokinexpression. Brefeldin A, ein künstlicher Hemmstoff des Zytokinexports, wird genutzt, um die intrazelluläre Ansammlung der erzeugten Zytokine herbeizuführen. Im nächsten Schritt der Bearbeitung dient Paraformaldehyd (PFA) zur Fixierung der Zellen, deren Zellwand mithilfe der Saponin-Gebrauchslösung (Herstellung Siehe Kapitel 4 Abschnitt 4.8.5) anschließend permeabilisiert wird, um den Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern den Zugang zu den im Golgiapparat gespeicherten Zytokinen zu ermöglichen.

Da die Antikörper nicht ausschließlich über ihren F_{ab} -Teil an das jeweils spezifische Antigen binden, sondern zudem in der Lage sind über ihren F_c -Teil unspezifisch an die F_c -Rezeptoren der zu untersuchenden Zelle zu binden, kann es zur Ausbildung unspezifischer Bindungen kommen. Aus diesem Grund wurde der Probeninhalt des Reagenzglases Nr.1 (Siehe Tabelle 5.3.3.1) nicht gefärbt, um einen Rückschluss auf die unspezifischen Bindungen ziehen und die Grenzen für ein positives Signal definieren zu können.

5.3.2 Anlage der Zellkultur zur Zytokinexpression (Tag 1)

Die Zellkultur wurde am Tag des Probeneingangs unter sterilen Bedingungen angesetzt. Die Arbeiten wurden dabei ausschließlich an der sterilen Werkbank (Hera Safe Klasse 2 Typ H, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Zunächst wurden Arbeitsverdünnungen der vorverdünnten Stimulanzen (Siehe Kapitel 4 Abschnitt 4.5.2) angefertigt: Brefeldin A 1:10 in RPMI, Ionomycin 1:50 in RPMI und PMA 1:10 in RPMI. Zur Anlage der Zellkultur wurden je $900\mu\text{l}$ Kulturmedium (Herstellung siehe Kapitel 4 Abschnitt 4.8.1) und $100\mu\text{l}$ peripheres, heparinisieretes Blut aus dem jeweiligen Probenröhrchen in zwei Löcher einer sterilen, pyrogenfreien 24-Loch-Kulturplatte gegeben und beides miteinander vermischt. Diesen zwei Löchern wurden jeweils $10\mu\text{l}$ PMA, Ionomycin und, nach kurzem zeitlichen Abstand, Brefeldin A hinzugefügt und der Inhalt gut vermischt. Im Anschluss wurden die Zellkulturen für 20-24 Stunden im Brutschrank (Hera Cell 150, Heraeus, Hanau) bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ inkubiert.

5.3.3 Durchführung der Zytokinfärbung (Tag 2)

Nach 20-24 stündiger Anregung wurden die Zellen in den beiden Löchern der Kulturplatte unter nicht-sterilen Bedingungen mithilfe einer Pipette resuspendiert und dann in ein 15ml Röhrchen mit Schraubverschluss abgeerntet. Der Inhalt des Röhrchens wurde dann mit HBSS aufgefüllt und fünf Minuten bei 531g, Bremse 9 zentrifugiert, danach wurde der Überstand abgekippt, das Röhrchen mit HBSS aufgefüllt und der Inhalt resuspendiert. Der gesamte Vorgang wurde zweimal wiederholt. Während dieses Waschvorganges wurden neun Reagenzgläser mit den Ziffern 1-9, entsprechend des Färbeprotokolls (Siehe Tabelle 5.3.3.1), beschriftet und im Anschluss daran die der jeweiligen Ziffer entsprechenden extrazellulären Antikörper (in der Tabelle rot markiert) vorpipettiert. Reagenzglas Nr.1 blieb als Isotyp-Kontrolle ungefärbt.

Nach dem letzten Waschgang wurde, anstelle von HBSS, 1ml PBS in das Röhrchen gefüllt und der Inhalt resuspendiert. Von dieser Blutsuspension wurden in jedes der neun Reagenzgläser 100µl gegeben. Der Inhalt der Reagenzgläser wurde anschließend mittels Vortexgerät gemischt, damit sich die Antikörper und die Blutsuspension gleichmäßig verteilen konnten, und danach bei Raumtemperatur für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit, wurden jedem Reagenzglas zur Fixation 100µl 4%iges PFA hinzugefügt, der Inhalt gemischt und dann erneut bei Raumtemperatur für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation folgte ein weiterer Waschgang mit je 2ml HBSS, dessen Überstand nach der Zentrifugation (5 Minuten, 531g, Bremse 9) abgekippt wurde.

In jedes der neun Reagenzgläser erfolgte die Zugabe von jeweils 100µl der Saponin-Gebrauchslösung zur Permeabilisierung der Zellmembran. Der Inhalt wurde mittels Vortexgerät vermischt und anschließend wurden die intrazellulären Antikörper der jeweiligen Nummer entsprechend (Färbeprotokoll siehe Tabelle 5.3.3.1) hinzupipettiert. Danach wurde der Inhalt der Reagenzgläser erneut gemischt und ein letztes Mal für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Reagenzgläser mit jeweils 2ml der 1%igen Saponin-Gebrauchslösung gewaschen (Einstellungen der Zentrifuge: 5 Minuten, 351g, Bremse 9). Nach letztmaligem Abkippen des Überstandes, wurden den neun Reagenzgläsern jeweils zwei Tropfen PBS hinzugefügt, der Inhalt resuspendiert und die Signale mithilfe des Durchflusszytometers analysiert.

Fluoreszenz- Färbung Nummer	FITC	PE	PerCP	APC
1	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt	ungefärbt
2	TNF α	IFN γ	CD3	IL2
3	IL4	Ki67	CD3	IL10
4	CD45RO	TNF α	CD3	IL2
5	CD45RO	IL17	CD3	IL4
6	CD45RO	TGF β	CD3	IFN γ
7	CD8	TGF β	CD3	CD19
8	CD8	TNF α	CD3	IFN γ
9	CD8	Ki67	CD3	IL4

Tab. 5.3.3.1 Protokoll der Zytokinfärbung

Antikörper	Menge
CD45RO, CD8, CD3	4,5 μ l
CD19	2,5 μ l
Ki67	5 μ l
TNF α , IL4, IFN γ , IL17, TGF β , IL2, IL10	1 μ l

Tab. 5.3.3.2 Menge pipettierter Antikörper

5.3.4 Auswertung der Zytokinfärbung

Die Antikörper-markierten Zytokine können, im Anschluss an die Färbung, aufgrund der gleichzeitig durchgeführten Antikörpermarkierung von Oberflächenantigenen (CD-Antigene), durch die Messung der Fluoreszenzemissionen mittels Durchflusszytometrie bestimmten Zellen zugeordnet werden (Siehe Kapitel 1 Tabelle 1.2). Die Auswertung der Zytokinfärbung erfolgt analog der Auswertung des Immunstatus mittels „Gating“ spezifischer Punktwolken mit dem Programm CellQuestPro (Version 4.0.2, Becton Dickinson, Heidelberg). Durch dieses ist die Erfassung der spezifischen Zellen mit deren Zytokinmustern sowohl qualitativ als auch quantitativ möglich.

5.4 Statistik

Die FACS-Daten wurden innerhalb der zuvor definierten Patientengruppen ausgewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte, mit dem dazugehörigen Streubereich in Klammern (3-97%), angegeben. Statistische Signifikanzen zwischen den Patientengruppen wurden mit Hilfe des nichtparametrischen U-Tests von Wilcoxon, Mann-Whitney durch das Programm „JMP“ (Version x 5.1.0.2; SAS Institute Inc., Ort Cary, USA) errechnet.

Die Nullhypothese postuliert die gleiche Grundgesamtheit der zu testenden Stichproben und damit ein Gleichgewicht der Mediane. Sie wurde mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ abgelehnt bzw. bei $p \geq 0,05$ aufrechterhalten.

Zur bivariablen Analyse möglicher Beziehungen zwischen der Zytokinexpression und verschiedenen T-Zell-Subpopulationen wurde die Logitfunktion verwendet. Sie kann zur Linearisierung von sigmoiden Kurven verwendet werden und ermöglicht dadurch den Vergleich prozentualer Werte mit absoluten Ergebnissen.

Ein Logitwert L ist der Logarithmus eines Odds, wobei ein Odd der Wahrscheinlichkeit p durch die Gegenwahrscheinlichkeit (1-p) entspricht.

$$L = \ln[p/(1-p)]$$

6. Ergebnisse

6.1 Immunstatus

Die Analyse des Immunstatus spiegelt den Entwicklungsstand der Lymphozyten-Populationen wider und ermöglicht dadurch Rückschlüsse auf die Immunkompetenz des einzelnen Patienten. Zusätzlich kann in der Zusammenschau aller Ergebnisse eine Einschätzung der altersabhängigen Beschaffenheit der Zellpopulationen erfolgen und ein Vergleich zwischen der Expression von Oberflächenantigenen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern gezogen werden. Durch die Markierung spezifischer Oberflächenantigene mittels immunfluoreszierender Antikörper ist es möglich die verschiedenen Zellpopulationen zu identifizieren und im Hinblick auf ihren prozentualen Anteil und Entwicklungsstand auszuwerten. Im Folgenden sind, zum besseren Verständnis, die Bezeichnungen der Oberflächenantigene in den Klammern hinter den Zellpopulationen aufgeführt.

6.1.1 Prozentuale Verteilung* der Zellpopulationen in Bezug auf die Altersgruppen

Der prozentuale Anteil der T-Zellen ($CD3^+$) an der Gesamtzahl der Lymphozyten war in jeder Altersgruppe jeweils größer als der Anteil der B-Zellen ($CD3^-CD19^+$) oder der Anteil der NK-Zellen ($CD3^-CD16^+CD56^+$). Bei den T-Zell-Subpopulationen überwiegen prozentual die T-Helferzellen ($CD3^+CD4^+$) im Vergleich mit den zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+CD8^+$). Die naiven T-Zellen ($CD3^+CD45RA^+$) überwiegen im Vergleich mit den T-Gedächtniszellen ($CD3^+CD45RO^+$). Es kommt in den beiden letztgenannten Fällen mit zunehmendem Alter zu einer Annäherung der jeweiligen prozentualen Werte (Abbildung 6.1.1 A und B). Des Weiteren zeigt sich in allen Altersgruppen, dass der überwiegende Anteil der T-Zellen ($CD3^+$) auf seiner Oberfläche den T-Zellrezeptor, bestehend aus einer α - und β -Kette, exprimiert ($CD3^+TCR\alpha\beta^+$).

Zwischen den Altersgruppen zeigen sich prozentual keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Anteil der T-Zellen ($CD3^+$) an der Gesamtzahl der Lymphozyten sowie in Bezug auf den Anteil der Expression des T-Zellrezeptors bestehend aus einer γ - und δ -Kette ($CD3^+TCR\gamma\delta^+$) bei den $CD3$ positiven Zellen und bezüglich des Anteils der Lymphozyten (gesamt) an den Leukozyten (gesamt).

**Anmerkung: Die Prozentwerte der Lymphozyten (gesamt) beziehen sich hier auf deren Anteil an den Leukozyten (gesamt), die prozentualen Werte der T-Zellen ($CD3^+$ Zellen), B-Zellen und NK-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, naiven T-Zellen, T-Gedächtniszellen sowie bei den Zellen, die $TCR\alpha\beta$, $TCR\gamma\delta$ oder $HLA DR^+$ exprimieren, stehen die Werte in Bezug zu den $CD3^+$ Zellen (gesamt).*

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen in Bezug auf folgende Subpopulationen (Details siehe Tabelle 6.1.1):

- Zunahme des prozentualen Anteils* der zytotoxischen T-Zellen, der T-Gedächtniszellen sowie der natürlichen Killerzellen mit steigendem Alter
- Abnahme des prozentualen Anteils* der T-Helferzellen, der naiven T-Zellen sowie der B-Zellen mit zunehmendem Alter (Siehe Abbildung 6.1.1 A, B und C).

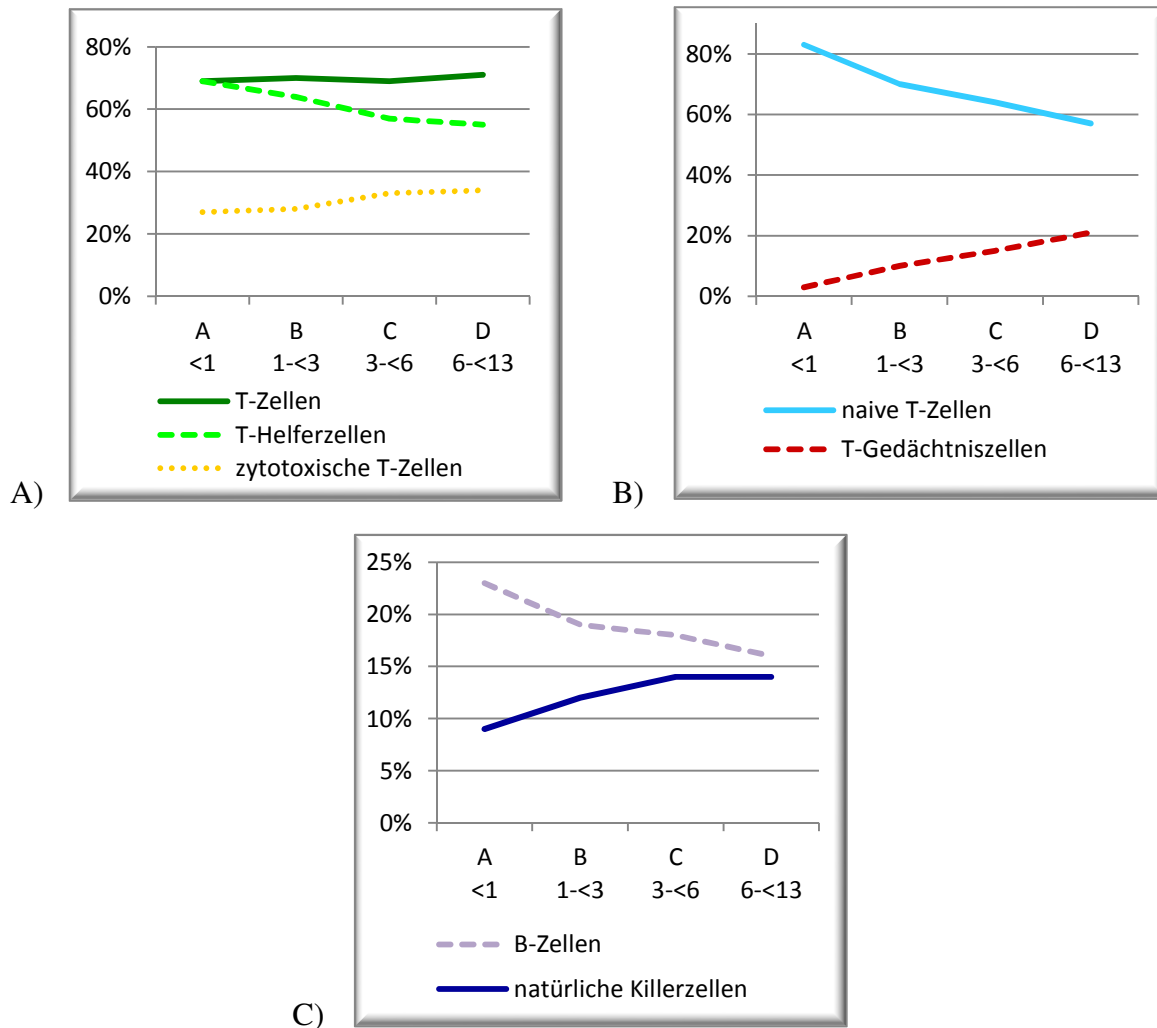


Abb. 6.1.1 Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung* der Zellpopulationen in Bezug auf die Altersgruppen

- A)** Konstanz des Anteils der CD3⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten sowie Annäherung zwischen den Anteilen der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen
- B)** Annäherung zwischen den Anteilen der naiven T-Zellen und der T-Gedächtniszellen
- C)** Abnahme des Anteils der B-Zellen sowie Zunahme des Anteils der natürlichen Killerzellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten

*Anmerkung: Die Prozentwerte beziehen sich bei den T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen auf deren jeweiligen Anteil an den Lymphozyten (gesamt). Bei den T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen beziehen sich die prozentualen Werte auf deren Anteil an den T-Zellen (gesamt).

Ergebnisse

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils an der Gesamtzahl der CD3 positiven Zellen bei den T-Zellen mit T-Zellrezeptor bestehend aus einer α - und β -Kette von $94\pm 0.7\%$ auf $88\pm 0.6\%$ sowie bei den aktivierten T-Zellen (HLA DR⁺) von $12\pm 1.2\%$ auf $6\pm 0.9\%$ zwischen der Altersgruppe der <1Jährigen und der Altersgruppe der 6- <13Jährigen.

Altersgruppen (Jahre)	A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
Lymphozyten (%)	40 \pm 2.3 (36-45)	46 \pm 2.4 (41-51)	46 \pm 2.3 (41-50)	47 \pm 1.9 (43-51)	n.s.
CD3⁺ (%) T-Zellen	69 \pm 1.0 (66-71)	70 \pm 1.0 (68-72)	69 \pm 1.0 (67-71)	71 \pm 0.8 (70-73)	n.s.
CD3⁺ CD4⁺ (%) T-Helferzellen	69 \pm 1.3 (66-71)	64 \pm 1.3 (61-66)	57 \pm 1.2 (55-60)	55 \pm 1.0 (53-57)	p<0.0001
CD3⁺ CD8⁺ (%) zytotoxische T-Zellen	27 \pm 1.2 (24-29)	28 \pm 1.2 (26-31)	33 \pm 1.1 (31-35)	34 \pm 0.9 (32-36)	p<0.0001
CD45RA⁺ CD45RO⁻ (%) naive T-Zellen	83 \pm 1.8 (79-86)	70 \pm 1.8 (66-73)	64 \pm 1.7 (61-68)	57 \pm 1.4 (54-59)	p<0.0001
CD45RO⁺ CD45RA⁻ (%) T-Gedächtniszellen	3 \pm 1.2 (0.7-5)	10 \pm 1.2 (8-13)	15 \pm 1.2 (13-17)	21 \pm 1.0 (19-23)	p<0.0001
TCR $\alpha\beta$ Kette⁺ (%)	94 \pm 0.7 (93-96)	90 \pm 0.7 (89-91)	89 \pm 0.7 (87-90)	88 \pm 0.6 (87-89)	<1 vs. 6- <13: p<0.01
TCR $\gamma\delta$ Kette⁺ (%)	3 \pm 0.5 (2-4)	6 \pm 0.5 (5-7)	5 \pm 0.5 (4-6)	5 \pm 0.4 (4-6)	n.s.
HLA DR⁺ (%) aktivierte CD3 ⁺ T-Zellen	12 \pm 1.2 (9-14)	9 \pm 1.2 (7-11)	7 \pm 1.1 (4-9)	6 \pm 0.9 (4-8)	<1 vs. 6- <13: p<0.01
CD3⁻ CD19⁺ (%) B-Zellen	23 \pm 0.9 (22-25)	19 \pm 0.8 (18-21)	18 \pm 0.8 (16-20)	16 \pm 0.7 (14-17)	p<0.001
CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ (%) natürliche Killerzellen	9 \pm 0.8 (7-10)	12 \pm 0.8 (10-13)	14 \pm 0.8 (12-15)	14 \pm 0.6 (12-15)	p<0.0001**

Tab. 6.1.1 Ergebnisse der Oberflächenantigenmarkierung in Prozent(%)*** mit Bezeichnung der zugehörigen Zellen

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Der Vergleich der Prozentzahlen der natürlichen Killerzellen zwischen der Altersgruppe der 3- <6 Jährigen und der der 6- <13Jährigen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

***Die Prozentwerte der Lymphozyten (gesamt) beziehen sich hier auf deren Anteil an den Leukozyten (gesamt), die prozentualen Werte der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, naiven T-Zellen, T-Gedächtniszellen sowie bei den Zellen, die TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ oder HLA DR⁺ exprimieren, stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺ Zellen (gesamt).

Ergebnisse

6.1.2 Verteilung der Zellpopulationen in absoluten Zahlen in Bezug auf die Altersgruppen

Im zweiten Schritt erfolgte eine Analyse der Verteilung der Zellpopulationen im Hinblick auf ihren absoluten Anteil im Blut (Anzahl/ μl) (Details siehe Tabelle 6.1.2). Es zeigt sich erwartungsgemäß analog zur prozentualen Verteilung eine signifikante Zunahme der absoluten Zahlen der zytotoxischen T-Zellen, der T-Gedächtniszellen sowie der natürlichen Killerzellen. Dementsprechend offenbart sich bei dem Vergleich der absoluten Werte zwischen der Altersgruppe der <1Jährigen und der der 6- <13Jährigen, eine Zunahme der zytotoxischen T-Zellen um das 1.9-fache, der T-Gedächtniszellen um das 9-fache und der natürlichen Killerzellen um das 2.1-fache (Siehe Abbildung 6.1.2).

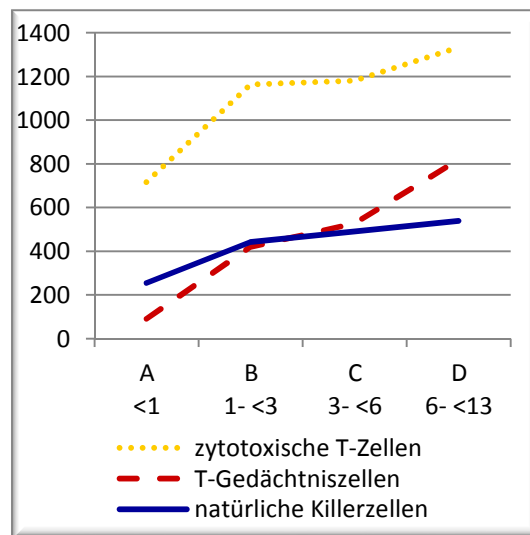


Abb. 6.1.2 Darstellung der Zunahme der Mittelwerte der absoluten Zahlen: der relative Anstieg der T-Gedächtniszellen ist am größten

Altersgruppen (Jahre)	A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
Leukozyten (μl)	8000 \pm 500 (7100-8900)	8800 \pm 500 (7800-9700)	8300 \pm 500 (7300-9200)	8500 \pm 400 (7700-9200)	n.s.
Lymphozyten (μl)	3246 \pm 298 (2658-3836)	4112 \pm 313 (3495-4729)	3678 \pm 298 (3088-4267)	3929 \pm 249 (3439-4419)	n.s.
CD3⁺ (μl) T-Zellen	1849 \pm 212 (1431-2268)	2853 \pm 222 (2415-3292)	2490 \pm 212 (2071-2908)	2760 \pm 177 (2412-3108)	<1 vs. 1- <3 und <1 vs. 6- <13: p<0.01

Tab. 6.1.2 Ergebnisse der Oberflächenantigenmarkierung in absoluten Zahlen (Zellen pro μl) mit Bezeichnung der zugehörigen Zellen

Ergebnisse

Altersgruppen (Jahre)	A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3⁺ CD4⁺ (/μl) T-Helferzellen	1895±191 (1517-2272)	2527±200 (2131-2922)	2061±191 (1684-2438)	2153±159 (1839-2467)	n.s.
CD3⁺ CD8⁺ (/μl) zytotoxische T-Zellen	716±105 (508-924)	1163±110 (945-1381)	1181±105 (973-1389)	1333±88 (1160-1506)	p<0.01**
CD45RA⁺ CD45RO⁻ (/μl) naive T-Zellen	2247±222 (1809-2686)	2826±233 (2367-3286)	2258±222 (1819-2697)	2236±185 (1971-2601)	n.s.
CD45RO⁺ CD45RA⁻ (/μl) T-Gedächtniszellen	91±75 (16-238)	421±78 (266-576)	527±75 (379-675)	819±62 (696-942)	p<0.001
TCR αβ Kette⁺ (/μl)	2531±290 (1959-3103)	3590±304 (2990-4190)	2876±290 (2304-3449)	3206±242 (2730-3682)	n.s.
TCR γδ Kette⁺ (/μl)	87±26 (35-139)	246±28 (191-300)	162±26 (114-218)	159±22 (116-202)	p<0.001
HLA DR⁺ (/μl) aktivierte CD3 ⁺ T-Zellen	318±54 (211-425)	320±57 (208-433)	244±54 (137-351)	237±45 (148-326)	n.s.
CD3⁻ CD19⁺ (/μl) B-Zellen	658±72 (516-800)	772±75 (624-921)	650±72 (508-792)	628±60 (510-746)	n.s.
CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ (/μl) natürliche Killerzellen	255±48 (160-349)	443±50 (343-542)	491±48 (396-586)	539±40 (460-618)	p<0.01

Tab. 6.1.2 Ergebnisse der Oberflächenantigenmarkierung in absoluten Zahlen (Zellen pro μl) mit Bezeichnung der zugehörigen Zellen (Fortsetzung)

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Der Vergleich der absoluten Zahlen der zytotoxischen T-Zellen zwischen der Altersgruppe der 1- <3Jährigen und der der 3- <6Jährigen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Entsprechend dem Vergleich der prozentualen Anteile überwiegen auch bei der Betrachtung der absoluten Zahlen in jeder Altersgruppe die T-Helferzellen im Vergleich mit den zytotoxischen T-Zellen und die naiven T-Zellen überwiegen im Vergleich mit den T-Gedächtniszellen. Es kommt in beiden Fällen mit zunehmendem Alter ebenfalls zu einer Annäherung der jeweiligen absoluten Werte.

Zusammenfassend lässt sich somit, in Bezug auf die T-Zellen, sowohl eine altersabhängige Zunahme der CD8 positiven T-Zellen und daraus resultierend eine Abnahme der relativen Verteilung von CD4 positiven T-Zellen zu CD8 positiven T-Zellen, der sog. CD4/CD8-Ratio,

feststellen. Diese Rate liegt in der Gruppe der <1Jährigen bei etwa 2.6:1 verglichen mit einem Verhältnis von 1.6:1 in der Gruppe der 6- <13Jährigen. Der Pool an T-Gedächtniszellen nimmt mit dem Alter zu. Zusätzlich findet mit steigendem Alter eine Zunahme der B-Zellen und eine Abnahme der natürlichen Killerzellen statt.

6.1.3 Vergleich der Ergebnisse des Immunstatus zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern

Im Vergleich zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern, können im Hinblick auf die Expression der untersuchten Oberflächenmarker, bei den betrachteten T-Zellpopulationen (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD45RA⁺, CD3⁺CD45RO⁺, CD3⁺TCRαβ⁺, CD3⁺TCRγδ⁺, CD3⁺HLA DR⁺), den B-Zellen (CD3⁻CD19⁺) und den natürlichen Killerzellen (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

6.2 Zytokinexpression

Bei der Analyse der intrazellulären Zytokinexpression ist es durch die gleichzeitige Antikörpermarkierung von Zelloberflächenantigenen (z.B. CD3 bei T-Zellen) und intrazellulären Antigenen (der intrazellulären Zytokine) einer einzelnen Zelle möglich, die Zytokinexpression einer bestimmten Zelle zuzuordnen (Details siehe Kapitel 5 Abschnitt 5.3). Dieses Vorgehen ermöglicht es, Vergleiche in Bezug auf die Expression der jeweiligen Zytokine durch die einzelnen betrachteten Zellpopulationen sowie zwischen den Altersgruppen anzustellen. Des Weiteren kann eine genauere Betrachtung des Verhältnisses von IFNγ, einem klassischen TH1-Zytokin, zu IL4, einem klassischen TH2-Zytokin, erfolgen. In diesem Zusammenhang kann der potentielle Einfluss des Faktors Stillen auf die Expression dieser Zytokine sowie die daraus resultierende mögliche Verschiebung des IFNγ/IL4-Verhältnisses analysiert werden.

6.2.1 Expression der einzelnen Zytokine in Bezug auf die Altersgruppen und das Kriterium Stillen

6.2.1.1 IL2

Die IL2 Expression wurde analysiert in der Gesamtheit der CD3⁺ **T-Zellen** sowie in den Subpopulationen der **naiven T-Zellen** und der **T-Gedächtniszellen** (Details siehe Tabelle 6.2.1.1). Die Anzahl an **T-Zellen**, die in der Lage sind IL2 zu produzieren, weist einen deutlichen altersabhängigen Anstieg auf. Signifikant ist die Zunahme des prozentualen Anteils jedoch nur zwischen der Altersgruppe der <1Jährigen und der der 6- <13Jährigen. Bei der Betracht-

Ergebnisse

ung der absoluten Zahlen an IL2 produzierenden T-Zellen ist zwischen allen Altersgruppen ein signifikanter Anstieg des Ausmaßes der IL2 Expression mit dem zunehmenden Alter der Kinder zu verzeichnen. In jeder einzelnen Altersgruppe findet sich der größte prozentuale Anteil an IL2 produzierenden Zellen bei den **naiven T-Zellen**. Dieser Anteil bleibt zudem mit zunehmendem Alter relativ konstant. Bei den **T-Gedächtniszellen** manifestiert sich ein signifikanter, altersabhängiger Anstieg des prozentualen Anteils an Zellen mit der Fähigkeit zur Expression von IL2. In der Altersgruppe der 6- <13Jährigen beträgt dieser mit $8.0 \pm 0.5\%$ knapp das 5.7-fache des Anteils an IL2 produzierenden Zellen, der in der Altersgruppe der <1Jährigen feststellbar ist. Der relative Anstieg ist damit bei den T-Gedächtniszellen im Vergleich mit allen anderen betrachteten Zellpopulationen am größten.

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3 ⁺ IL2 ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro µl	577±108 (364-791)	707±113 (484-930)	830±108 (616- 1042)	1148±90 (970- 1325)	p<0.001
	prozentualer Anteil (%)	20±2.2 (16-24)	19±2.3 (14-23)	23±2.2 (18-27)	28±1.8 (24-32)	<1 vs. 6-13: p<0.01
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ IL2 ⁺ naive T-Zellen (%)		17.4±1.9 (14-21)	16.3±2.0 (12-20)	18.3±1.9 (14-22)	21.1±1.6 (18-24)	n.s.
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL2 ⁺ T-Gedächtniszellen (%)		1.4±0.6 (0.1-2.6)	3.9±0.7 (2.6-5.2)	5.3±0.6 (4.1-6.5)	8.0±0.5 (6.9-9.0)	p<0.001

Tab. 6.2.1.1 Absolute Anzahl IL2 exprimierender T-Zellen pro µl sowie prozentuale Anteile IL2 exprimierender Zellen in Prozent (%)**

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Die Prozentwerte der CD3⁺IL2⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den naiven T-Zellen und den T-Gedächtniszellen stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺IL2⁺ T-Zellen (gesamt).

Im Hinblick auf die Expression von IL2 durch die betrachteten Zellpopulationen lassen sich in sämtlichen Altersgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern feststellen (Daten nicht dargestellt).

6.2.1.2 IFN γ

In den Altersgruppen A, B und C zeigt sich für alle betrachteten Zellpopulationen eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils an IFN γ produzierenden Zellen (Siehe Tabelle 6.2.1.2.1). Dieser Anstieg wird exemplarisch anhand der CD3⁺ **T-Zellen** in Grafik 6.2.1.2 abgebildet.

Ergebnisse

Entsprechend dem altersabhängigen Anstieg des prozentualen Anteils an T-Zellen mit positivem IFN γ -Signal, ist bei der Sichtung der absoluten Zahlen ebenfalls ein signifikanter Anstieg mit zunehmendem Alter der Kinder zu verzeichnen. Bei den **T-Helferzellen** steigt der prozentuale Anteil der Zellen, die IFN γ exprimieren, mit dem Alter signifikant an. T-Helferzellen besitzen, bezogen auf die betrachteten Subpopulationen, bei den Kindern der Altersgruppe der 6- <13 Jährigen den höchsten prozentualen Anteil an Zellen mit positivem IFN γ -Signal. Es zeigt sich bei den **zytotoxischen T-Zellen** ebenfalls eine altersabhängige Zunahme des prozentualen Anteils der IFN γ produzierenden Zellen. **Naive T-Zellen** zeigen bis zur Altersgruppe der 6- <13Jährigen eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils der IFN γ produzierenden Zellen mit dem Alter. Bei den <1Jährigen, den 1- <3Jährigen und den 3- <6Jährigen besitzen naive T-Zellen, bezogen auf die betrachteten Subpopulationen, den höchsten prozentualen Anteil an Zellen mit positivem IFN γ -Signal. Die größte Steigerung des Vermögens IFN γ zu produzieren lässt sich bei den **T-Gedächtniszellen** finden. Mit einer Erhöhung des prozentualen Anteils an Zellen mit positivem IFN γ -Signal um das 5.5-fache zwischen der Altersgruppe der <1 Jährigen und der der 6- <13Jährigen.

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3 ⁺ IFN γ ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro μ l	151 \pm 51 (50-252)	328 \pm 54 (222-434)	497 \pm 51 (395-598)	591 \pm 43 (506-675)	p<0.0001
	prozentualer Anteil (%)	5 \pm 0.8 (3.0-6.0)	8 \pm 0.8 (6.1-10)	13 \pm 0.8 (12-15)	15 \pm 0.6 (13-16)	p<0.0001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ IFN γ ⁺ (%) T-Helferzellen		3.1 \pm 0.6 (2.0-4.2)	5.8 \pm 0.6 (4.6-6.9)	8.7 \pm 0.6 (7.6-9.8)	10.1 \pm 0.5 (9.2-11)	p<0.0001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ IFN γ ⁺ (%) zytotoxische T-Zellen		2.4 \pm 0.5 (1.3-3.5)	4.0 \pm 0.6 (2.9-5.2)	6.6 \pm 0.5 (5.5-7.7)	6.7 \pm 0.5 (5.8-7.6)	p<0.001**
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ IFN γ ⁺ naive T-Zellen (%)		4.0 \pm 0.6 (2.9-5.1)	6.0 \pm 0.6 (4.8-7.2)	9.0 \pm 0.6 (7.9-10)	8.6 \pm 0.5 (7.7-9.6)	p<0.001**
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IFN γ ⁺ T-Gedächtniszellen (%)		1.5 \pm 0.5 (0.4-2.5)	3.7 \pm 0.6 (2.6-4.8)	6.3 \pm 0.5 (5.2-7.3)	8.3 \pm 0.5 (7.4-9.2)	p<0.0001

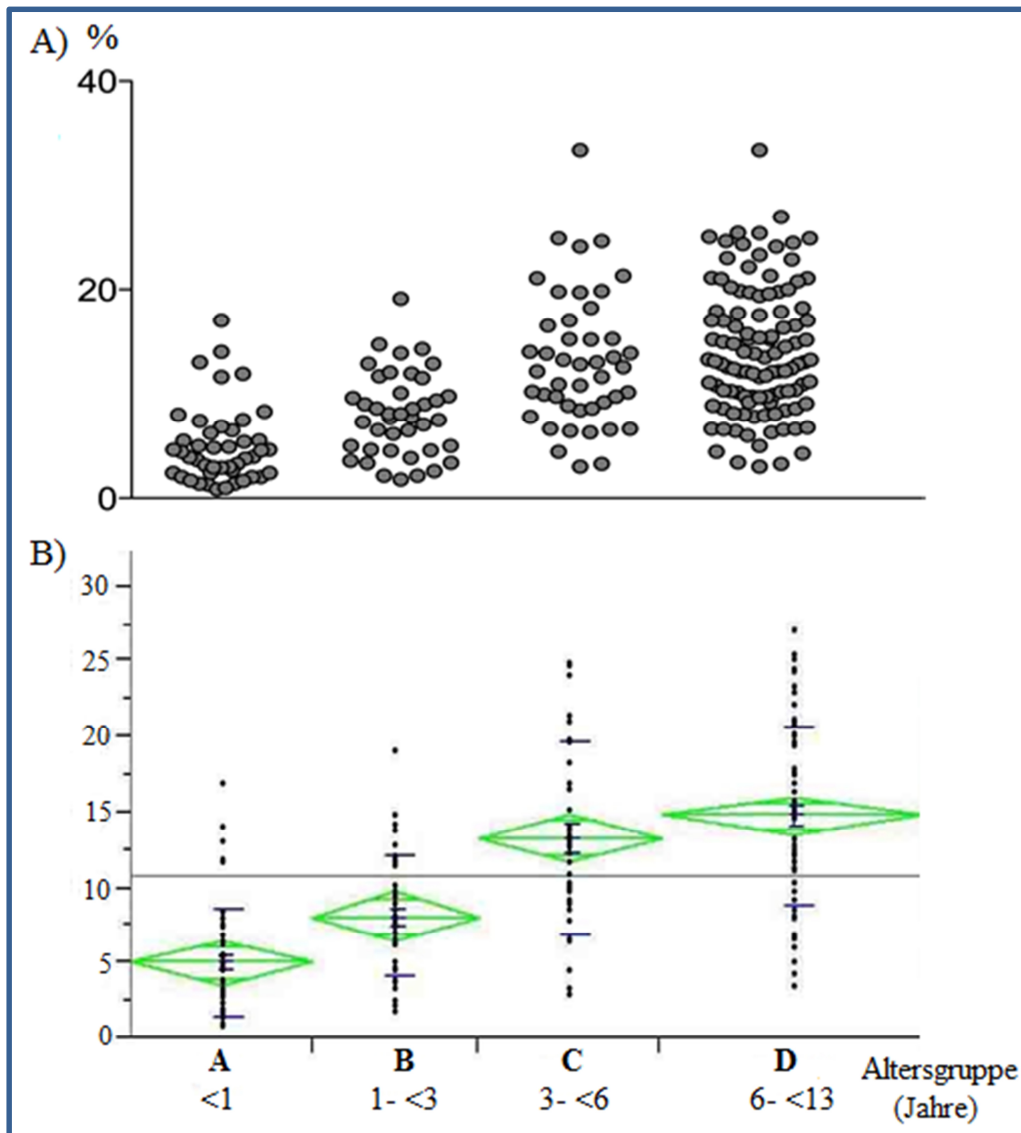
Tab. 6.2.1.2.1 Absolute Anzahl IFN γ exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentuale Anteile IFN γ exprimierender Zellen in Prozent (%)***

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Der Vergleich der Prozentwerte zwischen der Altersgruppe der 3- <6Jährigen und der der 6- <13Jährigen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

***Die Prozentwerte der CD3⁺IFN γ ⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den T-Zell-Subpopulationen stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺IFN γ ⁺ T-Zellen (gesamt).

Ergebnisse



Grafik 6.2.1.2 A) Altersabhängige Expression von IFN γ bezogen auf die Gesamtheit der CD3 positiven T-Zellen in Prozent (%)

B) Dot Plots: IFN γ exemplarisch für die verschiedenen Altersgruppen

Gestillte Kinder der Altersgruppe <1Jahr zeigen eine statistisch signifikant *geringere* Expression von IFN γ durch die T-Gedächtniszellen im Gegensatz zu nicht-gestillten Kindern derselben Altersgruppe. Im Gegensatz dazu, wies die Altersgruppe der 3- <6Jährigen bei den gestillten Kindern einen signifikant *höheren* Anteil an IFN γ produzierenden T-Gedächtniszellen auf. In den beiden anderen Altersgruppen lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern im Hinblick auf die Expression von IFN γ durch die betrachteten Zellpopulationen feststellen.

Stillen			gestillt	nicht-gestillt	Signifikanz
Altersgruppe (Jahre)					
A	<1	CD45RO⁺ CD45RA⁻ IFNγ⁺ (%) T-Gedächtniszellen	1 \pm 0.4	2 \pm 0.4	p<0,05
B	1- <3		3.6 \pm 0.6	3.7 \pm 0.6	n.s.
C	3- <6		7.5 \pm 0.9	4.9 \pm 0.9	p<0.05
D	6- <13		8.2 \pm 0.7	8.4 \pm 0.9	n.s.

Tab. 6.2.1.2.2 Anteil IFN γ exprimierender T-Gedächtniszellen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)*

**Anmerkung:* Die Prozentwerte der IFN γ ⁺ T-Gedächtniszellen beziehen sich auf deren Anteil an den CD3⁺IFN γ ⁺ T-Zellen (gesamt).

6.2.1.3 TNF α

Es zeigt sich ein signifikanter, altersabhängiger Anstieg des prozentualen Anteils der Zellen mit positivem TNF α -Signal bei den T-Zellen (ab der Altersgruppe der 1- <3Jährigen), den T-Helferzellen, den zytotoxischen T-Zellen (Ausnahme bezüglich dieser Population siehe Tabelle 6.2.1.3.1) und den T-Gedächtniszellen. Der prozentuale Anteil an naiven T-Zellen, die TNF α exprimieren, bleibt mit zunehmendem Alter relativ konstant (Siehe Tabelle 6.2.1.3.1). **T-Zellen** mit positivem TNF α -Signal weisen, ab der Altersgruppe der 1- <3 Jährigen, eine deutliche altersabhängige Zunahme ihres prozentualen Anteils auf. Die Anzahl TNF α positiver T-Zellen pro μ l steigt mit zunehmendem Alter ebenfalls signifikant an. Die Fähigkeit der **T-Helferzellen** TNF α zu exprimieren nimmt altersabhängig signifikant zu. Innerhalb der Altersgruppen der 1- <3Jährigen, der 3- <6Jährigen und der 6- <13Jährigen weisen die T-Helferzellen, bezogen auf die betrachteten Subpopulationen, den größten prozentualen Anteil an TNF α positiven Zellen auf. Der prozentuale Anteil der **zytotoxischen Zellen** mit positivem TNF α -Signal nimmt ebenfalls altersabhängig zu. **Naive T-Zellen** weisen keine signifikanten altersbezogenen Unterschiede auf. Ihr prozentualer Anteil an TNF α produzierenden Zellen fällt in der Altersgruppe der <1Jährigen, bezogen auf die betrachteten Subpopulationen, am größten aus. Der deutlichste Anstieg des prozentualen Anteils TNF α produzierender Zellen lässt sich bei den **T-Gedächtniszellen** verzeichnen. Mit einer Steigerung um das 4.7-fache zwischen der Altersgruppe der <1Jährigen und der der 6- <13Jährigen.

Ergebnisse

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3 ⁺ TNFα ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro μl	341±65 (214-469)	372±68 (239-505)	502 ±64 (375-629)	630±54 (524-736)	p<0.01**
	prozentualer Anteil (%)	11±1.2 (9.1-14)	9±1.2 (7.0-12)	13±1.2 (11-15)	16±1.0 (14-18)	p<0.001 (Ausschluss: <1Jährige)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ TNFα ⁺ (%) T-Helferzellen		8.2±1.1 (6.0-10)	11.3±1.2 (8.9-14)	16.0±1.1 (14-18)	18.7±0.9 (17-21)	p<0.001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ TNFα ⁺ (%) zytotoxische T-Zellen		1.5±0.5 (0.7-2.5)	1.5±0.5 (0.6-2.5)	2.8±0.5 (1.8-3.7)	4.0±0.4 (3.3-4.8)	p<0.001**
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ TNFα ⁺ naive T-Zellen (%)		9.1±1.0 (7.1-11)	9.1±1.1 (6.9-11)	11±1.0 (8.8-13)	11±0.9 (9.1-13)	n.s.
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ TNFα ⁺ T-Gedächtniszellen (%)		2.3±0.7 (1.0-3.6)	3.7±0.7 (2.4-5.2)	7.2±0.7 (5.9-8.5)	10.8±0.6 (9.7-12)	p<0.0001

Tab. 6.2.1.3.1 Absolute Anzahl TNFα exprimierender T-Zellen pro μl sowie prozentuale Anteile TNFα exprimierender Zellen in Prozent (%)***

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Der Vergleich der absoluten Zahl bzw. des prozentualen Anteiles zwischen der Altersgruppe der <1Jährigen und der der 1- <3Jährigen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

***Die Prozentwerte der CD3⁺TNFα⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den T-Zell-Subpopulationen stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺TNFα⁺ T-Zellen (gesamt).

Innerhalb der Altersgruppen der <1Jährigen, der 1- <3Jährigen und der 6- <13Jährigen lassen sich für die Expression von TNFα durch die betrachteten Zellpopulationen zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen (Siehe Tabelle 6.2.1.3.2). In der Altersgruppe der 3- <6Jährigen weisen die gestillten Kinder eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Expression von TNFα sowohl in der CD3⁺ Gesamtfraktion als auch in der Subfraktion der zytotoxischen T-Zellen auf als die nicht-gestillten Kinder.

Altersgruppe (Jahre)		Stillen	gestillt	nicht-gestillt	Signifikanz
A	<1	CD3 ⁺ TNFα ⁺ (%) T-Zellen	11.2±2.0	11.7±2.0	n.s.
		CD3 ⁺ CD8 ⁺ TNFα ⁺ (%) zytotoxische T-Zellen	1.1±0.4	1.5±0.4	n.s.

Tab. 6.2.1.3.2 Anteil TNFα exprimierender T-Zellen bzw. zytotoxischer T-Zellen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)*

Stillen			gestillt	nicht-gestillt	Signifikanz
Altersgruppe (Jahre)					
B	1- <3	CD3⁺ TNFα⁺ (%) T-Zellen	9.4 \pm 1.5	8.9 \pm 1.4	n.s.
		CD3⁺ CD8⁺ TNFα⁺ (%) zytotoxische T-Zellen	1.9 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	n.s.
C	3- <6	CD3⁺ TNFα⁺ (%) T-Zellen	3.5 \pm 0.5	2 \pm 0.5	p<0.05
		CD3⁺ CD8⁺ TNFα⁺ (%) zytotoxische T-Zellen	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	p<0.05
D	6- <13	CD3⁺ TNFα⁺ (%) T-Zellen	16.5 \pm 1.2	14.5 \pm 1.5	n.s.
		CD3⁺ CD8⁺ TNFα⁺ (%) zytotoxische T-Zellen	3.4 \pm 0.7	4.9 \pm 0.9	n.s.

Tab. 6.2.1.3.2 Anteil TNF α exprimierender T-Zellen bzw. zytotoxischer T-Zellen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)* (Fortsetzung)

**Anmerkung:* Die Prozentwerte der CD3⁺TNF α ⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den TNF α ⁺ zytotoxischen T-Zellen stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺TNF α ⁺ T-Zellen (gesamt).

6.2.1.4 IL4

Der Umstand, dass IL4 insgesamt nur von einem sehr geringen Anteil der jeweiligen betrachteten Zellpopulationen exprimiert wird, macht eine repräsentative Auswertung anspruchsvoll. Dennoch zeigt sich bei der Betrachtung der Expression von IL4 eine altersabhängige, signifikante Zunahme bei den T-Zellen, insbesondere in den Subpopulationen der T-Helferzellen und der T-Gedächtniszellen (Siehe Tabelle 6.2.1.4.1). Ein signifikanter Anstieg mit dem Alter zeigt sich bei der Gesamtheit der CD3⁺ **T-Zellen** sowohl bei den prozentualen Anteilen als auch bei den absoluten Zahlen der IL4 positiven Zellen. Während **T-Helferzellen** eine signifikante altersabhängige Steigerung des Anteils der Zellen mit positivem IL4-Signal bis auf maximal das 2-fache zeigen, ist die größte altersabhängige Zunahme von IL4 um das 5.5-fache bei den **T-Gedächtniszellen** zu dokumentieren. Bei der Betrachtung der **zytotoxischen T-Zellen** und der **naiven T-Zellen** erweisen sich die altersabhängigen Unterschiede des prozentualen Anteils an Zellen, die IL4 exprimieren, als nicht signifikant.

Ergebnisse

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3 ⁺ IL4 ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro µl	57±14 (29-85)	98±15 (68-127)	96±14 (68-124)	113±14 (29-85)	<1 vs. 6-13: p<0.05
	prozentualer Anteil (%)	1.8±0.2 (1.4-2.2)	2.3±0.24 (1.8-2.8)	2.5±0.23 (2.0-2.9)	2.8±0.2 (2.4-3.2)	p<0.01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL4 ⁺ (%) T-Helferzellen		1.2±0.2 (0.8-1.7)	1.6±0.3 (1.1-2.1)	2.2±0.2 (1.8-2.8)	2.4±0.2 (2.0-2.8)	p<0.01
CD3 ⁺ CD8 ⁺ IL4 ⁺ (%) zytotoxische T-Zellen		0.7±0.1 (0.5-1.0)	0.8±0.1 (0.5-1.0)	1.1±0.1 (0.9-1.4)	1.2±0.1 (0.9-1.4)	n.s.
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ IL4 ⁺ naive T-Zellen (%)		1.8±0.3 (1.2-2.4)	1.9±0.3 (1.3-2.5)	1.9±0.3 (1.3-2.5)	2.5±0.3 (2.0-2.0)	n.s.
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL4 ⁺ T-Gedächtniszellen (%)		0.2±0.1 (0.01-0.3)	0.4±0.1 (0.2-0.6)	0.7±0.1 (0.5-0.8)	1.1±0.1 (1.0-1.2)	p<0.0001

Tab. 6.2.1.4.1 Absolute Anzahl IL4 exprimierender T-Zellen pro µl sowie prozentuale Anteile IL4 exprimierender Zellen in Prozent (%)**

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Die Prozentwerte der CD3⁺IL4⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den T-Zell-Subpopulationen stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺IL4⁺ T-Zellen (gesamt).

Die Gruppe der gestillten Kinder (Altersgruppe <1- <13Jahre; n=105) zeigt im Vergleich zu der Gruppe der nicht-gestillten Kinder (n=91) einen signifikant höheren prozentualen Anteil an IL4 positiven Zellen bei den T-Helferzellen und den T-Gedächtniszellen bezogen auf die Gesamtheit der CD3⁺ T-Zellen. Innerhalb der Altersgruppe der <1Jährigen zeigt sich nur bei den T-Helferzellen ein signifikant höherer Anteil an Zellen mit positivem IL4-Signal im Vergleich mit den nicht-gestillten Kindern der gleichen Altersgruppe. Innerhalb der Altersgruppe der 1- <3Jährigen, der 3- <6Jährigen bzw. der 6- <13Jährigen lässt sich im Hinblick auf die Expression von IL4 durch die betrachteten Zellpopulationen keine statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gestillten und den nicht-gestillten Kindern feststellen (Siehe Tabelle 6.2.1.4.2).

Altersgruppe (Jahre)		Stillen		Signifikanz
		gestillt	nicht-gestillt	
<1- <13	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL4 ⁺ (%) T-Helferzellen	2.2±0.2 (1.9-2.5)	1.7±0.2 (1.3-2.0)	p<0.05
	CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL4 ⁺ (%) T-Gedächtniszellen	0.7±0.1 (0.6-0.9)	0.5±0.1 (0.4-0.7)	p<0.05

Tab. 6.2.1.4.2 Anteil IL4 exprimierender Zellen in der Subpopulation der T-Helferzellen bzw. T-Gedächtniszellen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)*

Ergebnisse

Altersgruppe (Jahre)		Stillen		gestillt	nicht-gestillt	Signifikanz
		gestillt	nicht-gestillt			
A	<1	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL4 ⁺ (%) T-Helferzellen	1.6±0.2 (1.1-2.1)	0.9±0.2 (0.5-1.4)	p<0.05	
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL4 ⁺ (%) T-Gedächtniszellen	0.3±0.03 (0.2-0.4)	0.1±0.04 (0.06-0.2)	n.s.	
B	1- <3	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL4 ⁺ (%) T-Helferzellen	1.7±0.4 (0.9-2.4)	1.5±0.4 (0.8-2.3)	n.s.	
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL4 ⁺ (%) T-Gedächtniszellen	0.4±0.1 (0.3-0.6)	0.3±0.1 (0.2-0.5)	n.s.	
C	3- <6	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL4 ⁺ (%) T-Helferzellen	2.8±0.4 (2.2-3.3)	2.2±0.4 (1.4-3.0)	p=0.06	
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL4 ⁺ (%) T-Gedächtniszellen	0.8±0.2 (0.4-1.1)	0.6±0.2 (0.2-0.9)	n.s.	
D	6- <13	CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL4 ⁺ (%) T-Helferzellen	2.8±0.3 (2.2-3.3)	1.95±0.4 (1.2-2.7)	p=0.05	
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL4 ⁺ (%) T-Gedächtniszellen	1.3±0.1 (1.0-1.5)	0.9±0.2 (0.6-1.2)	p=0.07	

Tab. 6.2.1.4.2 Anteil IL4 exprimierender Zellen in der Subpopulation der T-Helferzellen bzw. T-Gedächtniszellen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)* (Fortsetzung)

*Anmerkung: Die Prozentwerte der CD3⁺IL4⁺ T-Helferzellen und T-Gedächtniszellen beziehen sich auf deren Anteil an den CD3⁺IL4⁺ T-Zellen (gesamt).

6.2.1.5 IL10

Die Expression von IL10 wurde ausschließlich in der Gesamtheit der CD3⁺ **T-Zellen** bestimmt. Die prozentualen Anteile der **T-Zellen** mit positivem IL10-Signal zeigen keine signifikanten altersabhängigen Unterschiede. Im Gegensatz dazu lässt sich bei der Betrachtung der absoluten Zahlen der IL10 produzierenden T-Zellen eine signifikante, altersabhängige Zunahme feststellen (Siehe Tabelle 6.2.1.5).

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3 ⁺ IL10 ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro µl	18±4 (10-27)	25±5 (16-34)	33±4 (24-41)	37±4 (30-44)	p<0.01
	prozentualer Anteil (%)	0.6±0.1 (0.3-0.9)	0.6±0.2 (0.3-0.9)	0.8±0.1 (0.6-1.1)	1.04±0.12 (0.8-1.3)	n.s.

Tab. 6.2.1.5 Absolute Anzahl IL10 exprimierender T-Zellen pro µl sowie prozentualer Anteil IL10 exprimierender T-Zellen in Prozent (%)**

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu.

**Die Prozentwerte der CD3⁺IL10⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt).

Ergebnisse

In Bezug auf die Expression von IL10 durch die betrachtete Zellpopulation lässt sich in sämtlichen Altersgruppen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den gestillten und den nicht-gestillten Kindern feststellen (Daten nicht dargestellt).

6.2.1.6 TGFβ, Ki67 und IL 17

Für TGFβ, Ki67 und IL17 lassen sich keine statistisch signifikanten altersabhängigen Unterschiede der prozentualen Anteile der Zellen mit positivem Signal in den betrachteten Zellpopulationen feststellen (Siehe Tab. 6.2.1.6). Die absoluten Zahlen der T-Zellen mit positivem TGFβ-, Ki67- bzw. IL17-Signal zeigen ebenfalls keine signifikanten altersabhängigen Veränderungen. Folglich konnte für die betreffenden Zytokine keine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Expression von TGFβ fällt auf, dass Kinder der Altersgruppe <1Jahr, gegenüber den anderen Altersgruppen, die Tendenz zu größeren Anteilen TGFβ produzierender Zellen bei den T-Zell-Populationen zeigen.

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
TGFβ						
CD3 ⁺ TGFβ ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro μl	57±13 (32-83)	26±13 (0.1-53)	24±13 (2-49)	27±11 (6-48)	n.s.
	prozentualer Anteil (%)	2.2±0.5 (1.2-3.2)	0.7±0.5 (0.1-1.7)	0.7±0.5 (0.1-1.7)	0.7±0.4 (0.1-1.5)	n.s.
CD3 ⁺ CD4 ⁺ TGFβ ⁺ (%) T-Helferzellen		3.2±0.7 (2.8-4.7)	1.2±0.8 (0.03-2.7)	1.3±0.7 (0.09-2.8)	1.4±0.6 (0.2-2.6)	n.s.
CD3 ⁺ CD8 ⁺ TGFβ ⁺ (%) zytotoxische T-Zellen		1.1±0.4 (0.3-1.9)	0.4±0.4 (0.01-1.2)	0.6±0.4 (0.01-1.3)	0.9±0.3 (0.3-1.6)	n.s.
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ TGFβ ⁺ naive T-Zellen (%)		3.9±0.9 (2.2-5.6)	0.9±0.9 (0.08-2.7)	1.0±0.9 (0.7-2.7)	0.8±0.7 (0.06-2.3)	n.s.
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ TGFβ ⁺ T-Gedächtniszellen (%)		0.5±0.1 (0.3-0.7)	0.4±0.1 (0.2-0.6)	0.5±0.1 (0.2-0.7)	0.4±0.1 (0.2-0.6)	n.s.
Ki67						
CD3 ⁺ Ki67 ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro μl	13±2 (9-17)	16±2 (12-20)	15±2 (10-19)	18±2 (14-21)	n.s.
	prozentualer Anteil (%)	0.5±0.1 (0.4-0.6)	0.4±0.1 (0.3-0.5)	0.4±0.1 (0.3-0.5)	0.5±0.04 (0.4 -0.6)	n.s.

Tab. 6.2.1.6 Absolute Anzahl TGFβ, Ki67 bzw. IL17 exprimierender T-Zellen pro μl sowie prozentuale Anteile TGFβ, Ki67 bzw. IL17 exprimierender Zellen in Prozent (%)**

Ergebnisse

Altersgruppen (Jahre)		A <1	B 1- <3	C 3- <6	D 6- <13	Signifikanz*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Ki67 ⁺ (%) T-Helferzellen		0.9±0.1 (0.6-1.1)	0.9±0.1 (0.6-1.2)	1.2±0.1 (1.1-1.6)	1.1±0.1 (0.9-1.3)	n.s.
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Ki67 ⁺ (%) zytotoxische T-Zellen		0.6±0.3 (0.1-1.2)	0.3±0.4 (0.3-1.0)	0.5±0.3 (0.2-1.2)	0.9±0.3 (0.4-1.5)	n.s.
IL17						
CD3 ⁺ IL17 ⁺ T-Zellen	Zellzahl pro µl	13±3 (7-20)	18±4 (11-25)	23±3 (16-29)	22±3 (16-27)	n.s.
	prozentualer Anteil (%)	0.5±0.1 (0.3-0.7)	0.4±0.1 (0.2-0.6)	0.6±0.1 (0.5-0.8)	0.5±0.1 (0.4-0.7)	n.s.
CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ IL17 ⁺ naive T-Zellen (%)		0.7±0.1 (0.4-0.9)	0.4±0.1 (0.3-0.7)	0.7±0.1 (0.5-0.9)	0.6±0.1 (0.4-0.8)	n.s.
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ IL17 ⁺ T- Gedächtniszellen (%)		0.5±0.1 (0.2-0.7)	0.3±0.1 (0.01-0.5)	0.6±0.1 (0.3-0.9)	0.6±0.1 (0.4-0.9)	n.s.

Tab. 6.2.1.6 Absolute Anzahl TGFβ, Ki67 bzw. IL17 exprimierender T-Zellen pro µl sowie prozentuale Anteile TGFβ, Ki67 bzw. IL17 exprimierender Zellen in Prozent (%)**

Anmerkungen: *Die Signifikanz wurde für alle Gruppen (jede gegen jede) geprüft. Die angegebenen Werte treffen für alle Konstellationen zu, sofern keine weiteren Anmerkungen vorhanden sind.

**Die Prozentwerte der CD3⁺TGFβ⁺, CD3⁺Ki67⁺ bzw. CD3⁺IL17⁺ T-Zellen beziehen sich auf deren Anteil an den Lymphozyten (gesamt), bei den T-Zell-Subpopulationen stehen die Werte in Bezug zu den CD3⁺TGFβ⁺, CD3⁺Ki67⁺ bzw. CD3⁺IL17⁺ T-Zellen (gesamt).

Vergleicht man die Expression der oben genannten Zytokine durch die betrachteten Zellpopulationen zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern, so lässt sich für TGFβ, Ki67 bzw. IL17 kein relevanter statistisch signifikanter Unterschied feststellen (Daten nicht dargestellt).

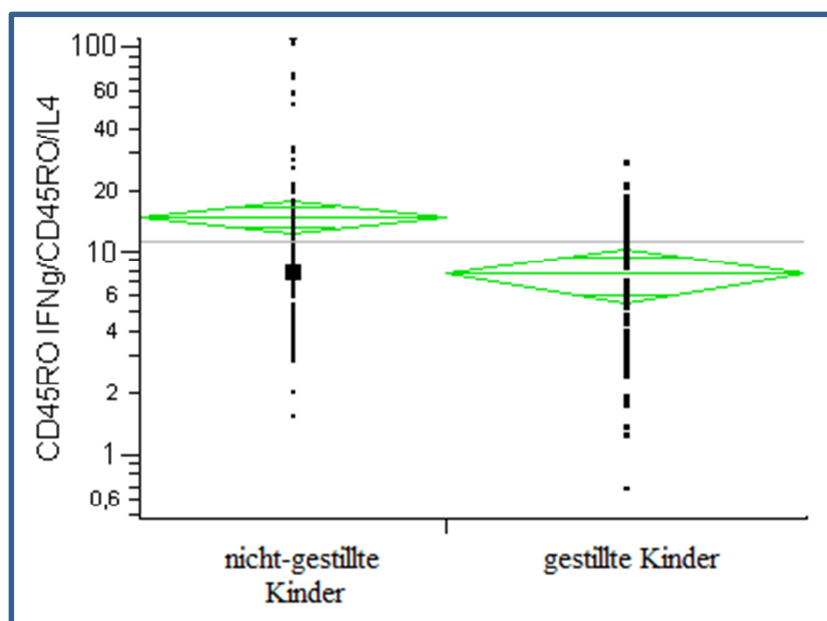
6.2.2 TH1/TH2-Homöostase

Die Auswertung der einzelnen Zytokine im Hinblick auf mögliche Expressionsunterschiede zwischen gestillten und Formula-ernährten Kindern ergab eine höhere IL4-Expression der T-Helferzellen bei gestillten Kindern (Siehe Tabelle 6.2.1.4.2). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob bei nicht-gestillten Kindern möglicherweise die Homöostase zwischen TH1- und TH2-Zytokinen verändert sein könnte. TH1/TH2-Homöostasestörungen werden im Zusammenhang mit der Ätiologie diverser Autoimmunerkrankungen (CHEN ET AL., 2012; STRUNK ET AL., 2000; ROVEDATTI ET AL., 2009), Neoplasien (SHURIN ET AL., 1999) und allergischen Diathesen diskutiert (KAWAMOTO ET AL., 2006). Eine Dysbalance der TH1/TH2-Homöostase in der nicht-gestillten Bevölkerung durch eine andere Immunmaturation könnte eine mögliche Erklärung für die erhöhte Inzidenz autoimmunologischer und allergischer Er-

krankungen in der nicht-gestillten Bevölkerung sein (SILVERS ET AL, 2012; KNIP ET AL, 2011). Um in der untersuchten Studienkohorte das Verhältnis von TH1- zu TH2-getriggerten Immunantworten besser bewerten zu können, wurde daher der Quotient aus $\text{IFN}\gamma$ (%), einem klassischen TH1-Zytokin, und IL4 (%), einem klassischen TH2-Zytokin, berechnet. Dieser $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Quotient soll zur Abschätzung des Gleichgewichts zwischen TH1- und TH2-geprägten Immunantworten dienen, insbesondere in Bezug auf die untersuchten Einflussfaktoren „Stillen“ und „Alter“.

6.2.2.1 Vergleich des $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Quotienten zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern unabhängig von deren Alter

Interessanterweise zeigten sich **altersunabhängig** signifikante Unterschiede des $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Quotienten zwischen den gestillten und den nicht-gestillten Kindern: Gestillte Kinder zeigen einen niedrigeren $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Quotienten als nicht-gestillte Kinder. Das heißt bei den gestillten Kindern lässt sich im Vergleich zu den nicht-gestillten Kindern tendenziell eine *niedrigere* $\text{IFN}\gamma$ - und eine *höhere* IL4-Expression feststellen. Es findet eine Verschiebung des TH1/TH2-Gleichgewichts in Richtung der TH2-Zytokinexpression bei gestillten Kindern statt. Diese Unterschiede zeigten sich insbesondere in der Zytokinexpression der T-Zell-Subfraktionen der T-Helferzellen ($p < 0.01$), der zytotoxischen T-Zellen ($p < 0.001$) und der T-Gedächtniszellen ($p < 0.001$). In der Gesamtzahl der T-Zellen konnte nur eine Tendenz eines erhöhten $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Quotienten dokumentiert werden (Siehe Tabelle 6.2.2.1 und Grafik 6.2.2.1).



Grafik 6.2.2.1 Dot Plot: Vergleich des $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Quotienten in der Subfraktion der T-Gedächtniszellen zwischen den gestillten und nicht-gestillten Kindern

Stillen		gestillt	nicht-gestillt	Signifikanz
Zellpopulation				
CD3⁺ T-Zellen	IFNγ/IL4	6.5 \pm 3.0 (0.5-12)	14 \pm 3.3 (7.4-20)	p=0.09
CD3⁺ CD4⁺ T-Helferzellen		5.1 \pm 1.4 (2.4-7.9)	10 \pm 1.5 (6.9-13)	p<0.01
CD3⁺ CD8⁺ zytotoxische T-Zellen		6.0 \pm 1.8	14.5 \pm 1.9	p<0.001
CD45RO⁺ CD45RA⁻ T-Gedächtniszellen		10 \pm 1.9 (6.3-14)	16 \pm 2.0 (12-20)	p<0.001

Tab. 6.2.2.1 IFN γ /IL4-Quotient in unterschiedlichen Zellpopulationen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern unabhängig von deren Alter

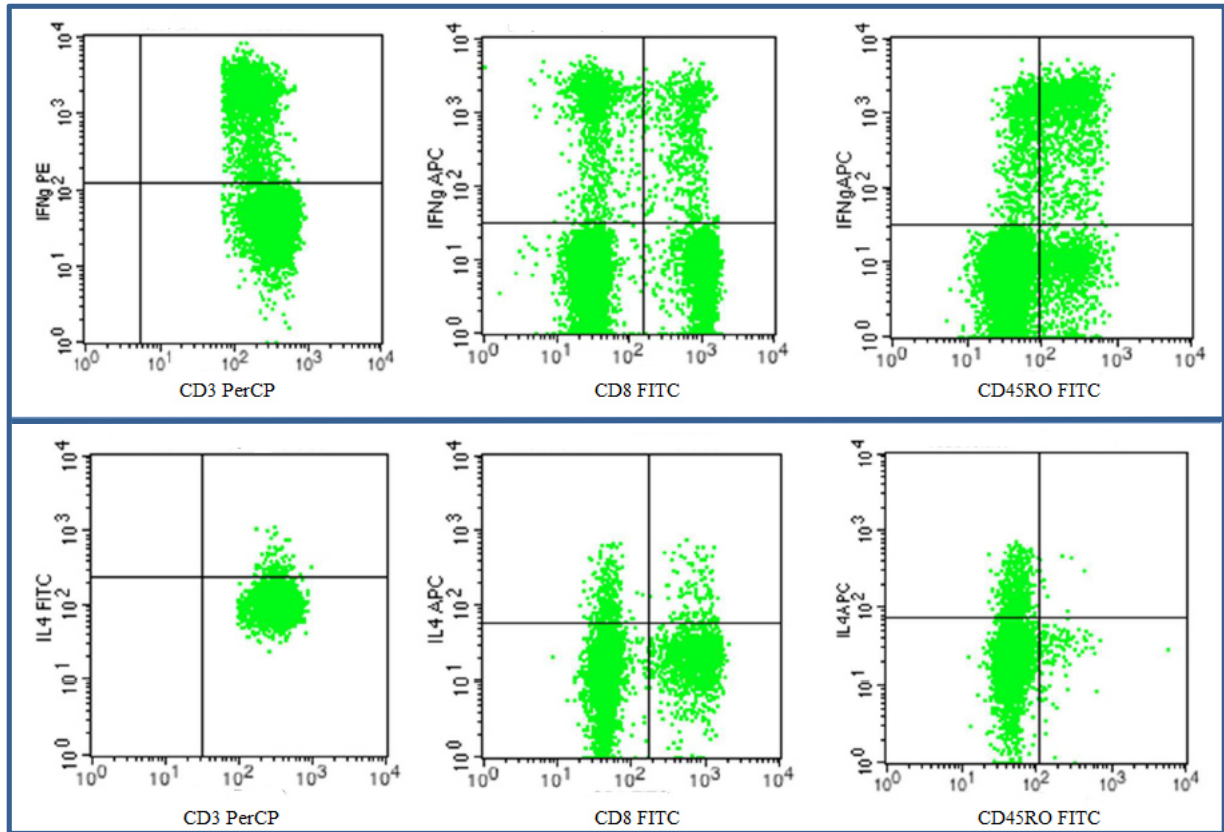
6.2.2.2 Vergleiche des IFN γ /IL4-Quotienten in Bezug auf die Altersgruppen

Interessanterweise, kann der Unterschied des IFN γ /IL4-Quotienten zwischen den gestillten und nicht-gestillten Kindern innerhalb der verschiedenen Altersgruppen (A, B, C und D) bestätigt werden. Während kein signifikanter Unterschied der IFN γ /IL4-Quotienten in der Gruppe der unter Einjährigen besteht, lassen sich bereits in der Altersgruppe B (1-<3 Jahre) signifikante IFN γ /IL4-Quotient-Unterschiede bei der Gesamtfraktion der T-Zellen als auch bei den Subfraktionen der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen dokumentieren, was die These einer Reifung des Immunsystems unterstützt. In den Gruppen C und D (3-<6 und 6-<13Jahre) zeigen sich nur noch die Quotienten aus der Zytokinexpression der T-Gedächtnis- und der T- Helferzellen signifikant, jedoch lässt sich die Tendenz in allen Subfraktionen nachverfolgen.

Dass das Signifikanzniveau in den Gruppen C+D nur noch von den T-Gedächtniszellen erreicht wird, weist auf die Bedeutung der Maturation des Immunsystems hin. Einschränkend muss gesagt werden, dass aufgrund der relativ kleinen Gruppengröße und den zunehmenden externen Einflussgrößen mit steigendem Alter das Signifikanzniveau des IFN γ /IL4-Quotienten wahrscheinlich unterschätzt wird. Daher ist in weiteren Arbeiten geplant, die Anzahl der untersuchten Kinder, insbesondere in den Gruppen C und D zu erhöhen, um diese Beobachtung zu validieren.

Exemplarisch wird die Expression von IFN γ in verschiedenen T-Zell-Subfraktionen bei einem 10 Jahre alten nicht-gestillten Kind und die Expression von IL4 bei einem 4 Monate alten gestillten Kind in Grafik 6.2.2.2 gezeigt.

Ergebnisse



Grafik 6.2.2.2 Exemplarische Darstellung der Expression von IFN γ in verschiedenen T-Zell-Subfraktionen bei einem 10 Jahre alten nicht-gestillten Kind (obere Reihe) und von IL4 bei einem 4 Monate alten gestillten Kind (untere Reihe)

Altersgruppe (Jahre)		Stillen		Signifikanz	
		gestillt	nicht-gestillt		
A	<1	CD3 ⁺ T-Zellen	4.3±0.6	4.4±1.5	n.s.
		CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Helferzellen	2.7±0.6	3.9±1.6	n.s.
		CD3 ⁺ CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen	3.5±0.9	4.9±2.1	n.s.
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ T-Gedächtniszellen	6.8±0.8	9.6±2.1	n.s.
B	1- <3	CD3 ⁺ T-Zellen	4.0±1.4	9.5±7.8	p<0.05
		CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Helferzellen	4.3±1.2	8.9±1.5	p<0.05
		CD3 ⁺ CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen	4.9±2.6	15.8±3.2	p<0.05
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ T-Gedächtniszellen	9.9±1.2	10.9±1.6	n.s.

Tab. 6.2.2.2 IFN γ /IL4-Quotient in den unterschiedlichen Zellpopulationen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern in Bezug auf die verschiedenen Altersgruppen

Altersgruppe (Jahre)		Stillen		Signifikanz	
		gestillt	nicht-gestillt		
C	3- <6	CD3 ⁺ T-Zellen	6.7±5.1	16.7±4.4	n.s.
		CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Helferzellen	5.6±3.5	10.7±3.0	n.s.
		CD3 ⁺ CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen	8.0±3.1	12.9±2.6	n.s.
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ T-Gedächtniszellen	7.6±2.8	15.7±2.4	p<0.05
D	6- <13	CD3 ⁺ T-Zellen	6.8±10.4	15.8±7.7	n.s.
		CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Helferzellen	4.5±2.6	9.5±1.9	p<0.05
		CD3 ⁺ CD8 ⁺ zytotoxische T-Zellen	7.1±5.4	16.6±4.0	n.s.
		CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ T-Gedächtniszellen	7.5±3.6	16.8±2.7	p<0.01

Tab. 6.2.2.2 IFN γ /IL4-Quotient in den unterschiedlichen Zellpopulationen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern in Bezug auf die verschiedenen Altersgruppen (Fortsetzung)

Zusammenfassend konnte mit der hier vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass mit steigendem Alter der Kinder eine Zunahme der Zytokinexpression für IFN γ , TNF α und IL4 bei der Gesamtfraktion der CD3⁺ T-Zellen (sowohl % als auch μ l) besteht.

Im Gegensatz dazu bleibt die Expression von IL2 und TGF β mit dem Alter relativ konstant. Interessanterweise zeigt sich in der Altersgruppe der <1Jährigen eine Tendenz zu einem höheren Anteil an TGF β produzierenden T-Zellen, im Vergleich mit den anderen Altersgruppen.

In Bezug des hier untersuchten Einflussfaktor „Stillen“ auf die Reifung des Immunsystems zeigen sich signifikante Unterschiede in der Expression von IFN γ , TNF α bzw. IL4 in bestimmten T-Zell-Subpopulationen: Gestillte Kinder weisen insbesondere bei der Expression von IL4 durch T-Helferzellen und durch T-Gedächtniszellen deutlich *höhere* Werte auf als nicht-gestillte Kinder (Siehe Tabelle 6.2.1.4.2). Der Anteil IFN γ -produzierender T-Gedächtniszellen ist in der Altersgruppe der <1Jährigen bei den gestillten Kindern deutlich *niedriger* als bei den nicht-gestillten Kindern. Wohingegen in der Altersgruppe der 3- <6Jährigen der prozentuale Anteil der IFN γ produzierenden T-Gedächtniszellen und der TNF α produzierenden

den zytotoxischen Zellen bei den gestillten Kindern deutlich größer ausfällt als bei den nicht-gestillten Kindern.

Diese Unterschiede lassen sich besonders gut darstellen, wenn man exemplarisch für die TH1/TH2-Homöostase den IFN γ /IL4-Quotienten detaillierter analysiert. Zusammenfassend zeigt sich für den IFN γ /IL4-Quotienten, dass ehemals gestillte Kinder ab dem Alter von einem Jahr einen TH2-Shift mit einer Prädominanz des Gleichgewichts in Richtung des TH2-Zytokins IL4 aufweisen. Dieser TH2-Shift lässt sich tendenziell bei allen T-Zellsubpopulationen in den verschiedenen Altersgruppen nachverfolgen, ist jedoch nur in der Expression der T-Gedächtniszellen über den gesamten untersuchten Zeitraum (bis zum 13. Lebensjahr), also weit über die eigentliche Stillzeit hinaus, signifikant nachweisbar. Die Validierung dieser Beobachtung in einem größeren Kollektiv ist geplant.

7. Diskussion

Während in der Laienpresse Vor- und Nachteile des Stillens intensiv diskutiert werden, sind solide wissenschaftliche Arbeiten über den Nutzen und den Einfluss des Stillens in Bezug auf die Reifung des Immunsystems ebenso wie bezüglich des Einflusses auf verschiedene Krankheitsinzidenzen und -verläufe rar. Die wenigen vorhandenen Daten legen jedoch nahe, dass Stillen einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems haben könnte.

Im Hinblick auf Infektionen konnte gezeigt werden, dass Stillen die Inzidenz und Schwere von respiratorischen und gastrointestinalen Infekten bei Neugeborenen und Säuglingen sowohl in entwickelten als auch in sich entwickelnden Ländern reduzieren kann (CHIEN ET AL., 2001). Es konnte zudem festgestellt werden, dass gestillte Kinder ein geringeres Risiko haben eine Otitis media (DUNCAN ET AL., 1993), Diarrhö (CRUZ ET AL., 1988), schwere Infektionen der unteren Atemwege (BACHRACH ET AL., 2003) und eine neonatale Sepsis (ASHRAF ET AL., 1991) zu entwickeln. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Dauer des alleinigen Stillens und der Zeitpunkt der Einführung solider Nahrung die Prävalenz allergischer Atemwegserkrankungen (wie z.B. Asthma bronchiale) positiv beeinflussen kann (WILSON ET AL., 1998). Weitere belegte Auswirkungen des Stillens sind die Senkung der Säuglingssterblichkeit (ARIFEEN ET AL., 2001), das geringere Vorkommen des plötzlichen Kindstods (ALM ET AL., 2002), eine Risikoverminderung für Diabetes Typ 1 (MCKINNEY ET AL., 1999; FIELD, 2005) und Typ 2, für Lymphome, Leukämien, Morbus Hodgkin (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005), für Übergewicht und Adipositas (HORTA ET AL., 2007), für eine Hypercholesterinämie und Allergien (BERGMANN ET AL., 2003; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2005). Der Großteil dieser Daten sind jedoch Einzelfallberichte mit teilweise nur geringer Evidenz.

Stillen ist die natürliche Form der Ernährung eines menschlichen Säuglings. Neben ihrer nutritiven Funktion besitzt Muttermilch vielfältige Faktoren, die von Vorteil für das noch unreife, sich entwickelnde Kind sind. Anhand dieser Faktoren lassen sich zumindest teilweise die oben genannten Beobachtungen erklären. Während einige der enthaltenen bioaktiven Faktoren den Schutz des Kindes auf der Ebene der mechanischen Barrieren, insbesondere im Darmtrakt, gewährleisten, unterstützen andere Faktoren, die immunmodulatorisch oder wachstumsfördernd sind, die Reifung und die Entwicklung des kindlichen Immunsystems. Verschiedene Inhaltsstoffe der Muttermilch tragen gemeinsam zu einer früher verfügbaren effektiven mechanischen Barriere gegen schädliche Mikroorganismen bei.

Die mit der Muttermilch übertragenen Probiotika bilden eine nützliche Mikroflora aus Lactobacillus und Bifidusbakterien bei gestillten Kindern aus (MOUNTZOURIS ET AL., 2002). Oligosaccharide, Proteine, Peptide und Nukleotide tragen zum Wachstum dieser Bakterien bei (MOUNTZOURIS ET AL., 2002), und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und TGF α verbessern die Reifung des Darmepithels und der Zellen im Darmtrakt (DONOVAN ET AL., 1994). Immunologisch aktive Inhaltsstoffe wie sekretorisches IgA gegen mütterliche Darmbakterien ermöglichen eine immunologische Toleranz des Neugeborenen gegenüber diesen Bakterien (HANSON ET AL., 2001). Das ausgereifte, schneller aktivierte und effektivere Immunsystem der Mutter bildet Antikörper gegen pathogene Erreger, denen die Mutter und das Kind ausgesetzt sind. Aktivierte Zellen und Antikörper der Mutter können dann über die Muttermilch auf das Kind übertragen werden und dieses so direkt gegen diese Erreger schützen (GOLDMAN, 1993). Die passive Immunität durch die Übertragung von IgG und IgA und immunmodulatorische Komponenten in der Muttermilch beeinflussen die Immunentwicklung des Kindes (KELLY ET AL., 2000).

Die genannten Effekte, wie die Ausbildung effektiver Barrieren und die passive Immunität, erklären vielleicht die geringen Infektionsraten gestillter Kinder während der Stillzeit, aber sie erklären nicht, warum gestillte Kinder eine geringere Prävalenz allergischer Atemwegserkrankungen sowie eine Risikoverminderung für Diabetes, Lymphome, Leukämien, Morbus Hodgkin und Allergien aufweisen, so dass eine anhaltende Beeinflussung des Immunsystems durch das vormalige Stillen des Kindes mit Muttermilch in der frühen Kindheit bis ins Erwachsenenalter anzunehmen ist.

Eine Hypothese, warum Muttermilch einen so langanhaltenden Einfluss haben kann, ist die Prägung des Immunsystems während der frühen Kindheit, die möglicherweise eine vulnerable Phase darstellt, in der externe Faktoren das Immunsystem beeinflussen und zu Veränderungen führen können. Es gibt bereits Erwägungen, ob die Ernährung in der frühen Kindheit einen Einfluss auf Erkrankungen im späteren Leben, wie Allergien und Asthma, hat (SILVERS ET AL., 2012; WRIGHT ET AL., 2001; KULL ET AL., 2004). Die Nahrung ist in den frühen Lebensjahren vermutlich die bedeutendste Antigenherausforderung, mit der das Kind in Berührung kommt, und könnte somit durchaus einer dieser externen Faktoren sein, die die Entwicklung und Reifung des Immunsystems beeinflussen.

Die Überlegung, welche Bedeutung die Ernährung mit Muttermilch für die immunologische Entwicklung des Kindes haben kann, erfordert notwendigerweise die Kenntnis der physiologischen Veränderungen des Immunsystems während der Kindheit. Da der Fetus sich intrauterin in einer sehr geschützten Umgebung entwickelt, ist die Mehrzahl der Zellen des spezifischen Immunsystems zum Zeitpunkt der Geburt naiv. Nabelschnurblut enthält eine große Anzahl an naiven T-Lymphozyten (CD45RA⁺) verglichen mit T-Gedächtniszellen (CD45RO⁺) (CLEMENT ET AL., 1990). Die Antigen-Expositionen während der Säuglingsphase und der frühen Kindheit sind deshalb essentiell für die Expansion und Prägung der Zellpopulationen der adaptiven Immunität.

Die Differenzierung der T-Helferzellen ist ein zentraler Vorgang, der die Natur des sich entwickelnden Immunsystems definieren kann, weshalb sich viele Studien mit den Mechanismen, die der TH1 bzw. TH2-Prägung zugrunde liegen, beschäftigt haben. Obwohl es fortwährende Versuche gibt, Formula-Nahrungen, zum Beispiel durch den Zusatz von Bifidusbakterien, an die Muttermilch anzupassen, konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass der Faktor Stillen zu einer unterschiedlichen Besiedelung des Darmes mit symbiotischen Bakterien von gestillten gegenüber Formula-ernährten Säuglingen führen kann (MOUNTZOURIS ET AL., 2002) und diese wiederum zum Teil einen Einfluss auf die Entwicklung von durch dendritische Zellen bedingte TH1- und TH2-Antworten ausüben kann (DE JONG ET AL., 2002). In einer früher veröffentlichten Arbeit wurden bereits Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen gestillten und nicht-gestillten Kinder unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung von Atopie, aufgrund der Darmbesiedlung mit unterschiedlichen Bakterien und der daraus resultierenden postnatalen Polarisation der Immunantwort in Richtung einer TH1- oder TH2-Antwort, untersucht (BJÖRKSTÉN, 1999).

Sowohl TH1-spezifische als auch TH2-spezifische Immunantworten werden für eine angemessene Pathogen-Kontrolle (TH1-Antworten für klassische bakterielle und virale Infektionen; TH2-Antworten für Parasiteninfektionen) benötigt und um sicherzustellen, dass die immunologische Aktivierung eingestellt wird, sobald das Pathogen beseitigt ist (AMSEN ET AL., 2009; ABBAS ET AL., 1996; CHAUDHRY ET AL., 2011). Die Idealvorstellung ist ein Gleichgewicht zwischen diesen Antworten und daraus folgend die Fähigkeit des Immunsystems, angemessene Reaktionen zu zeigen, ohne eine exzessive Entzündung oder sogar eine Schädigung des Organismus auszulösen. Ein Ungleichgewicht mit Überwiegen der TH1 oder der TH2-Antwort kann weitreichende Folgen (siehe unten) nach sich ziehen.

Es wird angenommen, dass Stillen sowohl die Inzidenz von Allergien und Asthma reduzieren kann als auch einen Nutzen bei der Risikoverminderung der Entwicklung von vielen Autoimmunerkrankungen hat. Obwohl es innerhalb der Bevölkerung das starke Empfinden gibt, dass Stillen die Inzidenz von Allergien und Asthma reduziert, bleibt die Datenlage in diesem Fall widersprüchlich (VERHASSELT ET AL., 2008; PRESCOTT ET AL., 2008). Es gibt umfangreiches Datenmaterial, das zeigt, dass ausschließliches Stillen die Inzidenz von Autoimmunerkrankungen wie Zöliakie (IVARSSON ET AL., 2000), entzündlichen Darmerkrankungen (KOLETZKO ET AL., 1989; KOLETZKO ET AL., 1991), rheumatoider Arthritis (BRUN ET AL., 1995), multipler Sklerose (PISACANE ET AL., 1994) oder auch Typ1 Diabetes (MCKINNEY ET AL., 1999) reduzieren kann.

Neben dem Umstand, dass viele Autoimmunerkrankungen als typische (durch TH1 vermittelte) TH1-Erkrankung angesehen werden, wie M. Crohn (ROVEDATTI ET AL., 2009) oder Multiple Sklerose (CHEN ET AL., 2012; STRUNK ET AL., 2000) und andererseits Allergien als typische Erkrankungen mit einem Übergewicht an TH2-Zytokinen verstanden werden, scheint es interessant, dass Stillen bis zu einem gewissen Grad einen Schutz vor beiden Erkrankungsformen bieten soll. Da Muttermilch erhebliche Mengen an immunmodulatorischen Zytokinen, wie IL10 (GAROFALO ET AL., 1995) und TGF β (ODDY ET AL., 2010), enthält, ist eine Prägung des Immunsystems durch Stillen gut vorstellbar. Aus diesem Grund war für diese Arbeit vor allem die Untersuchung der verschiedenen Zytokinprofile, insbesondere des typischen TH1-Zytokins IFN γ ebenso wie die des klassischen TH2-Zytokins IL4, sowie deren Verhältnis zueinander, im Vergleich zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern von Interesse.

Die Durchflusszytometrie wurde genutzt, um die allgemeine altersabhängige Entwicklung verschiedener immunologisch relevanter Zellpopulationen, wie T-Helferzellen, zytotoxischer T-Zellen, naiver T-Zellen, T-Gedächtniszellen, aber auch B-Zellen und natürlicher Killerzellen, zu analysieren und um in einem zweiten Schritt die Expression der TH1-Zytokine IL2, TNF α und IFN γ , der TH2-Zytokine IL4 und IL10 sowie des immunmodulatorischen Zytokins TGF β durch verschiedene T-Zell-Subpopulationen abhängig vom Alter und zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern zu untersuchen. Durch die Verwendung der intrazellulären Anfärbung von Zytokinen parallel zur Anfärbung von Oberflächenmarkern kann dabei die Zytokinexpression in definierten T-Zell-Subpopulationen genau bestimmt werden (JUNG ET AL., 1993; PRUSSIN ET AL., 1995). Die verwendeten Methoden wurden bereits zuvor

von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. Verena Wiegering im Stammzelllabor der Universitäts-Kinderklinik zu Würzburg etabliert (WIEGERING, 2009 [1]).

Die Mehrheit der bislang veröffentlichten Studienkonzepte, die die Entwicklung der T-Zell-Subpopulationen und die von diesen produzierten Zytokine mit dem Alter behandeln, umfasst nur kleine Studienpopulationen, welche oftmals auch Erwachsene einschließen (CHIPETA ET AL., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hingegen mit 196 Kindern eine zum einen relativ große und zum anderen eine ausschließlich aus gesunden Kindern bestehende Studienkohorte analysiert. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Zytokinexpression und die Entwicklung der T-Zell-Subpopulationen abhängig vom Alter ist, wurden beide Aspekte in vier unterschiedlichen Altersgruppen zwischen vier Monaten und 12 Jahren und 352 Tagen erfasst. WIEGERING ET AL. (2009 [2]) fanden in einer Studie von 117 gesunden Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 bis 18 Jahren gewisse signifikante Unterschiede der Zytokinexpression von IL2 und IFN γ zwischen Jungen und Mädchen, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf eine ausgewogene Verteilung von Jungen und Mädchen in den vier Altersgruppen geachtet wurde.

Die im Immunstatus erhaltenen Ergebnisse zur Verteilung der T-, B- und NK-Zell-Subpopulationen bestätigen bereits im Vorfeld beschriebene altersabhängige Veränderungen: In Bezug auf die T-Zellen lässt sich eine Abnahme der relativen Verteilung von CD4 positiven T-Zellen zu CD8 positiven T-Zellen, der sog. CD4/CD8-Ratio, feststellen. YANASE ET AL. (1986) fand in einer Studie von 72 gesunden Japanischen Kindern im Alter zwischen zwei Monaten und 13 Jahren ebenfalls einen mit dem Alter zunehmenden prozentualen Anteil der CD8 positiven Zellen sowie einen abnehmenden prozentualen Anteil der CD4 positiven Zellen und daraus resultierend eine abnehmenden CD4/CD8-Ratio mit dem Alter. Dieser Umstand lässt eine allmähliche Reifung der zytotoxischen Immunfunktion mit dem Alter vermuten. Der Pool an T-Gedächtniszellen nimmt mit dem Alter zu. Die Messwerte zeigten eine progressive signifikante Zunahme des prozentualen Anteils sowie der absoluten Anzahl an Zellen mit Expression des CD45RO-Antigens auf ihrer Oberfläche mit dem Alter. Diese Zunahme wurde bereits in vorherigen Studien (CHIPETA ET AL., 1998; WIEGERING ET AL., 2009[2]) beobachtet. Die zunehmende CD45RO-Expression kann dabei als ein Zeichen der Reifung der bei Geburt naiven T-Zellen zu reifen T-Gedächtniszellen mit dem Alter betrachtet werden. Dieser Reifungsprozess steht höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der ausgeprägten Antigen-Exposition nach der Geburt.

Die Messwerte bekräftigen somit einerseits vorherige Studien (YANASE ET AL., 1986; CHIPETA ET AL., 1998; WIEGERING ET AL., 2009[2]) im Hinblick auf eine Zunahme und Reifung der T-Zell-Populationen und belegen andererseits, dass es sich bei der betrachteten Studienkohorte um eine mit den typischen physiologischen Veränderungen übereinstimmende Kohorte bzw. eine „normale Verteilung“ handelt.

In Bezug auf die Entwicklung des Immunsystems mit dem Alter, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Fetus während der Schwangerschaft ein TH2-vorbeherrschtes Individuum ist (CALDER ET AL., 2006). Das Überwiegen der TH2-Zytokine ermöglicht das Überleben des Fetus, da $IFN\gamma$ zytotoxisch für die Plazenta ist und das Überwiegen der TH1-Immunantwort zu einer Plazentaablösung und dem Abgang des Fetus führen kann (BJÖRKSTÉN, 1999; DELESPESE ET AL., 1998). Wenn Zytokine in Nabelschnurblut bestimmt werden, finden sich sehr hohe Spiegel an IL10 und TGF β und niedrige Spiegel von $IFN\gamma$ und TNF α (BELDERBOS ET AL., 2009). In der Auswertung der altersabhängigen Zytokinexpression fiel auf, dass Säuglinge (Altersgruppe <1Jahr), im Vergleich mit älteren Kindern, einen deutlich größeren Anteil an TGF β -produzierenden Zellen bei den T-Zell-Populationen (v.a. bei den naiven T-Zellen) aufwiesen. Dies könnte die erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im fetalen Kreislauf widerspiegeln. Eine hohe Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Fetus kann Immunreaktionen unterdrücken und dadurch die feto-maternale Toleranz unterstützen (TAKAHATA ET AL., 2004).

Des Weiteren ist bekannt, dass eine interindividuelle Diversität der Leistungsfähigkeit gewisse Zytokine zu bilden existiert, welche zumindest zum Teil durch Genvariationen, zum Beispiel Promotor-Polymorphismen in den Genen der jeweiligen Zytokine, reguliert wird (TURNER ET AL., 1997; WESTERNDORP ET AL., 1997). Dies konnte auch durch HALONEN ET AL. (2009) belegt werden, die in ihrer Studie eine ausbleibende TH2-Vorherrschaft bei Neugeborenen, eine familiäre Übereinstimmung für Zytokinpiegel und einen relativ erhalten gebliebenen TH1/TH2-Quotienten in der gesamten Gruppe zeigten.

Neugeborene und Säuglinge entwickeln T-Zellen eines TH0-Phänotyps (naive T-Helferzellen, die IL2 produzieren) und regulatorische T-Zellen, die TGF β produzieren, aber ihnen mangelt es an T-Zellen mit einem typischen TH1 oder TH2-Phänotyp. Ältere Kinder besitzen hingegen, aufgrund der altersabhängigen Zunahme der T-Gedächtniszellen, die Fähigkeit mehr linientypische Zytokine, wie IL4, $IFN\gamma$ und TNF α , zu bilden.

Mit Werten von $<3\%$ in allen Altersgruppen wurden IL4 und IL10 von einem deutlich geringeren Anteil der T-Zellen exprimiert als IL2, IFN γ sowie TNF α . Auch in den betrachteten T-Zell-Subpopulationen fiel der prozentuale Anteil der IL4 und IL10 produzierenden Zellen geringer aus im Vergleich mit der Kapazität an Zellen, die IL2, IFN γ bzw. TNF α exprimierten. Somit lässt sich, unabhängig vom Faktor Stillen, ein starkes Überwiegen der Expression von TH1-Zytokinen durch T-Zell-Populationen innerhalb der jeweiligen Altersgruppen feststellen. Die schwächere Expression von TH2-Zytokinen wurde bereits in anderen gesunden Kollektiven beschrieben (WIEGERING, 2009 [1]).

Um eine Abschätzung des TH1/TH2-Gleichgewichts zu erhalten, wurde innerhalb der untersuchten Subpopulationen aus dem FACS-Datenmaterial ein IFN γ (klassisches TH1-Zytokin)/IL4 (klassisches TH2-Zytokin)-Quotient berechnet. Interessanterweise war in der Studienkohorte, unabhängig vom Faktor Stillen, kein statistisch signifikanter Unterschied der TH1/TH2-Balance zwischen den untersuchten Altersgruppen feststellbar. Dies lässt sich mit den in Kapitel 6 unter Abschnitt 6.2.1.2 und 6.2.1.4 aufgezeigten Ergebnissen, dass sowohl die Expression von IFN γ als auch die Expression von IL4 mit dem Alter zunimmt, in Zusammenhang bringen. Die Expression beider Zytokine nimmt zwar mit dem Alter zu, jedoch bleibt das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Zytokinen mit dem Alter relativ stabil.

Es ist anzunehmen, dass die Regulation von TH1- und TH2-Zytokinen nicht unabhängig ist, dennoch muss es dort einen zentralen Kontrollpunkt geben, um die beiden Antworten auszubalancieren. Kandidaten für Zellen, die das TH1/TH2-Gleichgewicht halten, könnten in der Tat dendritische Zellen (DE JONG ET AL., 2002) sein, die das Vermögen besitzen die T-Zell-Entwicklung nach einer Antigenpräsentation in Richtung TH1, TH2 oder Treg zu polarisieren.

IL2 wird als autokriner T-Zell-Wachstumsfaktor zu einem erheblichen Anteil durch naive T-Zellen produziert. Die IL2-Expression und die Expression des immunmodulatorischen Zytokins TGF β in T-Zellen bleibt nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin mit dem Alter relativ stabil, während ein signifikant positiver Korrelationsindex zwischen Alter und Zytokinexpression für IFN γ , TNF α und IL4 in den CD3 $^+$ T-Zellen gefunden werden konnte, begleitet von einer signifikant zunehmenden Population an T-Gedächtniszellen. Insgesamt lässt sich somit in Bezug auf die meisten Zytokine eine klare Tendenz in Richtung einer ansteigenden Expression mit dem Alter nachweisen. Dies unterstützt Ergebnisse, welche bereits durch Frau Dr. Verena Wiegering und weitere Mitarbeiter der Universitätsklinik Würzburg veröffentlicht wurden (WIEGERING ET AL., 2009 [2]).

Nachdem die Studienkohorte repräsentative, bereits beschriebene altersbedingte Veränderungen aufzeigte, richtete sich der Fokus dieser Untersuchung nun, in einem zweiten Schritt, auf die möglicherweise vorhandenen Unterschiede bei der Expression der analysierten T-Zell-Zytokine zwischen den gestillten und nicht-gestillten Kindern. Insbesondere die Frage, ob der Faktor Stillen einen Einfluss auf das TH1/TH2-Gleichgewicht hat, stand hierbei im Mittelpunkt.

Im Hinblick auf die T-Zell-Subpopulationen (Anzahl und Verhältnisse der Zellen) zeigten sich bei der Betrachtung der gesamten Studienkohorte ungeachtet des Alters zwischen den gestillten und den nicht-gestillten Kindern *keine* signifikanten Unterschiede, so dass der Faktor Stillen keinen detektierbaren Einfluss auf die Anzahl sowie das anteilige Verhältnis der vorhandenen Zellpopulationen zu haben scheint. Interessanterweise zeigten die Messwerte der Zytokinexpression bei den gestillten Kindern jedoch eine erhöhte Expression an IL4 in T-Gedächtniszellen und T-Helferzellen, und es fiel zudem eine gegenüber TH1 verstärkte TH2-Antwort (reduzierte IFN γ /IL4-Ratio) auf. Das reduzierte Verhältnis von IFN γ zu IL4 in der Gruppe der gestillten Kinder (Siehe Kapitel 6 Tabelle 6.2.2.1 und Grafik 6.2.2.1) ergibt sich dabei aus den höheren prozentualen Anteilen der beiden oben genannten Subpopulationen an der IL4-Expression bei den gestillten Kindern. Somit lässt sich eine Verlagerung in Richtung des TH2-Zytokins IL4, ein so genannter TH2-Shift, bei gestillten Kindern nachweisen.

Da bekannt ist, dass nicht nur die Ernährung einen Einfluss auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems hat, sondern auch andere Faktoren wie Impfungen, Nikotinexposition (FELESZKO ET AL., 2006) und allergische Erkrankungen in der Familie (HRDÝ ET AL., 2010) in diesem Zusammenhang diskutiert werden, wurde mittels eines Fragebogens (Abbildung im Anhang) ein möglicherweise vorhandenes Bias weitgehend ausgeschlossen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede auf die oben genannten Faktoren zwischen den Gruppen (Siehe Kapitel 3 Abschnitt 3.4). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die Studienkohorte eine geringfügig höhere Anzahl an Familien mit Allergien in der gestillten Gruppe enthielt, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Die höhere Inzidenz an allergischen Personen in der gestillten Gruppe vermag das Verständnis in der deutschen Bevölkerung widerspiegeln, dass Stillen protektiv gegenüber der Entwicklung von Allergien ist.

Bei dem genaueren Vergleich der gestillten und nicht-gestillten Kinder in den verschiedenen Altersgruppen waren sehr interessante Unterschiede in den Zytokinmustern zwischen den

beiden Gruppen feststellbar: Säuglinge (Altersgruppe <1Jahr), die gestillt wurden, zeigten eine geringere Expression von $IFN\gamma$ in T-Gedächtniszellen und eine höhere Expression von IL4 in T-Helferzellen. Diese Daten entsprechen nicht der Hypothese, dass Stillen einen TH2-gewichteten allergieanfälligen Phänotyp unterdrückt.

VERHASSELT ET AL. (2010) postulierten in ihrer Arbeit, dass das Stillen durch Toleranzinduktion vor Asthma schützen könnte. Sie konnten in einem Mausmodell beobachten, dass das in der Muttermilch enthaltene TGF β eine äußerst wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion spielt. Vorherige Tierstudien haben gezeigt, dass TGF β in der Lage ist Entzündungen der Darmschleimhaut (PENTILLA ET AL., 2003) und Allergien bei allergieanfälligen Ratten (PENTILLA, 2006) zu verhindern.

Sieht man diese Überlegungen im Kontext mit der Anregung des Immunsystems nicht-gestillter Kinder durch körperfremde Kuhmilchantigene, so ist es durchaus möglich, dass sich ohne die immunsupprimierenden bzw. toleranzinduzierenden Effekte von Muttermilch (durch TGF β , aber auch IL10) eine proinflammatorische TH1-Antwort auf diese Antigene durch das Individuum steigern kann und die Prägung des Immunsystem in Richtung TH1 verstärkt wird.

TGF β positive T-Gedächtniszellen und CD8 positive T-Zellen sind in 1- <3 Jahre alten Formula-ernährten Kindern reduziert (Daten nicht dargestellt), während diese noch immer einen erhöhten $IFN\gamma/IL4$ -Quotient aufweisen, wie er in der Säuglingsgruppe beschrieben wurde. So können Formula-ernährte Kinder eine geringere T-Zell-Regulatorkapazität und eine TH1-vorherrschende Antwort aufweisen.

Die Gruppe, der 3- <6 Jahre alten, gestillten Kinder wies ebenfalls, im Vergleich mit den nicht-gestillten Kindern, eine signifikant verminderte $IFN\gamma/IL4$ -Ratio auf. Zudem hat sich gezeigt, dass Vorschulkinder, die ehemals gestillt worden sind, ein gesteigertes Vermögen besitzen die proinflammatorischen Zytokine $IFN\gamma$ (in T-Gedächtniszellen) und TNF α (in zytotoxischen Zellen) zu bilden. Dies vermag in der Tat erklären, warum gestillte Kinder innerhalb dieser Altersgruppe ein höheres Vermögen besitzen, mit verbreiteten Infektionen der unteren Atemwege und Otitis media fertig zu werden (BACHRACH ET AL., 2003; DUNCAN ET AL., 1993).

Bei der ältesten betrachteten Altersgruppe, den 6- <13 Jahre alten Kindern, war die $IFN\gamma/IL4$ -Ratio, wie sie mittels FACS (T-Gedächtniszellen) bestimmt wurde, bei den Formula-ernährten Kindern erneut höher. Weitere statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht

gezeigt werden. Diese Tatsache kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass es im späteren Leben viele weitere Faktoren gibt, die einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems haben und sich zwischen den Individuen unterscheiden. Zu diesen Faktoren könnten sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Prädispositionen zählen, die in keinem Zusammenhang mit dem Faktor Stillen stehen.

Zusammengefasst zeigte sich in allen Altersgruppen ein signifikanter TH2-Shift bei den gestillten Kindern, der die Hypothese stützen kann, dass Stillen die Inzidenz von TH1-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie Zöliakie (IVARSSON ET AL., 2000), entzündlichen Darmerkrankungen (KOLETZKO ET AL., 1989; KOLETZKO ET AL., 1990), rheumatoider Arthritis (BRUN ET AL., 1995), multipler Sklerose (PISACANE ET AL., 1994) oder auch Typ1 Diabetes (MCKINNEY ET AL., 1999) reduzieren kann. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Muttermilch über den eigentlichen Zeitraum des Stillens hinausreicht und mindestens bis zu einem Alter von 13 Jahren anhält. Eine Prägung des Immunsystems durch die Muttermilch während der frühen Kindheit erscheint deshalb sehr wahrscheinlich. Um die Mechanismen hinter dieser Beobachtung besser verstehen zu können, sind weiterreichende Untersuchungen notwendig.

8. Zusammenfassung

Das Bestreben, den Aufbau, die Funktion sowie die Entwicklung des Immunsystems zu verstehen, steht schon lange Zeit im Zentrum des Interesses vieler Forschungsarbeiten, insbesondere um auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse neue Behandlungsansätze für immunologisch relevante Krankheitsbilder zu entwickeln.

Stillen könnte ein wichtiger Faktor sein, der bei der Entwicklung und Differenzierung von T-Zell-Subpopulationen und Zytokinmustern im Säuglings- und Kindesalter eine bedeutende Rolle spielt.

Die Zielsetzung der hier vorgelegten Promotionsarbeit war es, den potentiellen Effekt des Faktors Stillen auf die Entwicklung, die Verteilung und die Differenzierung von Zellpopulationen sowie die Expression von Zytokinen bei gesunden Kindern zu untersuchen. Dies geschah insbesondere im Hinblick auf einen möglicherweise vorhandenen Shift der relativen Verteilung der TH1- und TH2-Zytokinen, da in retrospektiven Kohortenstudien bereits gezeigt werden konnte, dass gestillte Kinder eine geringere Anfälligkeit gegenüber schwerwiegenden bakteriellen Infektionen (BACHRACH ET AL., 2003) sowie einer verminderten Inzidenz von Autoimmunerkrankungen (KOLETZKO ET AL., 1989; PISACANE ET AL., 1994) aufweisen.

Die Studienkohorte bestand aus 196 gesunden Kindern im Alter zwischen 26 Tagen und 12 Jahren und 352 Tagen. Diese wurde in vier Altersgruppen unterteilt (<1, 1- <3, 3- <6 und 6- <13 Jahre) und mittels eines Fragebogens im Hinblick auf ein möglicherweise vorhandenes Bias bezüglich exogener Einflussfaktoren wie Impfungen, Nikotinexposition (FELESZKO ET AL., 2006) und allergische Erkrankungen in der Familie (HRDÝ ET AL., 2010), die in diesem Zusammenhang diskutiert werden, überprüft. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Alle immunologischen Parameter wurden in peripherem, heparinisiertem Blut ermittelt. Zunächst wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) eine Phänotypisierung, anhand von antikörpermarkierten Oberflächenantigenen der T-, B- und NK-Zellpopulationen („Immunstatus“), durchgeführt. Des Weiteren wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels PMA und Ionomycin stimuliert und die Zytokinsekretion durch Brefeldin blockiert. Durch FACS-Analyse wurde die nach 20-24 stündiger Anregung in der Kultur vorhandene intrazelluläre Zytokinexpression von IL2, IFN γ , TNF α , IL4, IL10, TGF β und

IL17 in den T-Zellpopulationen ermittelt. In einem zweiten Schritt wurde der Quotient aus $\text{IFN}\gamma$ und IL4 berechnet, um das Verhältnis zwischen TH1 und TH2 zu analysieren.

Das Datenmaterial zeigt die Entwicklung der T-Zell-Subpopulationen mit dem Alter. Junge Kinder zeigen eine durch regulatorische T-Zellen (Treg) bzw. TH0-Zellen vorherrschende TGF β und IL2-Expression, während ältere Kinder das gesamte Repertoire an TH1 ($\text{IFN}\gamma$, TNF α) und TH2-Zytokinen (IL4), insbesondere durch T-Gedächtniszellen, exprimieren. Diese Ergebnisse bestätigten bereits zuvor beschriebene – vom Faktor Stillen unabhängige – altersabhängige Veränderungen der Zellpopulationen und der Zytokinexpression. Aus diesem Grund konnte von einer „normalen Verteilung“ der Studienkohorte ausgegangen werden.

Zwischen gestillten und nicht-gestillten Kindern hat sich gezeigt, dass sich die Größe und das Verhältnis der übergeordneten Zellpopulationen (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen) sowie die Reifung der T-Zellen (naive T-Zellen, T-Gedächtniszellen) bezogen auf das Alter nicht unterscheiden. Hingegen zeigt der Faktor Stillen in der Tat einen Einfluss auf die TH1/TH2-Balance. Bei gestillten Kindern lässt sich eine stärkere Gewichtung in Richtung der TH2-Zytokine feststellen (niedrigere $\text{IFN}\gamma/\text{IL4}$ -Ratio), so dass davon auszugehen ist, dass Stillen einen so genannten TH2-Shift induziert. Dieses gegenüber nicht-gestillten Kindern „verschobene“ Gleichgewicht bleibt bis zur Altersgruppe der 6-13 Jährigen konstant. Gestillte Kinder haben zudem, im Vergleich zu Formula-ernährten Kindern, ein höheres Vermögen TH1-Zytokine wie TNF α und $\text{IFN}\gamma$ zwischen dem dritten und sechsten Lebensjahr zu bilden.

Diese Daten entsprechen nicht einem vorherrschenden TH2-Muster und einer Allergiedisposition, aber sie können die geringere Inzidenz von bakteriellen Infektionen im Vorschulalter (TH1-Antworten benötigt) und von TH1-vermittelten Autoimmunerkrankungen bei gestillten Kindern erklären.

Aufgrund der Ergebnisse wird deutlich, dass Muttermilch einen bedeutenden Einfluss auf das Immunsystem hat. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Muttermilchernährung über den eigentlichen Zeitraum des Stillens hinausreicht. Eine Prägung des Immunsystems durch die Muttermilch, während der frühen Kindheit, erscheint deshalb sehr wahrscheinlich. Diese Ergebnisse sollten selbstverständlich durch weiterreichende Studien, die eventuell vorhandene weitere Störgrößen wie genetische Prädispositionen oder auch Umwelttoxine einschließen, verifiziert werden.

Zudem wäre es von Interesse welche in der Muttermilch enthaltene Stoffe zu diesem TH2-Shift beitragen oder ob es sich bei den Einflussfaktoren vielmehr um in der Muttermilch nicht enthaltene Stoffe handelt, die in Formula-Nahrung enthalten sind, wie zum Beispiel Kuhmilchantigene.

Schlussendlich bleibt festzuhalten, dass Muttermilch erwiesene positive Vorteile mit sich bringt, wie geringere Infektionsraten (Atemwegsinfektionen, Otitis media) und eine Risikoverminderung für bestimmte Erkrankungen (Diabetes mellitus Typ1, Morbus Crohn, Multiple Sklerose) im späteren Leben. Die Ergebnisse dieser Arbeit können bestätigen, dass das Stillen mit Muttermilch tatsächlich einen Einfluss auf die Entwicklung des individuellen Immunsystems hat, der auch nach dem Abstillen weiter anhält.

Eine wichtige Rolle kann diese Erkenntnis bei der Beratung werdender Mütter spielen, gerade in Hinblick auf ein gegebenenfalls erhöhtes endogenes familiäres Risiko für beispielsweise Autoimmunerkrankungen. Folgearbeiten sind sicher wünschenswert, um den pathophysiologischen Hintergrund dieser beobachteten Daten besser zu verstehen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BCR	B-cell receptor
bzw.	beziehungsweise
CD	cluster of differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	epidermal growth factor
et al.	et alii
etc.	et cetera
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	major histocompatibility complex
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
n.s.	nicht signifikant
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-A-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RPMI-1640	Kulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
sog.	so genannt
SSC	sideward scatter

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TCR	T-cell receptor
TGF	transforming growth factor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Grafik 1.2.1	Entstehung der zellulären Bestandteile des unspezifischen und des spezifischen Immunsystems	Seite 4
Grafik 1.2.2	Angeborenes bzw. unspezifisches Immunsystem	Seite 5
Grafik 1.2.3	Selektion	Seite 7
Grafik 1.2.4	Erworbenes bzw. spezifisches Immunsystem	Seite 8
Abb. 5.1.1	Exemplarische Darstellung der Ausrichtung der Photodetektoren: hier am Beispiel eines Gerätes, das 3 Fluoreszenzfarben erfassen kann	Seite 26
Abb. 6.1.1	Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Zellpopulationen in Bezug auf die Altersgruppen A) Konstanz des Anteils der CD3 ⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten sowie Annäherung zwischen den prozentualen Anteilen der T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen B) Annäherung zwischen den Anteilen der naiven T-Zellen und der T-Gedächtniszellen C) Abnahme des Anteils der B-Zellen sowie Zunahme des Anteils der natürlichen Killerzellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten	Seite 34
Abb. 6.1.2	Darstellung der Zunahme der Mittelwerte der absoluten Zahlen: der relative Anstieg der T-Gedächtniszellen ist am größten	Seite 36
Grafik 6.2.1.2	A) Altersabhängige Expression von IFN γ bezogen auf die Gesamtheit der CD3 positiven T-Zellen in Prozent (%) B) Dot Plots: IFN γ exemplarisch für die verschiedenen Altersgruppen	Seite 41
Grafik 6.2.2.1	Dot Plot: Vergleich des IFN γ /IL4-Quotienten in der Subfraktion der T-Gedächtniszellen zwischen den gestillten und nicht-gestillten Kindern	Seite 49
Grafik 6.2.2.2	Exemplarische Darstellung der Expression von IFN γ in versch. T- Zell- Subfraktionen bei einem 10 Jahre alten nicht-gestillten Kind (obere Reihe) und von IL4 bei einem 4 Monate alten gestillten Kind (untere Reihe)	Seite 51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.2	Zuordnung der antikörpermarkierten Oberflächenantigene zur Identität der Zellen	Seite 3
Tab. 3.3	Verteilung der gestillten und nicht-gestillten Kinder innerhalb der Altersgruppen	Seite 17
Tab. 3.4.1	Verteilung der Kriterien in Bezug auf die verschiedenen Altersgruppen	Seite 18
Tab. 3.4.2	Verteilung der Kriterien in Bezug auf den Faktor „Stillen“	Seite 18
Tab. 4.2	Geräte	Seite 19
Tab. 4.3	Laborbedarf	Seite 19 (Fortsetzung) Seite 20
Tab. 4.4	Zellkulturmedien und Zusätze	Seite 20
Tab. 4.5.1	Stimulanzen für die Zellkultur der Zytokinfärbung	Seite 21
Tab. 4.6.1	Antikörper für CD-Antigene	Seite 21 (Fortsetzung) Seite 22
Tab. 4.6.2	Antikörper für Zytokine	Seite 22
Tab. 4.6.3	Antikörper für sonstige Antigene	Seite 22
Tab. 4.7	Chemikalien und sonstige Reagenzien	Seite 23
Tab. 5.1.1	Wellenlängen in Bezug auf die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe	Seite 26
Tab. 5.2.1	Färbeprotokoll des Immunstatus	Seite 28
Tab. 5.3.3.1	Protokoll der Zytokinfärbung	Seite 31
Tab. 5.3.3.2	Menge pipettierter Antikörper	Seite 31
Tab. 6.1.1	Ergebnisse der Oberflächenantigenmarkierung in Prozent (%) mit Bezeichnung der zugehörigen Zellen	Seite 35
Tab. 6.1.2	Ergebnisse der Oberflächenantigenmarkierung in absoluten Zahlen (Zellen/ μ l) mit Bezeichnung der zugehörigen Zellen (Fortsetzung)	Seite 36 Seite 37
Tab. 6.2.1.1	Absolute Anzahl IL2 exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentuale Anteile IL2 exprimierender Zellen in Prozent (%)	Seite 39
Tab. 6.2.1.2.1	Absolute Anzahl IFN γ exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentuale Anteile IFN γ exprimierender Zellen in Prozent (%)	Seite 40
Tab. 6.2.1.2.2	Anteil IFN γ exprimierender T-Gedächtniszellen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)	Seite 42

Tabellenverzeichnis

Tab. 6.2.1.3.1	Absolute Anzahl TNF α exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentuale Anteile TNF α exprimierender Zellen in Prozent (%)	Seite 43
Tab. 6.2.1.3.2	Anteil TNF α exprimierender T-Zellen bzw. zytotoxischer T-Zellen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)	Seite 43
	(Fortsetzung)	Seite 44
Tab. 6.2.1.4.1	Absolute Anzahl IL4 exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentuale Anteile IL4 exprimierender Zellen in Prozent (%)	Seite 45
Tab. 6.2.1.4.2	Anteil IL4 exprimierender Zellen in der Subpopulation der T-Helferzellen bzw. T-Gedächtniszellen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern in Prozent (%)	Seite 45
	(Fortsetzung)	Seite 46
Tab. 6.2.1.5	Absolute Anzahl IL10 exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentualer Anteil IL10 exprimierender T-Zellen in Prozent (%)	Seite 46
Tab. 6.2.1.6	Absolute Anzahl TGF β , Ki67 bzw. IL17 exprimierender T-Zellen pro μ l sowie prozentuale Anteile TGF β , Ki67 bzw. IL17 exprimierender Zellen in Prozent (%)	Seite 47
	(Fortsetzung)	Seite 48
Tab. 6.2.2.1	IFN γ /IL4-Quotient in unterschiedlichen Zellpopulationen bei den gestillten und nicht-gestillten Kindern unabhängig von deren Alter	Seite 50
Tab. 6.2.2.2	IFN γ /IL4-Quotient in den unterschiedlichen Zellpopulationen bei gestillten und nicht-gestillten Kindern in Bezug auf die verschiedenen Altersgruppen	Seite 51
	(Fortsetzung)	Seite 52

Literaturverzeichnis

- ABBAS AK, MURPHY KM, SHER A “Functional diversity of helper T lymphocytes.” *Nature* (1996); Vol.383: 787-793
- ALM B, WENNERGREN G, NORVENIUS SG, SKJAERVEN R, LAGERCRANTZ H, HELWEG-LARSEN K, IRGENS LM “Breast feeding and the sudden infant death syndrome in Scandinavia, 1992-95.” *Archives of Disease in Childhood* (2002); Vol.86: 400-402
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS – POLICY STATEMENT: Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* (2005); Vol.115 (Nr.2): 496-506
- AMSEN D, SPILIANAKIS CG, FLAVELL RA “How are T_H1 and T_H2 effector cells made?” *Current Opinion in Immunology* (2009); Vol.21 (Nr.2): 153-160
- ARIFEEN S, BLACK RE, ANTELMAN G, BAQUI A, CAULFIELD L, BECKER S “Exclusive Breastfeeding Reduces Acute Respiratory Infection and Diarrhea Deaths Among Infants in Dhaka Slums.” *Pediatrics* (2001); Vol.108 (Nr.4): 1-8
- ASHRAF RN, JALIL F, ZAMAN S, KARLBERG J, KHAN SR, LINDBLAD BS, HANSON LA “Breast feeding and protection against neonatal sepsis in a high risk population.” *Archives of Disease in Childhood* (1991); Vol.66: 488-490
- BACHRACH VRG, SCHWARZ E, BACHRACH LR “Breastfeeding and the Risk of Hospitalization for Respiratory Disease in Infancy.” *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* (2003); Vol.157: 237-243
- BELDERBOS ME, VAN BLEEK GM, LEVY O, BLANKEN MO, HOUBEN ML, SCHUIJFF L, KIMPEN JLL, BONT L “Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: Low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life.” *Clinical Immunology* (2009); Vol.133 (Nr.2): 228-237
- BERGMANN KE, BERGMANN RL, VON KRIES R, BÖHM O, RICHTER R, DUDENHAUSEN JW, WAHN U “Early determinants of childhood overweight and adiposity in a birth cohort study: role of breast-feeding.” *International Journal of Obesity* (2003); Vol.27: 162-172
- BJÖRKSTÉN B “The intrauterine and postnatal environments.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (1999); Vol.104: 1119-1127
- BÖTTCHER MF, JENMALM MC, BJÖRKSTÉN B “Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants.” *Pediatric Allergy and Immunology* (2003); Vol.14 (Nr.1): 35-41
- BRUN JG, NILSSEN S, KVÅLE G “Breastfeeding, other reproductive factors and rheumatoid arthritis. A prospective study.” *British Journal of Rheumatology* (1995); Vol.34: 542-546
- CALDER PC, KRAUSS-ETSCHMANN S, DE JONG EC, DUPONT C, FRICK JS, FROKIAER H, HEINRICH J, GARN H, KOLETZKO S, LACK G, MATTELIO G, RENZ H, SANGILD PT, SCHREZENMEIR J, STULNIG TM, THYMAN T, WOLD AE, KOLETZKO B “Early nutrition and immunity – progress and perspectives.” *British Journal of Nutrition* (2006); Vol.96: 774-790

- CARBALLIDO JM, FAITH A, CARBALLIDO-PERRIG N, BLASER K “The intensity of T cell receptor engagement determines the cytokine pattern of human allergen-specific T helper cells.” *European Journal of Immunology* (1997); Vol.27 (Nr.2): 515-521
- CHAUDHRY A, SAMSTEIN RM, TREUTING P, LIANG Y, PILS MC, HEINRICH JM, JACK RS, WUNDERLICH FT, BRÜNING JC, MÜLLER W, RUDENSKY AY “Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of TH17 cell-mediated inflammation.” *Immunity* (2011); Vol.34 (Nr.4): 566-578
- CHEN SJ, WANG YL, FAN HC, LO WT, WANG CC, SYTWU HK “Current Status of Immunomodulation and Immunomediated Therapeutic Strategies for Multiple Sclerosis.” *Clinical and Developmental Immunology* (2012): 1-16
- CHIEN PF, HOWIE PW “Breast milk and the risk of opportunistic infection in infancy in industrialized and non-industrialized settings.” *Advances in Nutritional Research* (2001); Vol.10: 69-104
- CHIPETA J, KOMADA Y, ZHANG XL, DEGUCHI T, SUGIYAMA K, AZUMA E, SAKURAI M “CD4⁺ and CD8⁺ Cell Cytokine Profiles in Neonates, Older Children, and Adults: Increasing T Helper Type 1 and T Cytotoxic Type 1 Cell Populations with Age.” *Cellular Immunology* (1998); Vol.183: 149–156
- CLEMENT LT, VINK PE, BRADLEY GE “Novel immunoregulatory functions of phenotypically distinct subpopulations of CD4⁺ cells in the human neonate.” *Journal of Immunology* (1990); Vol.145 (Nr.1): 102-108
- CRUZ JR, GIL L, CANO F, CACERES P, PAREJA G “Breast milk anti-Escherichia coli heat-labile toxin IgA antibodies protect against toxin-induced infantile diarrhea.” *Acta Paediatrica Scandinavica* (1988); Vol.77: 658-662
- DE JONG EC, VIEIRA PL, KALINSKI P, SCHUITEMAKER JHN, TANAKA Y, WIERENGA EA, YAZDANBAKHS M, KAPSENBERG ML “Microbial Compounds Selectively Induce TH1 Cell-Promoting or TH2 Cell-Promoting Dendritic Cells In Vitro with Diverse TH Cell-Polarizing Signals.” *Journal of Immunology* (2002); Vol.168: 1704-1709
- DELESPESE G, YANG LP, OHSHIMA Y, DEMEURE C, SHU U, BYUN DG, SARFATI M “Maturation of human neonatal CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into TH1/TH2 effectors.” *Vaccine* (1998); Vol.16 (Nr.14/15): 1415-1419
- DONOVAN SM, ODLE J “Growth factors in milk as mediators of infant development.” *Annual Review of Nutrition* (1994); Vol.14: 147-167
- DUNCAN B, EY J, HOLBERG CJ, WRIGHT AL, MARTINEZ FD, TAUSSIG LM “Exclusive Breast-Feeding for at Least 4 Months Protects Against Otitis Media.” *Pediatrics* (1993); Vol.91 (Nr.5): 867-872
- FARRAR JD, ASNAGLI H, MURPHY KM “T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription” *Journal of Clinical Investigation* (2002); Vol.109 (Nr.4): 431-435

- FELESZKO W, ZAWADZKA-KRAJEWSKA A, MATYSIAK K, LEWANDOWSKA D, PERADZYŃSKA J, DINH QT, HAMELMANN E, GRONEBERG DA, KULUS M “Parental tobacco smoking is associated with augmented IL-13 secretion in children with allergic asthma.” *Journal of Allergy Clinical Immunology* (2006); Vol.117: 97-102
- FIELD CJ “The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants.” *Journal of Nutrition* (2005); Vol.135: 1-4
- FITCH FW, MCKISIC MD, LANCKI DW, GAJEWSKI TF “Differential regulation of murine T lymphocyte subsets.” *Annual Review of Immunology* (1993); Vol.11: 29-48
- FOSSIEZ F, DJOSSOU O, CHOMARAT P, FLORES-ROMO L, AIT-YAHIA S, MAAT C, PIN JJ, GARRONE P, GARCIA E, SAELAND S, BLANCHARD D, GAILLARD C, MAHAPATRA BD, ROUVIER E, GOLSTEIN P, BAUCHEREAU J, LEBECQUE S “T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines.” *Journal of Experimental Medicine* (1996); Vol.183 (Nr.6): 2593-2603
- GAROFALO R, CHHEDA S, MEI F, PALKOWETZ KH, RUDLOFF HE, SCHMALSTIEG FC, RASSIN DK, GOLDMANN AS “Interleukin-10 in Human Milk.” *Pediatric Research* (1995); Vol.37 (Nr.4): 444-449
- GOLDMAN AS “The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties.” *Pediatric Infectious Disease Journal* (1993); Vol.12 (Nr.8): 664-672
- HALONEN M, LOHMANN IC, STERN DA, SPANGENBERG A, ANDERSON D, MOBLEY S, CIANO K, PECK M, WRIGHT AL “TH1/TH2 Patterns and Balance in Cytokine Production in the Parents and Infants of a Large Birth Cohort.” *Journal of Immunology* (2009); Vol.182: 3285-3293
- HAMOSH M “Bioactive factors in human milk.” *Pediatric Clinics of North America* (2001); Vol.48 (Nr.1): 69-86
- HANSON LÅ, SILFVERDAL SA, STRÖMBÄCK L, ERLING V, ZAMAN S, OLCÉN P, TELEMO E “The immunological role of breast feeding.” *Pediatric Allergy and Immunology* (2001); Vol.12 (Suppl.14): 15-19
- HORTA BL, BAHL R, MARTINES JC, VICTORIA CG “Evidence on the long-term effects of breastfeeding. Systematic reviews and meta-analyses.” *Geneva, Switzerland: WHO Press* (2007)
- HRDÝ J, ZANVIT P, NOVOTNÁ O, KOCOURKOVÁ I, ŽIŽKA J, PROKEŠOVÁ L “Cytokine Expression in Cord Blood Cells of Children of Healthy and Allergic Mothers.” *Folia Microbiologica* (2010); Vol.55 (Nr.5): 515-519
- IVARSSON A, PERSSON L, HERNELL O “Does breastfeeding affect the risk of coeliac disease?” In: Koletzko B, Fleischer Michaelsen K, Hernell O, eds. “Short and long term effects of breastfeeding on child health.” *New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers* (2000): 139-149
- JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M “Immunologie” 5.Auflage ed. *Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag* (2002)

- JUNG T, SCHAUER U, HEUSSER C, NEUMANN C, RIEGER C “Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.” *Journal of Immunological Methods* (1993); Vol.159: 197-207
- KAWAMOTO N, KANEKO H, TAKEMURA M, SEISHIMA M, SAKURAI S, FUKAO T, KASAHARA K, IWASA S, KONDO N “Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children.” *Pediatric Allergy and Immunology* (2006); Vol.17 (Nr.2): 125-133
- KELLY D, COUTTS AGP “Early nutrition and the development of immune function in the neonate.” *Proceedings of the Nutrition Society* (2000); Vol.59: 177–185
- KNIP M, VIRTANEN SM, BECKER D, DUPRÉ J, KRISCHER JP, AKERBLOM HK “Early feeding and risk of type 1 diabetes: experiences from the Trial to Reduce Insulin-dependent diabetes mellitus in the Genetically at Risk (TRIGR)” *American Journal of Clinical Nutrition* (2011); Vol.94 (Nr.6): 1814-1820
- KOLETZKO S, SHERMAN P, COREY M, GRIFFITHS A, SMITH C “Role of infant feeding practices in development of Crohn’s disease in childhood.” *British Medical Journal* (1989); Vol.298: 1617-1618
- KOLETZKO S, GRIFFITHS A, COREY M, SMITH C, SHERMAN P “Infant feeding practices and ulcerative colitis in childhood.” *British Medical Journal* (1991); Vol.302: 1580-1581
- KORN T, OUKKA M, KUCHROO V, BETTELLI E “TH17 cells: Effector T cells with inflammatory properties.” *Seminars in Immunology* (2007); Vol.19 (Nr.6): 362-371
- KUCHROO VK, DAS MP, BROWN JA, RANGER AM, ZAMVIL SS, SOBEL RA, WEINER HL, NABAVI N, GLIMCHER LH “B7-1 and B7-2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the TH1/TH2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy.” *Cell* (1995); Vol.80 (Nr.5): 707-718
- KULL I, ALMQVIST C, LILJA G, PERSHAGEN G, WICKMAN M “Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2004); Vol.114: 755-760
- LAWRENCE RA, LAWRENCE RM “Breastfeeding: A guide for the medical profession.” 6th Edition. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby (2005)
- LI MO, SANJABI S, FLAVELL RA “Transforming Growth Factor- β Controls Development, Homeostasis, and Tolerance of T Cells by Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Mechanisms.” *Immunity* (2006); Vol.25: 455-471
- LÖNNERDAL B “Nutritional and physiologic significance of human milk proteins.” *American Journal of Clinical Nutrition* (2003); Vol.77: 1537-1543
- MALEK TR, BAYER AL “Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2” *Nature Reviews Immunology* (2004); Vol.4: 665-674
- MCKINNEY PA, PARSLow R, GURNEY KA, LAW GR, BODANSKY HJ, WILLIAMS R “Perinatal and Neonatal Determinants of Childhood Type 1 Diabetes. A case-control study in Yorkshire, UK.” *Diabetes Care* (1999); Vol.22 (Nr.6): 928-932



- MOSMANN TR, COFFMAN RL “TH1 AND TH2 CELLS: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties” *Annual Review of Immunology* (1989); Vol.7: 145-173
- MOSMANN TR, SAD S “The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more.” *Immunology Today* (1996); Vol.17 (Nr.3): 138-146
- MOUNTZOURIS KC, MCCARTNEY AL, GIBSON GR “Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation.” *British Journal of Nutrition* (2002); Vol.87: 405-420
- MURPHY KM, OUYANG W, FARRAR JD, YANG J, RANGANATH S, ASNAGLI H, AFKARIAN M, MURPHY TL “Signaling And Transcription In T Helper Development.” *Annual Review of Immunology* (2000); Vol.18: 451-494
- ODDY WH, ROSALES F “A systematic review of the importance of milk TGF- β on immunological outcomes in the infant and young child.” *Pediatric Allergy and Immunology* (2010); Vol.21: 47-59
- PABST HF, SPADY DW, PILARSKI LM, CARSON MM, BEELER JA, KREZOLEK MP “Differential modulation of the immune response by breast- or formula-feeding of infants.” *Acta Paediatrica* (1997); Vol.86 (Nr.12): 1291-1297
- PENTILLA IA, FLESCH IEA, MCCUE AL, POWELL BC, ZHOU FH, READ LC, ZOLA H “Maternal milk regulation of cell infiltration and interleukin 18 in the intestine of suckling rat pups.” *Gut* (2003); Vol.52: 1579-1586
- PENTILLA I “Effects of Transforming Growth Factor-Beta and Formula Feeding on Systemic Immune Responses to Dietary β -Lactoglobulin in Allergy-Prone Rats.” *Pediatric Research* (2006); Vol.59 (Nr.5): 650-655
- PISACANE A, IMPAGLIAZZO N, RUSSO M, VALIANI R, MANDARINI A, FLORIO C, VIVO P “Breastfeeding and multiple sclerosis.” *British Medical Journal* (1994); Vol.308 (6941): 1411-1412
- PRESCOTT SL, SMITH P, TANG M, PALMER DJ, SINN J, HUNTLEY SJ, CORMACK B, HEINE RG, GIBSON RA, MARKRIDES M “The importance of early complementary feeding in the development of oral tolerance: Concerns and controversies.” *Pediatric Allergy and Immunology* (2008); Vol.19 (Nr.5): 375-380
- PRUSSIN C, METCALFE DD “Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies.” *Journal of Immunological Methods* (1995); Vol.188: 117-128
- ROMAGNANI S “Human T_H1 and T_H2 subsets: doubt no more.” *Immunology Today* (1991); Vol.12 (Nr.8): 256-257
- ROVEDATTI L, KUDO T, BIANCHERI P, SARRA M, KNOWLES C, RAMPTON DS, CORAZZA GR, MONTELEONE G, DI SABATINO A, MACDONALD TT “Differential regulation of interleukin-17 and interferon- γ production in inflammatory bowel disease.” *Gut* (2009); Vol.58: 1629-1636

- SACK U, TÁRNOK A, ROTHE G „Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.“ *1. Auflage, Basel, Karger Verlag* (2007)
- SHEARER GM “TH1/TH2 changes in aging.” *Mechanisms of Ageing and Development* (1997); Vol.94: 1-5
- SHURIN MR, LU L, KALINSKI P, STEWART- AKERS AM, LOTZE MT “TH1/TH2 balance in cancer, transplantation and pregnancy.” *Springer Sem. Immunopath.* (1999); Vol.21 (Nr.3): 339-359
- SILVERS KM, FRAMPTON CM, WICKENS K, PATTEMORE PK, INGHAM T, FISHWICK D, CRANE J, TOWN GI, EPTON MJ, ON BEHALF OF THE NEW ZEELAND ASTHMA AND ALLERGY COHORT STUDY GROUP “Breastfeeding Protects against Current Asthma up to 6 Years of Age.” *Journal of Pediatrics* (2012); Vol.160 (Nr.6): 991-996
- STREET NE, MOSMANN TR “Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns.” *FASEB Journal* (1991); Vol.5 (Nr.2): 171-177
- STRUNK T, BUBEL S, MASCHER B, SCHLENKE P, KIRCHNER H, WANDINGER KP “Increased Numbers of CCR5⁺ Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor- α -Secreting T Lymphocytes in Multiple Sclerosis Patients.” *Annals of Neurology* (2000); Vol.47 (Nr.2): 269-273
- SRIVASTAVA MD, SRIVASTAVA A, BROUHARD B, SANETO R, GROH-WARGO S, KUBIT J “Cytokines in human milk.” *Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology* (1996); Vol.93 (Nr.3): 263-287
- TAKAHATA Y, NOMURA A, TAKADA H, OHGA S, FURUNO K, HIKINO S, NAKAYAMA H, SAKAGUCHI S, HARA T “CD25⁺CD4⁺ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naïve phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Experimental Hematology* (2004) Vol.32: 622-629
- TURNER DM, WILLIAMS DM, SANKARAN D, LAZARUS M, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV “An investigation of polymorphism in the Interleukin-10 gene promoter.” *European Journal of Immunogenetics* (1997); Vol.24 (Nr.1): 1-8
- VERHASSELT V, MILCENT V, CAZARETH J, KANDA A, FLEURY S, DOMBROWICZ D, GLAICHENHAUS N, JULIA V “Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma.” *Nature Medicine* (2008); Vol.14 (Nr.2): 170-175
- VERHASSELT V “Neonatal Tolerance under Breastfeeding Influence: The Presence of Allergen and Transforming Growth Factor- β in Breast Milk Protects the Progeny from Allergic Asthma.” *Journal of Pediatrics* (2010); Vol. 156 (Nr.2; Suppl.1): 16-20
- WESTENDORP RGJ, LANGERMANS JAM, HUIZINGA TWJ, VERWEIJ CL, STURK A “Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease.” *Lancet* (1997); Vol.349 (9069): 1912-1913
- [1]WIEGERING V „Immunfunktion unter ALL-Therapie – prospektive Studie an 23 Kindern.“ *Dissertation Universität Würzburg* (2009)
- [2]WIEGERING V, EYRICH M, WUNDER C, GÜNTHER H, SCHLEGEL PG, WINKLER B “Age-related changes in intracellular cytokine expression in healthy children.” *European Cytokine Network* (2009); Vol.20 (Nr.2): 75-80

Literaturverzeichnis

- WILSON AC, FORSYTH JS, GREENE SA, IRVINE L, HAU C, HOWIE PW “Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study.” *British Medical Journal* (1998); Vol.316 (7124): 21-25
- WRIGHT AL, HOLBERG CJ, TAUSSIG LM, MARTINEZ FD “Factors influencing the relation of infant feeding to asthma and recurrent wheeze in childhood.“ *Thorax* (2001); Vol.56: 192-197
- YANASE Y, TANGO T, OKUMURA K, TADA T, KAWASAKI T “Lymphocyte Subsets Identified by Monoclonal Antibodies in Healthy Children.” *Pediatric Research* (1986); Vol.20 (Nr.11): 1147-1151

Fragebogen (Vorderseite):

<p>Universitäts-Kinderklinik Würzburg Pädiatrische Onkologie Pädiatrische Intensivmedizin Direktor: Prof. Dr. Ch. P. Speer</p>		
<h3><u>Fragebogen zur Untersuchung zum Immunmonitoring</u></h3>		
Name des Kindes: _____, geb. _____		
Erkrankung: _____		
SCHWANGERSCHAFT:		
<u>Wurde ihr Kind zum errechneten Termin geboren?</u>		
<input type="checkbox"/> Ja		
<input type="checkbox"/> Frühgeborenes, Schwangerschaftswoche: _____		
ERNÄHRUNG:		
<u>Wurde Ihr Kind gestillt?</u>		
<input type="checkbox"/> Nein, Art der Babynahrung: _____		
<input type="checkbox"/> Voll gestillt weniger als 3 Wochen		
<input type="checkbox"/> Voll gestillt 1-4 Monate		
<input type="checkbox"/> Voll gestillt 4-6 Monate		
<input type="checkbox"/> Voll gestillt länger als 6 Monate (_____ Monate)		
<u>Ernähren Sie ihr Kind vegetarisch? Gibt es irgendwelche Besonderheiten bezüglich der Ernährung?</u>		
<input type="checkbox"/> Ja		
<input type="checkbox"/> Nein		
<input type="checkbox"/> Besonderheiten: _____		
IMPFUNG:		
<u>Ist ihr Kind regulär geimpft?</u>		
<input type="checkbox"/> Ja		
<input type="checkbox"/> Nein, gar nicht		
<input type="checkbox"/> Es fehlen Impfungen; welche? _____ _____		

Danksagung

Die hier vorliegende Dissertation wurde im Stammzell-Labor der Kinderklinik und Poliklinik des Universitätsklinikums der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P.-G. Schlegel angefertigt. Herrn Prof Dr. P.-G. Schlegel, Frau Dr. Beate Winkler und Frau Dr. Verena Wiegering gilt mein besonderer Dank für das interessante Thema dieser Doktorarbeit, für die Möglichkeit experimentell arbeiten zu können und für die Gelegenheit die gewonnenen Ergebnisse zu veröffentlichen.

Für die Möglichkeit an der Universitätskinderklinik zu promovieren, möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. C. P. Speer, dem Direktor der Kinderklinik, herzlich bedanken.

Bei Frau Dr. Verena Wiegering, der Betreuerin meiner Doktorarbeit, möchte ich mich ganz besonders für die Einführung in die Methoden der Laborarbeit, für das Sammeln zahlreicher Blutproben, für die Hingabe mit der Sie sich meiner Doktorarbeit gewidmet hat, für die uneingeschränkte Unterstützung, für ihre Geduld und für den geleisteten Zeitaufwand bedanken – Vielen, vielen Dank!

Den Stationen der Kinderklinik und der Kinderchirurgie danke ich ebenfalls für das Sammeln zahlreicher Blutproben. In diesem Sinne danke ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Thomas Meyer und Herrn Dr. Armin Wiegering. Des Weiteren möchte ich mich bei den Eltern der Kinder bedanken, die ihre Einwilligung zu der Blutentnahme und der Studie gegeben und darüber hinaus durch ihre Antworten im Fragebogen einen wichtigen Beitrag geleistet haben.

Dem Team des Stammzell-Labors möchte ich für die gemeinsame Zeit danken. Es hat mir viel Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten und für kurze Zeit ein bisschen „dazuzugehören“.

Frau Dr. Imme Haubitz möchte ich für Ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danken.

Ein spezieller Dank gilt meinem großen Bruder Steffen Aulenbach – dem diese Arbeit gewidmet ist – er war und ist der wichtigste Einflussfaktor in meinem Leben und viele meiner Wesenszüge, Ansichten, Erfahrungen und Werte wurden durch ihn geprägt. Leider verstarb er 2010 an den Folgen seiner Krebserkrankung und kann diesen bedeutenden Schritt in meinem Leben nicht mehr miterleben. Danke, dass du immer für mich da bist!

Bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, möchte ich mich für die uneingeschränkte Unterstützung bei allem was ich tue, ihr Vertrauen und ihre Liebe bedanken. Vielen Dank.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinem Freund Dominic Ziegler für sein Verständnis, seine Unterstützung und seine Liebe.

Lebenslauf

07.06.1986	geboren in Bad Mergentheim
1992 – 1996	Grundschule, Edelfingen
1996 – 2005	Deutschordens-Gymnasium, Bad Mergentheim
06/2005	Abitur
10/2005 – 04/2008	vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
09-10/2005 und 07-09/2006	Pflegepraktikum in der Abteilung Innere Medizin des Caritas- Krankenhauses, Bad Mergentheim
04/2008	Physikum
04/2008 – 10/2012	klinisches Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius- Maximilians- Universität, Würzburg
08/2009 – 09/2009	Famulatur in der Abteilung Innere Medizin des Spital Saanen, Kanton Bern, Schweiz
09/2009	Beginn der Dissertation bei Professor Dr. P.-G. Schlegel
03/2010 – 04/2010	Famulatur in der Abteilung Kinderchirurgie im Zentrum für Operative Medizin der Universität, Würzburg
08/2010 – 10/2010	Famulatur in der Kinderonkologie und Allgemeinpädiatrie der Universität, Würzburg
08/2011 – 12/2011	PJ-Tertial in der Abteilung Pädiatrie der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
12/2011 – 03/2012	PJ-Tertial in der Abteilung Chirurgie der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
03/2012 – 07/2012	PJ-Tertial in der Abteilung Innere Medizin der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
10-11/2012	Staatsexamen
12/2012 – 07/2014	Fertigstellung der Dissertation
09/2013 bis heute	Assistenzarzt-Stelle in der Medizinischen Klinik II, Leopoldina-Krankenhaus, Schweinfurt