

Aus dem Bereich Transplantations- und Infektionsimmunologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Quantitative, phänotypische und funktionelle Charakterisierung der zellulären Immunität bei Kindern mit Down-Syndrom

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von Justine Lisa Schoch
geb. am 13. Januar 1993 in Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Einleitung.....	9
2.1	Down-Syndrom.....	9
2.1.1	Ätiologie, Symptomatik und Therapie	9
2.2	Immunologische Grundlagen	12
2.2.1	Angeborenes Immunsystem	13
2.2.2	Adaptives Immunsystem	14
2.2.3	Zelluläre Immunantwort: T-Zell-Aktivierung.....	14
2.2.4	Die humorale Immunantwort: B-Zell-Aktivierung	17
2.3	Immundefekte	18
2.4	Autoimmunerkrankungen und Down-Syndrom.....	19
2.5	Infektionen und Down Syndrom	20
2.6	Zielsetzung der Arbeit	21
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Probandenkollektiv	23
3.2	Geräte und Materialien	24
3.3	Antigene und Antikörper.....	26
3.4	Analyse von Zellpopulationen durch Oberflächenfärbung	28
3.4.1	Lymphozytensubpopulationen	28
3.4.2	Phänotypische Analyse und regulatorische T-Zellen	29
3.5	Quantifizierung von Erreger-spezifischen T-Zellen und von T-Helfer-Subpopulationen	30
3.5.1	Stimulation der Zellen	31
3.5.2	Fixierung der Zellen	32
3.5.3	Intrazelluläre Färbung der Zellen	33

3.6	Durchflusszytometrie	34
3.6.1	Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Daten	36
3.7	Quantifizierung von Antikörpern	43
3.7.1	Durchführung	44
3.7.2	Messung und Auswertung am multifunktionellen Plattenleser	44
3.8	Software und statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Studienpopulation.....	46
4.2	Quantitative Analyse von Blutzell-Subpopulationen	47
4.2.1	Veränderte Verteilung der Lymphozytensubpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom	47
4.2.2	Einfluss von Thymektomie auf die T-Zell-Populationen von Kindern mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern.....	49
4.3	Phänotypische Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen.....	51
4.3.1	Erhöhte Expression des Anergimarkers PD1 bei Kindern mit Down-Syndrom..	51
4.3.2	CD27/CD28 Expression in Abhängigkeit des CMV-Serostatus auf T-Zellpopulationen	52
4.4	Funktionelle Charakterisierung der Effektor T Zellen	55
4.4.1	Erhöhte Frequenz reaktiver Effektor T-Zellen nach polyklonaler Stimulation bei Kinder mit Down-Syndrom.....	56
4.4.2	Erhöhte Korrelation von humoraler und zellulärer Immunität gegen CMV und VZV bei Kindern mit Down-Syndrom	60
4.4.3	Keine Unterschiede der Pathogen-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort zwischen Kindern mit Down Syndrom und Kontrollen.....	62
5	Diskussion.....	65
5.1	Kritische Bewertung des Studienkollektivs	66
5.2	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Erwachsene	67

5.3	Relatives Ungleichgewicht zwischen antiinflammatorischer und proinflammatorischer Immunantwort bei Kindern mit Down-Syndrom.....	68
5.4	Thymektomie im Kindesalter hat Folgen für das Immunsystem im weiteren Verlauf	69
5.5	Etablierung einer funktionell und phänotypisch adäquaten Effektor T-Zell Antwort aus einem anergen, lymphozytären Zellpool bei Kindern mit Down-Syndrom.....	71
5.6	Erhöhtes autoimmunes Potential bei Kindern mit Down-Syndrom	75
5.7	Stärken und Limitationen.....	77
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	78
6	Literatur.....	80
7	Abkürzungsverzeichnis.....	89
8	Abbildungsverzeichnis.....	91
9	Tabellenverzeichnis.....	93
10	Publikationen.....	94
10.1	Originalarbeit.....	94
10.2	Kongressbeiträge.....	94
11	Danksagung	95
12	Lebenslauf	96

1 Zusammenfassung

Down Syndrom bei Trisomie 21 ist sowohl mit einer vermehrten Infektionsanfälligkeit als auch mit einer erhöhten Inzidenz Organ-spezifischer Autoimmunerkrankungen assoziiert. Neben anatomischen Besonderheiten wurden bereits Veränderungen in den Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort identifiziert, die mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergehen. Während eine eingeschränkte Funktionalität der B-Zellimmunität und der humoralen Immunantwort bereits gut dokumentiert ist, ist die T-Zellimmunität und deren Funktionalität bei Kindern mit Down-Syndrom erst unzureichend charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, die zelluläre Immunantwort im Hinblick auf die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften sowie die Erreger-spezifische humorale und zelluläre Immunität von Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kindern zu untersuchen.

Hierfür wurden 40 Kinder mit Down-Syndrom und 51 immungesunde Kinder gleichen Alters rekrutiert. Zunächst erfolgte die quantitative Analyse der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie. Neben der Analyse der B-Zellen und natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) lag ein besonderer Schwerpunkt auf der Quantifizierung von T-Zell- und T-Helfer-Subpopulationen. Zudem wurde eine phänotypische und funktionelle Multiparameteranalyse der Effektor T-Zellfunktion nach polyklonaler Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) sowie Antigen-spezifischer Stimulation mit Erregerantigenen (Varizella zoster Virus (VZV), Cytomegalievirus (CMV) und *M. tuberculosis* (Tuberkulin)) durchgeführt. Abschließend wurde die humorale Immunantwort auf die viralen Erreger evaluiert und mit den entsprechenden Daten der zellulären Immunantwort korreliert.

Bei Kindern mit Down-Syndrom war der Anteil an NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten deutlich erhöht, der B-Zell-Anteil dagegen signifikant erniedrigt. Während der Gesamtanteil der T-Zellen keine Unterschiede zu immungesunden Kindern zeigte, waren bei Kindern mit Down-Syndrom interessanterweise prozentual weniger CD4⁺ und mehr CD4⁺CD8⁺ T-Zellen vorhanden. Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen waren ein erhöhter Anteil regulatorischer und T_H17-Zellen sowie eine erhöhte T_H1/T_H2 Ratio messbar. Ein genereller Einfluss von Thymektomie auf die T-Zell-Population ließ sich sowohl bei Kindern mit Down-Syndrom als auch bei Kontrollen nachweisen, während die meisten anderen Unterschiede unabhängig von der

Thymektomie zu beobachten waren. Innerhalb der Lymphozytensubpopulationen wurden die Unterschiede bei Kindern mit Down-Syndrom bei den regulatorischen T-Zellen und T_H2-Zellen durch Thymektomie noch zusätzlich verstärkt.

Als Hinweis auf eine funktionelle Einschränkung wiesen Gesamt-T-Zellen und deren Subpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom eine erhöhte Expression der Anergiemarker PD-1 und CTLA-4 auf. Dennoch zeigte die funktionelle Analyse nach polyklonaler Stimulation lediglich ein leicht verändertes Expressionsprofil der Zytokine IFN- γ , TNF α und IL-2. Dementsprechend zeigten diese Zytokin-produzierenden Effektor CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich der Expression der Anergiemarker keine Unterschiede zu Kontrollkindern. Interessanterweise war jedoch die Frequenz dieser Zytokin-produzierenden Effektor CD4⁺ T-Zellen nach polyklonaler Stimulation signifikant erhöht. Bei Analyse der Pathogen-spezifischen Immunantwort zeigten beide Gruppen eine altersgerechte Durchseuchung mit CMV, VZV und Mykobakterien. Unterschiede bezüglich der Antigen-spezifisch gemessenen Frequenzen reaktiver Zellen konnten nicht festgestellt werden. Alle Kinder mit CMV-spezifischer humoraler Immunität wiesen eine zelluläre Immunität gegen CMV auf. Unter den VZV-IgG positiven Kindern war hingegen der Anteil an detektierbaren VZV-spezifischen T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom höher als bei den Kontrollkindern.

Zusammenfassend zeigen Kinder mit Down Syndrom neben einer generellen verhältnismäßigen Verschiebung von Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen eine erhöhte Expression der Anergiemarker auf den Haupt-T-Zellpopulationen. Neben diesen Anzeichen für eine verminderte Funktionalität auf T-Zellen im Allgemeinen zeigen Effektor T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom ähnliche phänotypischen Eigenschaften und Funktionalität wie die der Kontrollgruppe. Allerdings scheinen Kinder mit Down-Syndrom höhere Effektor T-Zell Frequenzen zu benötigen, um eine Pathogenkontrolle sicherstellen zu können.

Summary

Down syndrome in individuals with Trisomy 21 is associated with an increased susceptibility towards infections as well as with a higher incidence of organ specific autoimmune diseases. Beside abnormalities in anatomical structures, alterations in the components of the innate and adaptive immunity have been identified that lead to an increased susceptibility towards infections. While alterations in B-cell functionality and humoral immune responses are well documented, knowledge on T-cell immunity and functionality of T-cells in children with Down syndrome is still limited. Therefore, the aim of this study was the investigation of the adaptive immune response including pathogen-specific humoral immunity as well as phenotypical and functional features of the cellular immunity of children with Down syndrome in comparison to immunocompetent control children.

40 children with Down syndrome and 51 immunocompetent age-matched controls were recruited. Lymphocytes, T-cell- and T-helper-cell subpopulations were quantitatively analysed from whole blood using flow cytometry. In addition, a multiparameter analysis of effector T-cells was performed after polyclonal stimulation with staphylococcal enterotoxin (SEB) and after antigen-specific stimulation using antigens of varicella zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV) and *M.tuberculosis* (tuberculin). Finally the humoral immune response against the viral antigens was evaluated and correlated with the corresponding data of the cellular immune response.

The proportion of NK-cells within the lymphocytes of children with Down syndrome was significantly increased whereas the percentage of B-cells was decreased. While the total percentage of T-cells showed no differences, children with Down syndrome exhibited lower percentages of CD4⁺ T cells and higher percentages of CD4⁺CD8⁺ T-cells. Within the CD4⁺ T-cell population, a higher percentage of regulatory and T_H17-cells and a higher T_H1/T_H2 ratio was detected. Partial or complete resection of the thymus had a general impact on the T-cell population of both children with Down syndrome and controls, whereas most differences observed between the groups were independent of thymectomy. Interestingly among individuals with Down syndrome, thymectomy had a further increasing effect on regulatory T-cells and Th2-cells.

Bulk T-cell subpopulations such as CD4⁺ T-cell, CD8⁺ T-cell, and regulatory T cells showed a higher expression of the anergy markers PD-1 and CTLA-4 suggesting an impaired functionality of these cells. Interestingly, however, the expression profile of the cytokines IFN- γ , TNF α and IL-2 in polyclonally activated effector T cells was only marginally altered. In addition, unlike on bulk T cells, the expression of anergy markers on effector T-cells of children with Down syndrome did not show any differences to controls. Of note, however, the percentage of polyclonally stimulated effector T-cells was significantly higher in children with Down syndrome. Analysis of pathogen-specific immune responses showed an age-appropriate extent of endemic infections with CMV, VZV and mycobacteria in both groups. CMV-specific cellular and humoral immunity correlated in all children. Among VZV IgG positive children, a higher percentage of VZV-specific T-cell-positive individuals was seen in the Down syndrome group.

In conclusion, besides a general proportional shift of leukocyte and lymphocyte subpopulations, bulk T-cells in children with Down syndrome show an increased expression of anergy markers on major T-cell populations. Despite these signs of functional impairment on T-cells in general, effector T-cells of children with Down syndrome show similar phenotype and functionality as controls. However children with Down syndrome may require higher effector T-cell frequencies to ensure pathogen control.

2 Einleitung

2.1 Down-Syndrom

2.1.1 Ätiologie, Symptomatik und Therapie

Das Down-Syndrom (DS) wurde benannt nach seinem Erstbeschreiber John Langdon-Down, der es 1966 erstmalig als eigenes Syndrom, der „mongoloiden Idiotie“, in seinen Schriften „Beobachtungen einer ethnischen Klassifizierung von Idioten“ beschrieben hatte. Noch lange hielt sich der Begriff „Mongolismus“ zur Beschreibung des Down-Syndroms selbst in der wissenschaftlichen Literatur (CARR1962), welcher auf die typische Facies der Personen mit Down-Syndrom zurückzuführen ist: Ein rundliches Gesicht mit mandelförmigen Augen, die eine gewisse Ähnlichkeit zur mongolischen Rasse aufweisen (**Abb. 1**).

A



B



Abbildung 1. Typische Facies von Kindern mit Trisomie 21. Mandelförmige Augen mit Epikanthus medialis; flache, tiefsitzende Nase; kleine Ohren; muskuläre Hypotonie (offener Mund mit heraushängender Zunge) **A** Säugling mit Down-Syndrom (COLLIER2012) **B** Ein zweijähriges Mädchen mit Down-Syndrom (WEIJERMAN et al. 2010).

Erst 1965 bei der 18. Generalversammlung der Weltgesundheitsorganisation, als sich die teilnehmende mongolische Delegation gegen den Begriff „Mongolismus“ wehrte, wurde angefangen ihn in Veröffentlichungen zu vermeiden. Heute hat sich der Begriff „Down-Syndrom“ als einheitliche Terminologie durchgesetzt. Ursache des Down-Syndroms ist die Trisomie 21, bei welcher es sich um eine Chromosomenaberration handelt, bei der das Chromosom 21 dreimalig vorliegt, der Karyotyp ist dementsprechend (47, XX bzw. XY +21). Es handelt sich heutzutage um die häufigste genetische Chromosomenaberration mit einer Inzidenz von ca. 1:700 - 1:800 Geburten (SHERMAN et al. 2007).

Es werden verschiedene Formen der Trisomie 21 unterschieden:

- 1. Freie Trisomie 21:** Sie entsteht aufgrund einer meiotischen Non-Disjunction und ist die mit einem Anteil von über 95% mit Abstand häufigste Form der Trisomie 21. Es sind alle Körperzellen der Person betroffen.
- 2. Translokationstrisomie 21:** Hierbei handelt es sich um ein dreifach angelegtes Chromosom 21, welches jedoch an ein anderes Chromosom, vorzugsweise 13, 14, 15 oder 22, seltener 21, angelagert ist. Man spricht dabei von einer Translokation des zusätzlich vorhandenen Chromosoms 21.
- 3. Mosaik Trisomie 21:** Eine Mosaik Trisomie 21 entsteht erst nach Teilung der befruchteten Eizelle, und setzt voraus, dass mindestens zwei unabhängige Zelllinien bestehen. Hierfür muss in mindestens einer Zelllinie die Trisomie 21 nachweisbar sein und mindestens eine Zelllinie einen normalen Chromosomensatz aufweisen. Zurückzuführen lässt sich die Mosaik Trisomie 21 nicht auf eine meiotische Non-Disjunction, sondern auf eine mitotische Non-Disjunction. Hierbei lässt sich beobachten, dass der Phänotyp eines Down-Syndroms bei einer Mosaik Trisomie 21 meist deutlich weniger ausgeprägt ist als bei einem als Freie Trisomie 21 oder als Translokationstrisomie 21 diagnostizierten Syndrom.
- 4. Partielle Trisomie 21:** Bei der Partiellen Trisomie 21 liegt das Chromosom 21 zwar wie bei Menschen ohne Chromosomenaberration nur zweimalig vor, jedoch sind Teile eines der beiden Chromosomen verdoppelt, sodass dieses länger als das andere ist. Abhängig von der Länge des verdoppelten Chromosomenabschnitts kommt es zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen des Down-Syndroms. Generell ist diese Form der Trisomie 21 sehr selten und betrifft weltweit nur einige hundert Menschen.

Ein Zusammenhang des Alters der Mutter bei Befruchtung und der Wahrscheinlichkeit ein Kind mit Trisomie 21 zu gebären gilt als bewiesen und steigt ab dem 35. Lebensjahr exponentiell an (MORRIS et al. 2002). Seit der Einführung eines neuen Bluttests als Screeninguntersuchung für eine Schwangerschaft mit Verdacht auf einen Fötus mit Trisomie 21 ist die Rate der durch Amniozentese bestätigten Trisomien stark gestiegen. Nachfolgend kam es auch zu einem nachweisbaren Anstieg an Frauen, welche sich in Folge dieser Diagnose für einen Schwangerschaftsabbruch entschieden haben und es wurden in den letzten Jahren immer weniger Kinder mit Down-Syndrom geboren. Der Bluttest zum Nachweis fetaler Chromosomenabberationen beruht auf der Isolation von fetaler DNA aus mütterlichem Blut und kommt ohne die Punktion von Nabelschnur oder Chorionzotten aus,

wodurch das Risiko der Abortinduktion in der Screeninguntersuchung nicht mehr eingegangen werden muss (CANICK2012). Es ist jedoch festzuhalten, dass die Prävalenz der Trisomie 21 trotz eines Rückgangs neugeborener Säuglinge mit Trisomie 21 in den letzten Jahren stabil blieb. Die sinkende Inzidenzrate für Neugeborene mit Trisomie 21 wird zur Zeit noch durch die steigende Lebenserwartung der Personen mit Down-Syndrom kompensiert, aber eine im Verlauf der nächsten Jahre sinkende Prävalenz ist zu erwarten (GLASSON et al. 2016).

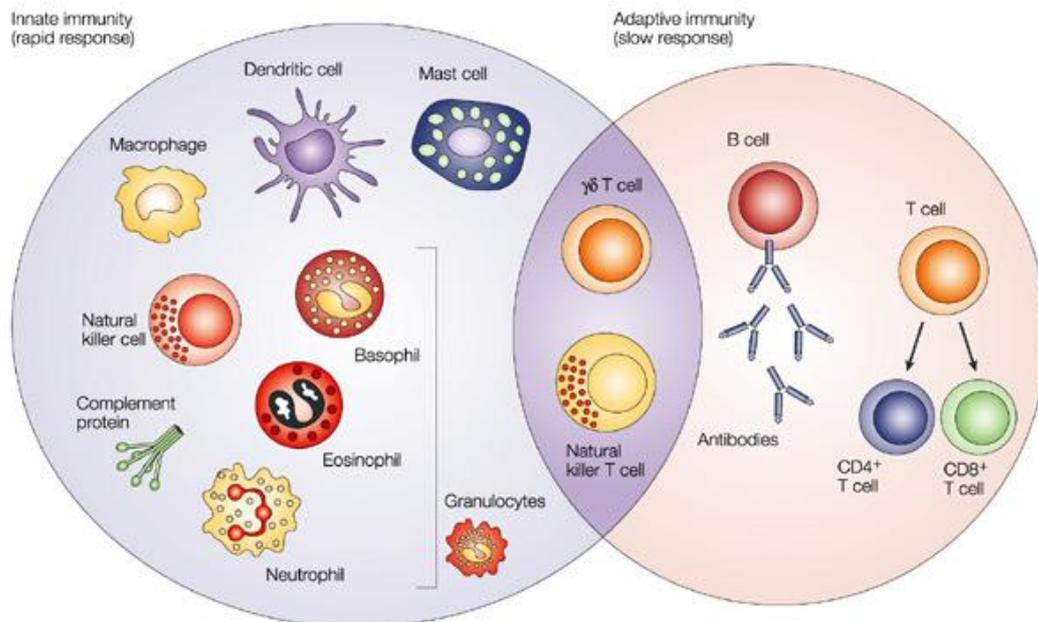
Neben dem zuvor beschriebenen typischen Erscheinungsbild von Kindern mit Down-Syndrom leiden diese Kinder auch an einer erhöhten Inzidenz zu weiteren, mit Trisomie 21 assoziierten Erkrankungen:

Die schwerwiegendste Komorbidität für Kinder mit Down-Syndrom, welche in früheren Zeiten häufig zum Tod innerhalb der ersten Lebensmonate geführt hat, sind die in bis zu 50% der Fälle auftretenden kongenitalen Herzfehler. Seit Einführung der herzchirurgischen Fachdisziplin und der verbesserten medizinischen Behandlung dieser schwerwiegenden Anomalien ist die Lebenserwartung der Kinder mit Down-Syndrom in den letzten Jahrzehnten jedoch enorm gestiegen (ROIZEN et al. 2003, WALKER1991). Neben kongenitalen Herzfehlern leiden Kinder mit Down-Syndrom auch häufiger an Epilepsie und Störungen der Sinneswahrnehmung, sowie an Seh- oder Hörproblemen. Auch eine Intelligenzminderung in variabler Ausprägung mit einem Durchschnitts-IQ von 50 Punkten ist beschrieben (ROIZEN et al. 2003). Besonders auffällig ist die Tatsache, dass Kinder mit Down-Syndrom nicht nur an einer erhöhten Anfälligkeit für rezidivierende meist respiratorische Infektionen mit teilweise schweren Verläufen leiden, sondern auch eine erhöhte Inzidenz für organbezogene Autoimmunerkrankungen (z. B. Diabetes mellitus, M. Basedow, Hashimoto-Thyroiditis) aufweisen (AVERSA et al. 2015, GILLESPIE et al. 2006) und vermehrt hämatologische Malignome entwickeln (MATEOS et al. 2015). Neben den klinischen Anzeichen einer Immundysregulation, dürfen die individuellen anatomischen Gegebenheiten, die mit diesem Syndrom assoziiert sind (nasopharyngeale Fehlbildungen) nicht vernachlässigt werden. Diese bieten durch verminderte mukoziliäre Clearance und eingeschränkte Ventilation ein optimales Milieu für die Vermehrung pathogener Keime und können zur Manifestation von rekurrenten, respiratorischen Infektionen beitragen.

Es lässt sich abschließend festhalten, dass alle diese im Zusammenhang mit Trisomie 21 assoziierten Merkmale individuell unterschiedlich stark phänotypisch ausgeprägt sind und nur bedingt eine Aussage über die Lebensqualität dieser Menschen liefern können. Aus eigener Erfahrung kann ich über die Beobachtung von sozial sehr aufgeschlossenen Kindern berichten, die ein besonderes Maß an Lebensfreude ausstrahlen.

2.2 Immunologische Grundlagen

Obwohl der menschliche Körper täglich mit einer Vielzahl von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten konfrontiert wird, kommt es nur selten zu einer Infektion und Erkrankung. Grund dafür ist unser normalerweise gut funktionierendes Immunsystem, welches uns effektiv vor pathogenen Mikroorganismen schützt. Neben den mechanischen und physiologischen Barrieren, wie z.B. dem Oberflächenepithel unserer Haut, besteht das Immunsystem aus einer Reihe von zellulären und humoralen Immunkomponenten, die einen wirksamen Schutz gegen Infektionen mit Pathogenen bieten. Eingeteilt wird das Immunsystem in die angeborene, unspezifische und die erworbene, spezifische Immunantwort, deren wichtigste Komponenten in **Abb. 2** dargestellt sind.



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 2. Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Auf der linken Seite befinden sich die Komponenten des angeborenen, unspezifischen Immunsystems bestehend aus zellulären Anteilen (Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Mastzellen und NK-Zellen) und humoralen Faktoren (Komplement System). Auf der rechten Seite ist das erworbene, spezifische Immunsystem mit den Lymphozyten (B Zellen und T Zellen) bzw. Antikörpern dargestellt. In der Mitte findet sich eine Schnittmenge von $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen, welche eine Zwischenrolle einnehmen (DRANOFF2004).

2.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene, unspezifische Immunsystem besteht hauptsächlich aus Zellen wie Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile), Makrophagen, Dendritische Zellen, und NK-Zellen, sowie humorale Faktoren wie Akute-Phase Proteine, Lektine, Zytokine und das Komplement-System (**Abb. 2**). Die Aufgabe dieses Systems ist die schnelle Elimination eingedrungener Pathogene, ohne dass eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems erforderlich ist (FEARON et al. 1996). Die erste Abtötung der Erreger erfolgt meist über Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten, welche zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt. Diese hat das Ziel durch Induktion der lokalen Blutgerinnung eine physikalische Barriere gegen Ausbreitung des Erregers herzustellen, weitere Effektormoleküle und -Zellen anzulocken und zudem auch die Heilung des geschädigten Gewebes zu fördern.

2.2.2 Adaptives Immunsystem

Die adaptive Immunantwort wird erst im Laufe des ersten Pathogen-Kontakts erworben und setzt sich im Wesentlichen aus zwei Komponenten zusammen: Der humoralen und zellulären Immunität. Sie zeichnet sich durch eine Antigen-spezifische Immunreaktion und die Möglichkeit der immunologischen Gedächtnisbildung aus. Die agierenden Zellen sind hier in erster Linie Lymphozyten (B- und T Zellen) und die humorale Komponente wird durch Antikörper vermittelt (BORGHESI et al. 2007). Jeder Lymphozyt trägt einen spezifischen, durch zufällige Rekombination verschiedener Gen-Segmente, Hypermutation und Paarung unterschiedlicher Rezeptorketten entstandenen, individuellen Rezeptor auf seiner Oberfläche. Kommt es zur Erkennung eines Pathogens oder dessen Bestandteile durch einen Lymphozyten mit entsprechendem Antigenrezeptor, so wird dieser daraufhin klonal proliferieren und die nachfolgenden Zellen werden sich zu Effektor Zellen und zu Memory-Zellen differenzieren. Effektor Zellen tragen unmittelbar zur Infektabwehr bei, während Memory-Zellen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen schneller und effektiver eine Immunreaktion in Gang setzen können.

2.2.3 Zelluläre Immunantwort: T-Zell-Aktivierung

Naive T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und zirkulieren von dort aus zunächst über das Blut durch die sekundären Lymphorgane bis sie dort spezifisch durch Fremdartigene aktiviert werden (HALL2015). Die T-Zell-vermittelte Immunantwort beruht auf der Erkennung von fremden Antigenen, die auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert werden. Entweder stammen diese Antigene aus einer virusinfizierten Zelle selbst oder sie werden von Antigen-präsentierenden Zellen durch Endozytose aufgenommen und entsprechend prozessiert. Die Präsentation erfolgt in Form von Peptiden durch spezialisierte Glykoproteine der Wirtszelle, die MHC-Moleküle, und wird durch die T-Zelle mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) erkannt. Im Gegensatz zum B-Zell-Rezeptor gibt es bei T-Zellen keine lösliche Form ihres Rezeptors, die von den Zellen sezerniert werden könnte. Es existieren zwei unterschiedliche Klassen von MHC-Molekülen, welche sich sowohl durch ihren strukturellen Aufbau, als auch durch ihre spezifische Expression auf ausgewählten Körperzellen unterscheiden. So befinden sich MHC-Moleküle der Klasse II nur auf den professionell Antigen-präsentierenden Zellen des Körpers (B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen), die zur Endozytose befähigt sind. MHC-Moleküle der

Klasse I werden von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und präsentieren auf der Zelloberfläche kontinuierlich produzierte Peptide aus Proteinen, die bei Virusbefall der Zelle auch von viralen Proteinen stammen. Die Erkennung der unterschiedlichen MHC-Moleküle erfolgt durch verschiedene T-Zellsubpopulationen: MHC-Moleküle der Klasse I werden durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen, erkannt und bei entsprechendem Kontakt zum passenden TCR wird die Virus-befallene Zelle eliminiert. Des Weiteren wird eine Minderexpression (z.B. bei Virusinfektion) an MHC-I-Molekülen durch NK-Zellen registriert und führt ebenfalls zum Abtöten der Zelle. Im Gegensatz dazu werden MHC-Moleküle der Klasse II von $CD4^+$ T-Helfer-Zellen erkannt, deren Hauptfunktion die Aktivierung anderer Effektor Zellen des Immunsystems ist. Die Expression von MHC-Molekülen kann durch verschiedene Zytokine (z.B. Interferon- γ , IFN- γ) beeinflusst, bzw. verstärkt werden. Zur Aktivierung von T-Zellen ist neben der erfolgreichen Bindung des TCR und Peptid-gebundenen MHC-Molekülen zusätzlich ein kostimulatorisches Signal erforderlich. Dieses wird durch weitere auf der T-Zelle vorkommende Oberflächenmoleküle (CD28, CTLA-4) und ihren entsprechenden Liganden auf der Antigen-präsentierenden Zelle vermittelt (z.B. CD80/86 oder CD46). Nur durch das Zusammenwirken von beiden Stimulationssignalen kann es zu einer optimalen und effizienten Aktivierung der T-Zelle kommen (**Abb. 3**). T-Zellen, welche zwischen Blut und Lymphgewebe zirkulieren und noch keinen Antigenkontakt hatten, werden naive T-Zellen genannt. Wenn eine naive T-Zelle in sekundären lymphatischen Organen auf eine Antigen-präsentierende Zelle trifft und durch diese erfolgreich aktiviert wird, kann die T-Zelle klonal expandieren und sich in verschiedene Richtungen differenzieren. Je nach Differenzierungsstatus kann man zentrale T-Gedächtniszellen (T_{CM}), Effektor T-Gedächtniszellen (T_{EM}) und enddifferenzierte Effektor T-Gedächtniszellen (T_{EMRA}) unterscheiden. Während die Aufgabe von Effektor T-Zellen die erfolgreiche Antigenbekämpfung ist, zirkulieren diese zurück ins Blut zum Ort der Inflammation um dort ihre Effektorfunktion auszuüben. Nach Beenden der Immunantwort gehen Effektor T-Zellen durch inhibitorische Signale vermittelt zunächst in die Anergie über. Dieser Status der Anergie ist durch eine Hochregulation inhibitorischer Oberflächenmoleküle wie zum Beispiel PD-1 und CTLA-4 gekennzeichnet und geht mit einer eingeschränkten Reaktivität und Funktionalität der Zellen einher. Hält dieser Zustand an, wird in den Effektor T-Zellen die Apoptose induziert, welche zu einem Herunterfahren der Immunantwort führt. Neben den Effektor T-Zellen gibt es Gedächtnis T-Zellen, welche auch nach effizienter

Antigenbekämpfung noch Jahrzehnte im Körper verbleiben und bei erneutem Kontakt schnell und effizient reagieren können.

Zusätzlich zum Differenzierungsstatus kann man T-Zellen und deren Subpopulationen nach der Expression ihrer Oberflächenmoleküle und Leitzytokine und somit ihrer unterschiedlichen Funktionalität weiter einteilen. Neben den zytotoxischen T-Zellen, die CD8 exprimieren, gibt es die CD4 tragenden Helfer-T-Zellen, welche man noch weiter in unterschiedliche Subtypen einteilen kann. Zu ihren Hauptaufgaben gehört die Stimulation von anderen Immunzellen, wie die Aktivierung von B-Zellen oder die Anlockung und Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten durch chemotaktische und aktivierende Zytokine. Anhand unterschiedlicher Zytokinexpressionsmuster kann man T_H1 -Zellen (IFN- γ , TNF- α , IL-2 als typische Leitzytokine) von T_H2 -Zellen (Leitzytokin IL-4) unterscheiden. Zusätzlich gibt es noch T_H17 -Zellen, welche durch die Expression von IL-17 und IL-22 vor allem die Reifung von Granulozyten induzieren und chemotaktisch wirken. Eine weitere wichtige Subgruppe an Helfer-T-Zellen stellen die regulatorischen T-Zellen dar, welche durch ein charakteristisches Expressionsmuster an Oberflächenmolekülen ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$) charakterisiert werden können, und deren Hauptaufgabe die Suppression der Immunantwort durch inhibierende Zytokine darstellt. Sie wirken protektiv gegen die Entwicklung von Autoimmunität und stellen ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Suppression der Immunantwort sicher (KAMRADT et al. 2011).

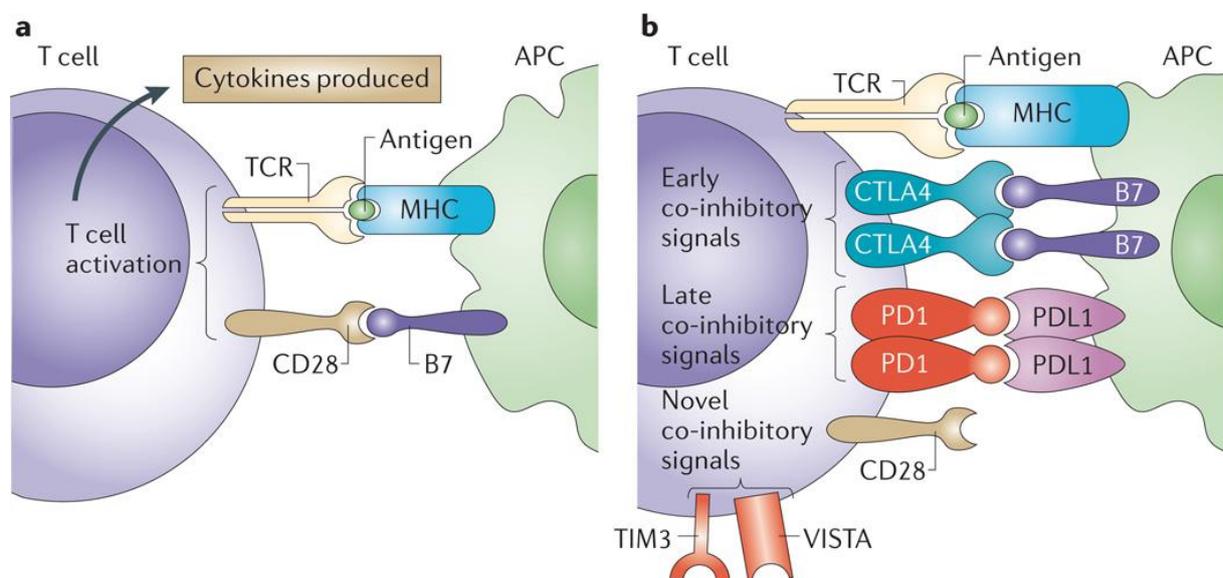


Abbildung 3. Mechanismus der T-Zell-Aktivierung und Inhibition (SHARMA et al. 2011). a Zur effizienten Aktivierung einer T-Zelle ist zusätzlich zu der Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an ein Peptid-tragendes MHC-Moleküls der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) ein weiteres kostimulatorisches Signal (hier über die Oberflächenmoleküle CD28/B7 vermittelt) erforderlich. Durch erfolgreiche Aktivierung wird in der T-Zelle die

Zytokinproduktion induziert. **b** Durch das Fehlen eines kostimulatorischen Signals, oder durch die Signalübertragung koinhibitorischer Oberflächenmoleküle (CTLA4/B7, PD1/PDL1, TIM3, VISTA) kann die Aktivierung einer T-Zelle gehemmt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aktivierte T-Zellen grundsätzlich zwei Ziele verfolgen: Entweder die Abtötung einer virusinfizierten Zelle oder die Interaktion mit anderen Zellen (Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen) des Immunsystems um eine effiziente Immunantwort hervorzurufen (MURPHY et al. 2014).

2.2.4 Die humorale Immunantwort: B-Zell-Aktivierung

Als humorale Immunität der adaptiven Immunantwort wird die durch Antikörper vermittelte Immunreaktion bezeichnet. Antikörper zählen zur Proteinfamilie der Immunglobuline. Immunglobuline sind hoch variable Heterodimere bestehend aus leichten und schweren Ketten, welche sich wiederum jeweils in eine konstante und eine variable Region einteilen lassen. Die variablen Regionen der Immunglobuline formen die Antigenbindungsstelle, welche durch Rekombination verschiedener Gensegmente, Paarung unterschiedlicher Ketten und Hypermutation ein extrem großes Spektrum an unterschiedlichen Antigenespezifitäten generieren kann. Immunglobuline sind die Antigenerkennungsmoleküle von B-Zellen und werden zunächst auf deren Oberfläche als so genannter B-Zell-Rezeptor gebunden oder von ausdifferenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, in löslicher Form als Antikörper sezerniert. Erkennt eine in Blut und Lymphe zirkulierende B-Zelle ein Antigen, wird dieses daraufhin endozytiert, prozessiert und anschließend über MHC-II Moleküle auf der Zelloberfläche der B-Zelle präsentiert. In einem sekundären lymphatischen Gewebe besteht die Möglichkeit, dass die Antigen beladene B-Zelle auf eine $CD4^+$ T-Zelle trifft, welche mit ihrem TCR den MHC-II/Peptidkomplex der B-Zelle erkennt. Durch die Vermittlung eines zusätzlichen kostimulatorischen Signals über die Bindung von CD40/CD40L oder B7/CD28 kommt es zur erfolgreichen Aktivierung der B-Zelle, welche nun zur Antikörperproduktion angeregt wird. Es werden unterschiedliche Klassen an Immunglobuline in Abhängigkeit ihres Aufbaus unterschieden (IgD, IgA, IgM, IgG und IgE), die jeweiligen Isotypen haben spezifische biochemische Eigenschaften und kommen in verschiedenen Körperkompartimenten vor, wo sie unterschiedliche Funktionen ausüben (KAMRADT et al. 2011). In Folge der klonalen Expansion nach Aktivierung der B-Zelle erfolgt die Differenzierung entweder zu Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen, welche eine lange

Lebensspanne besitzen und bei erneutem Antigenkontakt schnell und effizient reagieren können.

2.3 Immundefekte

Bei der Klassifikation von Immundefekten lassen sich zunächst die primären von den sekundären unterscheiden. Primäre Immundefekte sind meist auf eine genetische Mutation zurückzuführen und somit angeboren. Im Gegensatz dazu entwickeln sich die sekundären Immundefekte erst durch äußere Faktoren wie Erkrankungen (z.B. HIV), Mangelernährung oder Nebenwirkungen einer medizinischen Behandlung. Einen wichtigen, klinischen Hinweis auf das Vorliegen einer Immunschwächeerkrankung stellen rezidivierende Infektionen mit denselben oder ähnlichen Krankheitserregern dar. Auch kann das klinische Erscheinungsbild Rückschlüsse auf den defekten Teil des Immunsystems liefern. So deutet zum Beispiel eine wiederkehrende Candidose der Haut auf einen Defekt im Zusammenhang mit T-Lymphozyten hin, da bei zellulären Immundefekten Manifestationen der Haut besonders häufig beobachtet werden. Des Weiteren unterscheidet man, welche spezifischen Komponenten des Immunsystems betroffen sind und kann somit weitere Klassifikationen vornehmen. Als Einteilung der primären Immundefekte hat sich im klinischen Alltag die Klassifikation der International Union of Immunological Societies (IUIS) in 8 Subgruppen durchgesetzt (NOTARANGELO et al. 2009):

1. Kombinierte T- und B-Zell-Immundefekte
2. Immundefekte, bei denen ein Antikörpermangel im Vordergrund steht
3. Andere gut definierte Immundefekt-Syndrome
4. Erkrankungen mit Immundysregulation
5. Defekte der Phagozytenzahl und/oder -funktion
6. Defekte der angeborenen Immunität
7. Autoinflammatorische Syndrome
8. Komplementdefekte

Als Leitsymptom der Immundefekterkrankungen stellt sich eine Infektanfälligkeit dar, wobei es keine genaue Definition gibt, ab wann rezidivierende Infektionen sich von einem physiologischen Maß abheben. Als Hinweis für eine pathologische Infektanfälligkeit können entweder Infektionen mit opportunistischen Erregern gesehen werden, welche bei

immunkompetenten Personen nur selten zu einer Erkrankung führen (z.B. Pneumocystis-jiroveci-Pneumonie) oder aber Infektionen mit gewöhnlichen Erregern, welche einen ungewöhnlich schweren, rezidivierenden Verlauf an einer möglicherweise auch atypischen Lokalisation aufweisen (BUSTAMANTE et al. 2008). Neben dieser erhöhten Anfälligkeit für Infekte kann aber auch das gehäufte Auftreten von Autoimmunerkrankungen als Zeichen einer gestörten Immunregulation gewertet werden (ARASON et al. 2010).

Neben pathologischen Veränderungen des Immunsystems in Folge eines Immundefektes macht das Immunsystem im Laufe des Lebens auch eine physiologische Entwicklung durch, die im Allgemeinen auch als Immunseneszenz bezeichnet wird. Das Immunsystem von älteren Menschen unterscheidet sich somit nachweislich nicht nur vom sich entwickelnden Immunsystem kleiner Kinder und Neugeborener, sondern auch von dem Immunsystem junger Erwachsener. Diese Veränderungen sind zunächst struktureller Natur und beginnen mit der Involution des Thymus nach der Geburt. Mit fortschreitendem Alter kommt es zusätzlich zu einer Abnahme des naiven Zellpools und einer verhältnismäßigen Verschiebung zum Gedächtnis Zell-Typ, einer Abnahme an Lymphozyten und einer anteiligen Zunahme an Makrophagen im Blut (LANG et al. 2011). Hinzu kommen auch funktionelle Veränderungen mit einer verminderten Proliferationsfähigkeit der Zellen, einem möglicherweise veränderten Zytokinexpressionsprofil und einer Abnahme der T_H1 zugunsten der T_H2 vermittelten Immunantwort. Auch in Hinsicht auf die humorale Immunität zeigt sich im Alter eine verminderte Produktion spezifischer Antikörper und ein erhöhtes Maß an autoreaktiven Antikörpern (GAVAZZI et al. 2002). Klinisch gehen diese Beobachtungen mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einher, die mit einer fortschreitenden Veränderung der adaptiven Immunantwort gleichzusetzen ist.

2.4 Autoimmunerkrankungen und Down-Syndrom

Neben der erhöhten Anfälligkeit für respiratorische Infektionen zeigen Kinder mit Down-Syndrom auch eine erhöhte Inzidenz an organspezifischen Autoimmunerkrankungen und Leukämien (ANWAR et al. 1998, CARNICER et al. 2001, GILLESPIE et al. 2006, LINABERY et al. 2015), welche ebenfalls auf eine Insuffizienz ihres Immunsystems hindeutet. Eine Besonderheit der organspezifischen Autoimmunerkrankungen ist, dass lediglich Autoantigene von einem bestimmten Organ angegriffen werden und die Symptome somit organspezifisch sind. Im Gegensatz hierzu gibt es systemische Autoimmunerkrankungen, bei

denen das als fremd erkannte Antigen in mehreren Geweben exprimiert wird und somit vielfältige systemische Symptome hervorruft. Besonders die systemischen Autoimmunerkrankungen neigen zu einer Chronifizierung. Hervorgerufen werden Autoimmunerkrankungen durch autoreaktive Lymphozyten, die an einem Verlust der Selbsttoleranz leiden (ABRAMSON et al. 2016, GIMENEZ-BARCONS et al. 2014), und durch ihre löslichen Effektormoleküle wie Autoantikörper und Zytokine, die zu einer Entzündungsreaktion und schlussendlich zur Gewebedestruktion führen. Da unser Immunsystem viele verschiedene Kontrollpunkte zur Verhinderung von Autoimmunität besitzt, ist eine multifaktorielle Genese durch eine genetische Prädisposition im Zusammenspiel mit bestimmten Umgebungsfaktoren naheliegend.

Der genaue Pathomechanismus, der zur Auslösung einer Autoimmunreaktion des menschlichen Körpers führt, ist noch nicht hinreichend geklärt und die spezifischen Ursachen noch weitestgehend unbekannt. Im Raum stehen diverse Theorien von molekularem Mimikry bis hin zu einer noch unentdeckten Infektion. Einig ist man sich lediglich über das Existieren von genetischen Risikofaktoren, welche das Auftreten einer Autoimmunerkrankung begünstigen, jedoch keine sichere Aussage über ihr Auftreten machen können (KUCHROO et al. 2012).

2.5 Infektionen und Down Syndrom

Kinder mit Down-Syndrom neigen zu einer erhöhten Anfälligkeit für rezidivierende Infektionen mit zum Teil schwerwiegenden Verläufen. Da Kinder mit Down-Syndrom zu einem individuell variablen Maße sowohl an Immundysregulation mit pathologischer Infektanfälligkeit als auch zu malignen und autoimmunen Erkrankungen neigen, scheint es sich hier um einen Immundefekt mit sehr vielseitigen Ausprägungen zu handeln. Die Entwicklung von schweren Infektionsverläufen ist multifaktoriell bedingt. Nicht zu vernachlässigen sind in diesem Zusammenhang auf der einen Seite die mit Down-Syndrom einhergehenden anatomischen Gegebenheiten, welche die Entstehung von Infekten besonders im Respirationstrakt noch zusätzlich zu immunologischen Faktoren begünstigen. Auf der anderen Seite stehen weitere assoziierte Charakteristika, welche das Immunsystem zusätzlich schwächen und belasten können, wie zum Beispiel kongenitale Herzfehler, Thymektomie, Autoimmunität, zystische Fibrose und neuromuskuläre Erkrankungen. Um die immunologischen Einschränkungen von Kindern mit Down-Syndrom unter dem Hintergrund

anderer bisher bekannter primärer Immundefekte zu interpretieren und ihnen eine optimale Therapie in Aussicht stellen zu können, haben wir versucht die beobachteten Phänomene zusammenzufassen und in die geläufige Klassifikation (AWMF-Leitlinie) zu integrieren. Nach aktuellem Wissensstand handelt es sich bei den spezifisch im Zusammenhang mit Trisomie 21 beschriebenen Immundefekten am ehesten um einen kombinierten B- und T-Zell Immundefekt, welcher sowohl mit quantitativen als auch qualitativen Veränderungen der lymphozytären Funktionalität einhergeht (KUSTERS et al. 2009, VERSTEGEN et al. 2014, VERSTEGEN et al. 2010). Aufgrund der Vielseitigkeit der Erscheinung und unterschiedlicher Ausprägung der verschiedenen Aspekte der klinischen Manifestation von Immundefekten bei Kindern mit Down-Syndrom ist es schwierig sie mit anderen Immundefekten zu vergleichen. Es handelt sich am wahrscheinlichsten um eine Art von kombinierter variabler Immundefizienz (Combined Variable Immunodeficiency, CVID), wobei es hier diverse Abgrenzungen der phänotypischen Zellverhältnisse aufzuzeigen gilt (VERSTEGEN et al. 2014). Die Immundefekte von Kindern mit Down-Syndrom sind sehr spezifisch und lassen sich nicht mit bisher bekannten primären Immundefekten gleichsetzen, sodass es sich bei den mit Trisomie 21 assoziierten Immunveränderungen um eine eigene Klassifizierung innerhalb der IUIS Klassifikationsgruppe 1 „Kombinierte T- und B-Zell- Immundefekte“ handelt. Die Immundefekte wie sie im Zusammenhang mit Down-Syndrom klinisch beobachtet werden, zeigen einige Parallelen zu den physiologischen Veränderungen des Immunsystems im Alter, so dass bei Menschen mit Down-Syndrom häufig der Begriff der vorzeitigen Alterung des Immunsystems gebraucht wird (da Rosa Utiyama, Shirley Ramos et al. 2008). Während sich die bisherigen Studien zur Charakterisierung der mit Down-Syndrom assoziierten Veränderungen des Immunsystems hauptsächlich auf quantitative Analysen von Lymphozytenpopulationen, sowie Analyse der Funktionalität und Differenzierung von B-Zellen, einschließlich humoralen Immunparametern beschränken, ist das Wissen über T-Subpopulationen, sowie die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Effektor T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom bisher noch sehr limitiert.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Bisher lag der Fokus zur Erfassung der Immundysregulationen in Assoziation mit Trisomie 21 auf der quantitativen Analyse von Lymphozytensubpopulationen, funktionellen Analysen von B-Zellen und Evaluation der humoralen Immunantwort, wohingegen mögliche

Einschränkungen der T-Zell-vermittelten Immunität noch nicht ausreichend untersucht wurden. Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur vorbeschriebenen Immundefekte bei Kindern mit Down-Syndrom um weitere Erkenntnisse im Zusammenhang mit T-Zell-Subpopulationen und Effektor T-Zell Funktionalität zu erweitern. Hierfür wurden quantitative und qualitative Analysen der Lymphozytensubpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern durchgeführt. Des Weiteren wurde die Antigen-spezifische zelluläre und humorale Immunantwort am Beispiel der Immunantworten gegen Cytomegalievirus (CMV), Varizella Zoster Virus (VZV), sowie mykobakterielle Antigene (Tuberkulin) evaluiert.

Folgende Fragestellungen wurden im Einzelnen verfolgt:

- Unterscheiden sich Leukozyten-, Lymphozyten- und T-Zell-Subpopulationen von Kindern mit Down-Syndrom und Kontrollkindern?
- Zeigen Kinder mit Down-Syndrom phänotypische Besonderheiten ihrer Effektor T-Zellen?
- Ist bei Kinder mit Down-Syndrom eine veränderte Reaktionsfähigkeit von Effektor T-Zellen nachweisbar?
- Zeigen Kinder mit Down-Syndrom eine veränderte humorale und zelluläre Pathogen-spezifische Immunantwort?
- Lassen sich die beobachteten Unterschiede auf das Down-Syndrom zurückführen oder welchen Einfluss hat die neonatale Thymektomie auf die Untersuchungsergebnisse?

3 Material und Methoden

3.1 Probandenkollektiv

Zur Charakterisierung des Immunsystems bei Kindern mit Down-Syndrom (DS) wurden insgesamt 40 Kinder und junge Erwachsene mit einer freien (ICD Q90.0, 60%) oder nicht näher klassifizierten (ICD Q90.9, 40%) Trisomie 21 und weitere 51 immunologisch gesund eingestufte Kontrollkinder und Adoleszente (K) analysiert. Ausschlusskriterien waren Kinder mit chronischen Erkrankungen sowie schwerwiegenden, akuten Infektgeschehen. Geringgradige, respiratorische Infekte zum Zeitpunkt der Testung, sowie die individuelle Anamnese bezüglich einer Impfung gegen das Varizella Zoster Virus bzw. einer früheren Varizella Zoster Virus Infektion wurde mittels eines Fragebogen festgehalten. Explizit eingeschlossen wurden in beiden Gruppen Probanden mit gut therapiekontrollierten Autoimmunphänomenen, ohne aktuelle Exazerbation wie Hashimoto-/Basedow-Thyreoiditis, Zöliakie, Autoimmune Thrombozytopenie und Psoriasis. Es erfolgte ein alters- und geschlechtsspezifisches Matching der Kontrollprobanden. Die Probanden wurden in Kooperation mit der endokrinologischen und kardiologischen Ambulanz des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg rekrutiert. Eingeschlossen wurden Kinder, Heranwachsende und junge Erwachsene bis zu einem Alter von 28 Jahren; zur Vereinfachung wird im Ergebnisteil im Allgemeinen von Kindern gesprochen, obwohl ein geringer Anteil der Probanden (DS>18 Jahre: n=3, K>18 Jahre: n=5) zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Alter zwischen 18 und 28 Jahren alt war. Eine ausführliche Aufklärung der Probanden bzw. ihrer Erziehungsberechtigten erfolgte vor jeder Probenentnahme und die Einwilligung wurde schriftlich festgehalten. Die Probenentnahme wurde im Rahmen einer Routine-Blutuntersuchung durchgeführt, sodass das Risiko einer zusätzlichen Blutentnahme vermieden werden konnte. Pro Person wurden bis zu maximal 4,7 ml Vollblut in einer Lithium-Heparin Monovette entnommen. Das positive Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes lag vor (Aktenzeichen 214/14). Nähere klinische und epidemiologische Informationen zu den Probandenkollektiven wurden zum einen durch einen Fragebogen bei Blutentnahme erhoben (Impfstatus, aktuelle respiratorische Infekte), zum anderen wurden sie in den Krankenakten der jeweiligen Patienten recherchiert (Herzoperationen mit und ohne Thyrektomie, Komorbiditäten und Medikamenteneinnahme). Aufgrund der teilweise

limitierten Blutmenge konnte nicht bei allen Probanden jede Analyse durchgeführt werden. Die genaue Anzahl und Charakteristika der in die einzelnen Analysen eingeschlossenen Probanden sind im jeweiligen Abschnitt des Ergebnisteils aufgeführt.

3.2 Geräte und Materialien

Die bei der Durchführung der Experimente verwendeten Geräte und Materialien sind in den folgenden **Tabellen 1-3** aufgelistet.

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Firma
Brutschrank (Hera cell 150 + 240i)	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer (FACS CANTO II)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterile Werkbank (Hera Safe + Hera Safe KS)	Heraeus, Hanau
Multifunktionseller Plattenleser (Victor X4)	PerkinElmer, Rodgau
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
Präzisionswaage PCB 250-3	Kern und Sohn, Balingen
Kolbenhubpipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Multipipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Präzisions Dispenser Tips (5ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Reagiergefäße (1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen (5ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Geräte	Firma
Röhrchen Polypropylen (15ml Falcon)	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipette (2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 2: Chemikalien und Testkits

Chemikalien und Test Kits	Firma
Aqua destilliert	Ecotainer B.Braun, Melsungen
Natriumazid (NaN ₃)	Serva, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma, Deisenhofen
FACS Clean, Flow, Rinse und Shutdown Solution	BD Biosciences, HeidelbergBiochrom, Berlin
FCS (fetales Kälberserum)	BD Biosciences, Heidelberg
Lysing Solution	AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyd	PAA, Cölbe
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Sigma, Steinheim
Saponin	
Anti-CMV-ELISA-Kit (IgG)	Euroimmun, Lübeck
Anti-VZV-ELISA-Kit (IgG)	Euroimmun, Lübeck

Tabelle 3: Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Brefeldin A-Stocklösung	5mg/ml in Ethanol
FACS-Puffer	PBS, 5% FCS, 0,5% BSA, 0,07% NaN ₃
10% Natriumazid (NaN ₃)-Lösung	10% in H ₂ O dest.
Paraformaldehyd-Stocklösung	5g in 200ml PBS, pH 7,4-7,6
Saponin-Stocklösung	2g Saponin in 39,7 ml sterilem PBS + 0,28ml 10% NaN ₃
0,1% Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1% Saponin

3.3 Antigene und Antikörper

Die in **Tabelle 4** aufgeführten Stimulanzen (Kostimulatorische Antikörper und Antigene) wurden zur Durchführung der T-Zell-Stimulation verwendet. Bei den CMV- und VZV-Antigenen handelt es sich um Lysate infizierter Zellen. Als Kontroll-Antigene dienen jeweils Lysate nicht-infizierter Zellen. Zur Stimulation von Mycobakterien-spezifischen T Zellen wurde Tuberkulin (PPD) verwendet, das ein Gemisch aus mycobakteriellen Antigenen darstellt. Die hierfür verwendeten Konzentrationen sind pro ml Vollblut angegeben.

Des Weiteren sind alle zur durchflusszytometrischen Analyse benutzten Antikörper mit entsprechenden Charakteristika über die Art der gekoppelten Fluorochrome und den jeweiligen Klon in **Tabelle 5** zusammengefasst. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind gegen humane Antigene gerichtet und haben einen murinen Ursprung.

Tabelle 4: Kostimulatorische Antikörper und Antigene

Stimulanz (Klon)	Konzentration	Firma
Anti-CD28 (L293)	1 µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD49d (9F10)	1 µg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
Ko-Ag	1,46 mg/ml	Virion/Serion, Würzburg
CMV-Ag	1,46 mg/ml	Virion/Serion, Würzburg
VZV-Ag	1,46 mg/ml	Virion/Serion, Würzburg
PPD	7,3 µg/ml	Statens Serum Institut, Kopenhagen
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (SEB)	2,5 µg/ml	Sigma, Steinheim

Tabelle 5: Antikörper

Antikörpertarget	Fluorochrome	Klon	Ig-Klasse
CD3	APC	SK7	IgG1 k
CD4	PE-Cy7	SK3	IgG1 k
CD4	APC-H7	SK3	IgG1 k
CD8	PerCP	SK1	IgG1
CD8	V500	RPA-T8	IgG1 k
CD16	PE	3G8	IgG1 k
CD19	FITC	HIB19	IgG1 k
CD25	PE-Cy7	M-A251	IgG1 k
CD27	PE	L128	IgG1 k
CD28	PerCP-Cy5.5	L293	IgG1 k
CD56	PE	B159	IgG1 k
CD69	Per-CP	L78	IgG1 k
CD127*	FITC	eBioRDR5	IgG1

Antikörpertarget	Fluorochrome	Klon	Ig-Klasse
CD152 (CTLA-4)	APC	BNI3	IgG2a k
CD279 (PD-1)	APC	MIH4	IgG1 k
IFN- γ	FITC	4S.B3	IgG1 k
IL-2	PE	MQ1-17H12	IgG2a
IL-4	PE	8D4-8	IgG1
IL-17A	AlexaFluor 647	SCPL1362	IgG1 k
TNF α	V450	MAb11	IgG1 k

Alle Antikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg hergestellt, *einziger Antikörper der von eBiosciences, Frankfurt hergestellt wurde.

3.4 Analyse von Zellpopulationen durch Oberflächenfärbung

Aufgrund der Expression von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen lassen sich verschiedene Zellpopulationen nach Markierung mit entsprechenden, Fluorochromgekoppelten Antikörpern durchflusszytometrisch eindeutig unterscheiden, quantifizieren und phänotypisch analysieren. Es wurden pro Proband jeweils zwei Färbungen mit je 100 μ l Vollblut und zwei unterschiedlichen Antikörperkombinationen durchgeführt mit den Zielen der quantitativen und phänotypischen Analyse der Lymphozytensubpopulationen und Effektor T-Zellen.

3.4.1 Lymphozytensubpopulationen

Zur quantitativen Analyse der einzelnen Lymphozytensubpopulationen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 und CD56 markiert, durch welche sich T-, B- und NK-Zellen durchflusszytometrisch charakterisieren lassen.

Zu den 100 μ l vorgelegtem Vollblut wurden die Antikörper in nachfolgend aufgelisteter Menge (**Tabelle 6**) dazugegeben. Die Antikörpermenge kann gegebenenfalls von der empfohlenen Herstellerangabe abweichen, wurde jedoch in vorherigen Versuchen austitriert.

Anschließend wurden die Proben 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und nachfolgend durch Zugabe von 9ml Lysing Solution/ml Vollblut die Erythrozyten lysiert. Nach erneuter 10 minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Proben zentrifugiert (7 Minuten bei 1300 UpM), der Überstand abgesaugt und anschließend wurde das Zellpellet mit 2ml FACS-Puffer

resuspendiert (gewaschen). Nach abschließender Zentrifugation (7 Minuten bei 1300 UpM) wurden die Proben zur Messung in 150µl PFA aufgenommen und noch am gleichen Tag durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 6: Verwendete Antikörpermengen Oberflächenfärbung I

Oberflächenmolekül	Fluorochrome	Menge [µl]
CD3	APC	0,5
CD4	PE-Cy7	0,5
CD8	PerCP	4
CD16	PE	1
CD19	FITC	2,5
CD56	PE	4

Die Antikörpermengen beziehen sich auf 100µl Vollblut

3.4.2 Phänotypische Analyse und regulatorische T-Zellen

Nach dem gleichen Prinzip der Oberflächenfärbung erfolgte die phänotypische Analyse der Zellen. Dafür wurde die Expression weiterer Oberflächenmarker wie z.B. dem Anergiemarker PD-1 und den kostimulatorischen Markern CD27 und CD28 untersucht. Des Weiteren war das Ziel dieser Färbung die Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen, die als CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Zellen definiert wurden.

Das Experiment wurde analog zum oben beschriebenen Protokoll, jedoch mit einer anderen Antikörperzusammensetzung durchgeführt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Verwendete Antikörpermengen Oberflächenfärbung II

Oberflächenmolekül	Fluorochrome	Menge [μ l]
CD28	PerCP-Cy5.5	5,00
CD27	PE	1,50
PD-1	APC	5,00
CD127	FITC	1,25
CD25	PE-Cy7	1,00
CD4	APC-H7	0,50
CD8	V500	1,00

Die Antikörpermengen beziehen sich auf 100 μ l Vollblut

3.5 Quantifizierung von Erreger-spezifischen T-Zellen und von T-Helfer-Subpopulationen

Die detaillierte funktionelle Charakterisierung der Erreger-spezifischen zellulären Immunantwort wurde ebenfalls aus Vollblutproben durchgeführt. Hierfür wurde das Blut in Anwesenheit kostimulatorischer Antikörper (anti-CD28, anti-CD49d) jeweils zusammen mit verschiedenen pathogen-spezifischen Antigenen (CMV-Lysat, VZV-Lysat, Tuberkulin (PPD)) bzw. einer Negativkontrolle (Kontroll-Lysat) inkubiert und die spezifisch stimulierten T-Zellen anschließend durchflusszytometrisch analysiert (SCHMIDT et al. 2013, SESTER et al. 2001). Dabei konnte anhand der Expressionsprofile der Zytokine IFN- γ , IL-2, und TNF α , sowie verschiedener Oberflächenmarker für Aktivierung (CD69), Differenzierung (CD127) und funktionelle Anergie (CTLA-4 und PD-1) eine detaillierte Analyse der T-Zell-Funktionalität erzielt werden. Eine polyklonale Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) diente als Positivkontrolle, um das generelle Reaktionsvermögen der Effektor T-Zellen zu erfassen. Dieser Stimulus führt zu einer Quervernetzung der MHCII-Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen zum T-Zell-Rezeptor von Helfer- und zytotoxischen T-Zellen führt und somit eine übermäßige Zytokininduktion mit sich zieht. Ein weiteres Ziel der polyklonalen Stimulation war die Demaskierung verschiedener T-Helfer-Subpopulationen durch Induktion von charakteristischen Leit-Zytokinen, die ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert wurden (IFN- γ , IL-4 und IL-17).

Der Stimulationsassay beruht auf der Induktion von Effektorzytokinen, deren Sekretion durch Zugabe eines Transportinhibitors (Brefeldin A) inhibiert wird. Die gebildeten Zytokine akkumulieren somit intrazellulär und durch anschließende Permeabilisierung der Zellmembran können monoklonale Antikörper, die gegen die nachzuweisenden Zytokine gerichtet sind, in die Zelle eindringen. Die spezifisch gebundenen Antikörper können dann zusammen mit Antikörpern gegen Zelloberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.5.1 Stimulation der Zellen

Bei ausreichend vorhandener Blutmenge wurden fünf Stimulationen nach dem in **Tabelle 8** aufgeführten Schema angesetzt. Die beschriebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf 1 ml heparinisieretes Vollblut.

Zunächst wurde ein Gesamtvolumen von 1650µl Vollblut mit 1µg/ml anti-CD28 und 1µg/ml anti-CD49d versetzt und nachfolgend in die jeweiligen Stimulationsansätze aufgeteilt. Vorgelegt wurden jeweils 300µl Vollblut pro Antigen-spezifischen Ansatz und Negativkontrolle, lediglich die polyklonale Stimulation wurde mit 450µl Vollblut durchgeführt. Die Antigene wurden in entsprechenden Konzentrationen dazugegeben und der Ansatz gründlich durchmischt (**Tabelle 8**). Anschließend folgte eine sechsstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Polypropylen-Röhrchen mit lose aufgeschraubten Deckeln. Zur Verhinderung der Sekretion der induzierten Zytokine wurde nach zwei Stunden Inkubation der Transportinhibitor Brefeldin A (BFA) in der Konzentration 10µg/ml zugegeben.

Tabelle 8: Ansatz der Vollblutstimulation mit Menge der zugegebenen kostimulatorischen Antikörpern und Antigenen

	α CD28 + α CD49d [μ l]	Vollblut [μ l]	Antigen [μ l]
Kontroll-Antigen	0,9	300	9,6
CMV Antigen	0,9	300	9,6
VZV Antigen	0,9	300	9,6
PPD	0,9	300	2,22
SEB	1,35	450	1,125

3.5.2 Fixierung der Zellen

Nach sechs Stunden Inkubation wurde zum Lösen der Zell-Zell Verbindungen 100 μ l/ml 20mM EDTA zugegeben, 10 Sekunden mit dem Vortexer gut durchmischt und anschließend erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachfolgend wurde zur Durchführung der Färbung I 150 μ l Vollblut pro Stimulationsansatz entnommen, in FACS-Röhrchen verteilt, mit nicht fixierungsstabilen Antikörpern (**Tabelle 9**) versetzt und anschließend bei Raumtemperatur 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mit diesen Proben im Verlauf genauso weiter gearbeitet, wie nachfolgend für das verbliebene Blutvolumen im Stimulationsansatz der Polypropylen-Röhrchen beschrieben.

Tabelle 9: Färbung I: Nicht fixierungsstabile Oberflächenantigene

Antikörper	Menge [μ l]
PD1	5,00
CD8	1,00

Die Mengen beziehen sich auf 150 μ l Vollblut

Zur Lyse der Erythrozyten wurden 9 ml Lysingsolution pro ml Vollblut zu den Proben gegeben und nach Durchmischung erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (die vorgefärbten Proben im Dunkeln). Nach Zentrifugation (7 Minuten bei 1300 Upm) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2ml FACS-Puffer resuspendiert (gewaschen). Die

Zellen waren jetzt fixiert und wurden entweder in 200µl FACS-Puffer pro Antigen-spezifischem Ansatz (400µl FACS-Puffer bei den SEB stimulierten Proben) aufgenommen und bis zur Färbung bei 4°C im Kühlschrank (maximal 72 Stunden) gelagert oder direkt weiter bearbeitet.

3.5.3 Intrazelluläre Färbung der Zellen

Die fixierten Zellen, welche sich noch in den Polypropylen-Röhrchen befanden, wurden zunächst in FACS-Röhrchen (der SEB Ansatz wird hierbei in zwei Röhrchen aufgeteilt) umpipettiert, anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Proben durch 10 minütige Inkubation in 2ml Saponin-Puffer bei Raumtemperatur (die vorgefärbten Proben im Dunkeln). Nach erneuter Zentrifugation (7 Minuten bei 1300 UpM), wurde der Überstand abgesaugt und je 50µl Saponin-haltiger Antikörpermix der entsprechenden Färbungen (**Tabelle 10**) zugegeben. Färbung Ib wurde mit den vorgefärbten Proben durchgeführt, Färbung III nur mit einem der polyklonal stimulierten Zellansätze und Färbung II mit den verbliebenen Röhrchen. Nach guter Durchmischung mit Hilfe des Vortexers wurden alle Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte ein abschließender Waschschrift mit 3ml FACS-Puffer, das Zellpellet wurde in 150µl 1% PFA aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Messung, die noch am gleichen Tag durchgeführt wurde, im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Tabelle 10: Übersicht über die Zusammensetzung der einzelnen Färbungen

Antikörper und Zusatzreagenzien	Menge [µl]		
	Färbung Ib	Färbung II	Färbung III
Anti-CD4	0,50	0,50	0,50
Anti-CD69	2,00	2,00	2,00
Anti-IFN-γ	0,50	0,50	0,50
Anti-CD27	2,00	x	x
Anti-CTLA4	X	2,00	x
Anti-TNFα	X	1,00	x
Anti-IL2	X	2,00	x
Anti-IL4	X	x	2,00
Anti-IL-17	X	x	2,50
SAP 5%	1,00	1,00	1,00
FACS Puffer	44,00	41,00	41,50

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS engl. = fluorescence-activated cell sorting) ist ein Verfahren um gleichzeitig mehrere Parameter einer einzelnen Zelle innerhalb einer komplexen Zellsuspension analysieren zu können. Sie ermöglicht zunächst die Charakterisierung der Zellen nach ihren physikalischen Eigenschaften (Größe und Granularität). Weiter lassen sich dann auch detaillierte Analysen der Oberflächenmoleküle, intrazellulär exprimierten Moleküle und funktionellen Eigenschaften einer Zelle durchführen (O'DONNELL et al. 2013, PICOT et al. 2012).

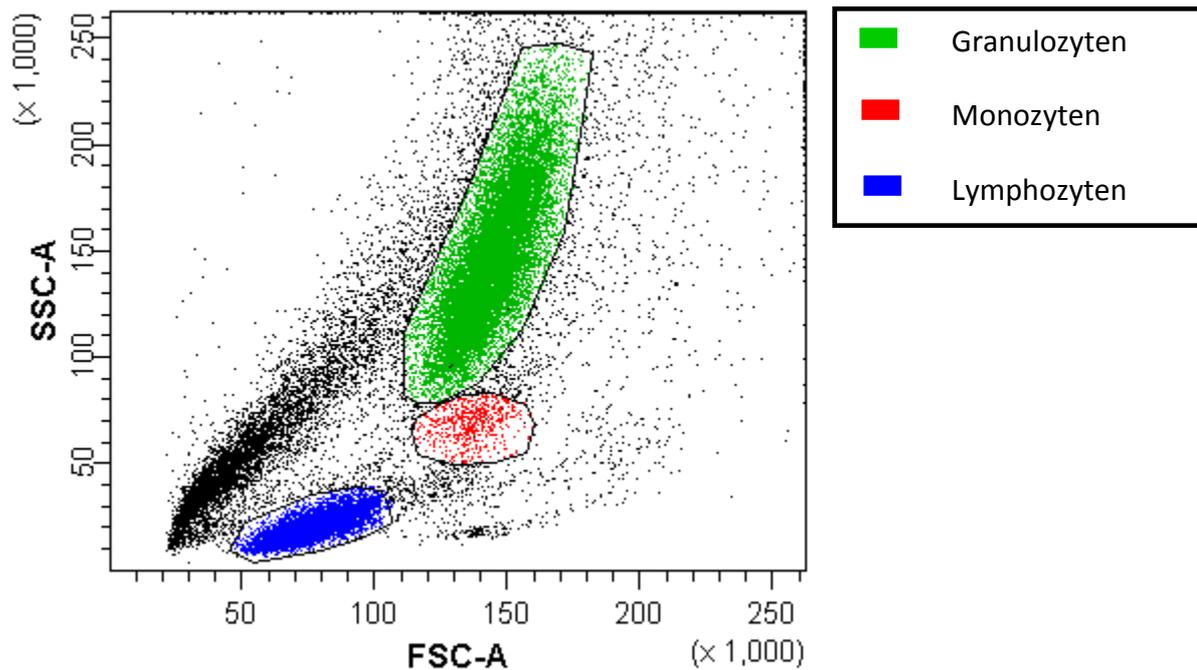


Abbildung 4. Repräsentativer Dotplot einer durchflusszytometrisch gemessenen Vollblutprobe. Jeder Punkt spiegelt eine durchflusszytometrisch gemessene Zelle mit ihren charakteristischen, physikalischen Eigenschaften wider. Detektiert werden sowohl die Vorwärtsstreuung des Lichts (X-Achse), die proportional zum Zellvolumen ist, als auch die Seitstreuung des Lichts (Y-Achse), welche eine Aussage über die Granularität der Zelle trifft.

Zur durchflusszytometrischen Analyse wird eine Suspension an Zellen benötigt, die durch hydrodynamische Fokussierung und mittels Überdruck in eine Kapillare geleitet wird, sodass jede Zelle einzeln die Messkammer passiert. Hier trifft die Zelle auf einen Laserstrahl, der je nach Zellgröße und Komplexität der vesikulären Strukturen im Zellinnern in charakteristischer Weise abgelenkt wird. Die Visualisierung der gemessenen Informationen erfolgt als Dotplot, in dem die Eigenschaft jeder Zelle als Punkt projiziert wird. **Abb. 4** zeigt ein typisches Beispiel, in welchem sich prominente Blutzellpopulationen (Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten) anhand ihrer lichtbrechenden Eigenschaften bezüglich Größe und Granularität auftrennen und quantifizieren lassen.

Weiter lassen sich Zellsubpopulationen anhand der Expressionsdichte verschiedener Oberflächenmoleküle nach Anfärben mit monoklonalen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern charakterisieren. Nach Bindung an die entsprechende Zellstruktur (z.B. Rezeptoren) wird das an den Antikörper gekoppelte Fluorochrom durch den Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Das Durchflusszytometer ist mit empfindlichen Photodetektoren ausgestattet, welche die Emission und somit die Menge der auf der Zelloberfläche gebundenen Antikörper messen können, die ein Maß für die Expressionsdichte des

analysierten Parameters darstellen. Computergestützt werden die gemessenen Informationen entweder als Histogramm (bei einem Parameter) oder als Dotplot (bei zwei oder mehr analysierten Parametern) wiedergegeben. Ein weiteres Einsatzgebiet neben der Analyse von membranständigen Molekülen ist die Analyse intrazellulärer Moleküle (z.B. intrazelluläre Zytokinfärbung). Durch den Einsatz mehrerer Laser unterschiedlicher Anregungswellenlänge kann die Anzahl der messbaren Parameter erhöht werden.

3.6.1 Auswertung der durchflusszytometrisch gemessenen Daten

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit der Software BD FACSDiva (Version 6.1.3) und nach einem bestimmten Hierarchieschema der Zellpopulationen.

3.6.1.1 Auswertung der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen

Mit dem Ziel der Quantifizierung der Lymphozyten bzw. T-Zell-Subpopulationen wurden zunächst die jeweiligen Populationen entsprechend der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle angefärbt und definiert. Betrachtet wurden B-Zellen ($CD19^+$), NK-Zellen ($CD16^+/CD56^+$) sowie T-Zellen ($CD3^+$) und ihre Subpopulationen ($CD4^+$, $CD8^+$ und $CD4^+CD8^+$ T-Zellen). Außerdem wurden regulatorische T-Zellen ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$ T-Zellen) quantifiziert (**Abb. 5**), sowie die PD-1 Expression auf den quantifizierten Zellpopulationen mittels medianer Fluoreszenz Intensität bestimmt. In einer zweiten Oberflächenfärbung wurden verschiedene Zellpopulationen ($CD4^+$ T-Zellen, $CD8^{dim}$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen) hinsichtlich ihrer Expression von CD27 und CD28 weiter analysiert (**Abb. 6**).

3.6.1.2 Auswertung Zytokin-positiver T-Zellen nach Stimulation

Im zweiten Teil der Experimente wurden intrazellulär akkumulierte Zytokine analysiert, welche nach Antigen-spezifischer bzw. polyklonaler Stimulation in vorher definierten Zellpopulationen ($CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen) induziert werden (**Abb. 7, 8**). Hierfür erfolgte die ausführliche Analyse des Zytokinprofils reaktiver Zellen, indem aktivierte, $CD69^+$ Zellen weiter auf die Koexpression multipler Zytokine untersucht wurden ($IFN-\gamma^+$ oder $TNF\alpha^+$ oder $IL-2^+$ Zellen). In dieser Analyse ergibt sich für jede Zelle eine mögliche Einteilung in eine von 7 Subpopulationen: $IFN-\gamma^+$, $IFN-\gamma^+/IL-2^+$, $IFN-\gamma^+/IL-2^+/TNF\alpha^+$, $TNF\alpha^+$, $IL-2^+$, $TNF\alpha^+IL-2^+$ und $IFN-\gamma^+TNF\alpha^+$ (**Abb. 7**). In dieser Färbung wurde auch die jeweilige Expression von CTLA-4 auf den Effektor T-Zellen anhand der medianen Fluoreszenz Intensität analysiert. Zur weiteren Analyse der PD-1 Expression auf reaktiven Zellen, sowie der Quantifizierung von Effektor $CD8^+$ T-Zellen wurde eine weitere Färbung aus dem gleichen Stimulationsansatz durchgeführt. Nach einer zu Färbung I analogem Definieren von reaktiven ($CD69^+IFN-\gamma^+$) Zellen (**Abb. 7**) erfolgte die Analyse der PD-1 Expression zusätzlich anhand der Medianen Fluoreszenz Intensität (**Abb. 9**). In einem letzten Färbungsansatz analysierten wir verschiedene T_H -Subpopulationen anhand ihrer spezifischen Zytokinexpression ($IL-17$ für T_H17 -Zellen, $IL-4$ für T_H2 -Zellen, $IFN-\gamma^+$ für T_H1 -Zellen) mit zusätzlicher Induktion des Aktivierungsmarkers $CD69$ (**Abb. 8**). Durch den Aufbau unserer Färbungen analysierten wir unterschiedliche Zellpopulationen auch in mehreren, unabhängigen Versuchsszenarien (Oberflächenfärbung, verschiedene Färbungsansätze nach Vollblutstimulation) und testeten diese regelmäßig auf Interassay-Variabilität. Hierdurch konnten wir eine hohe Übereinstimmungsvalidität als interne Qualitätskontrolle gewährleisten.

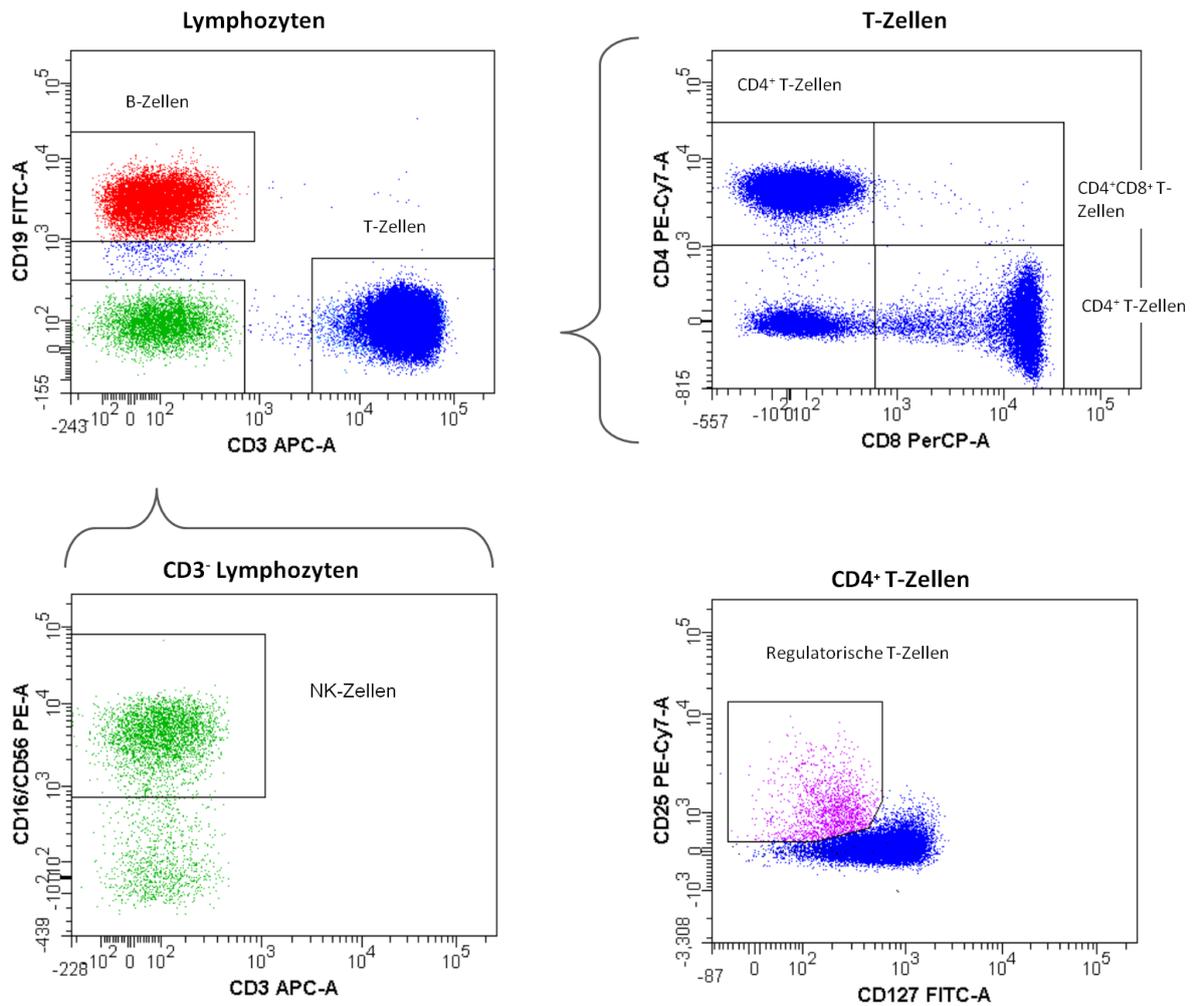


Abbildung 5. Auswertstrategie für Lymphozytensubpopulationen (Oberflächenfärbung I). Im ersten Dotplot sind die über FSC/SSC eingegrenzten Lymphozyten (Abb. 4) dargestellt. Durch Expression der entsprechenden Oberflächenmoleküle wurden T-Zellen (CD3⁺) und B-Zellen (CD19⁺) definiert. Weiter wurden die T-Zellen durchflusszytometrisch aufgetrennt in CD4⁺ bzw. CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺ T-Zellen. Die CD3 negativen Lymphozyten wurden weiter nach ihrer Expression von CD16⁺/CD56⁺ als NK-Zellen quantifiziert. Regulatorische T-Zellen finden sich unter den CD4⁺ Zellen als CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Zellen (Oberflächenfärbung II).

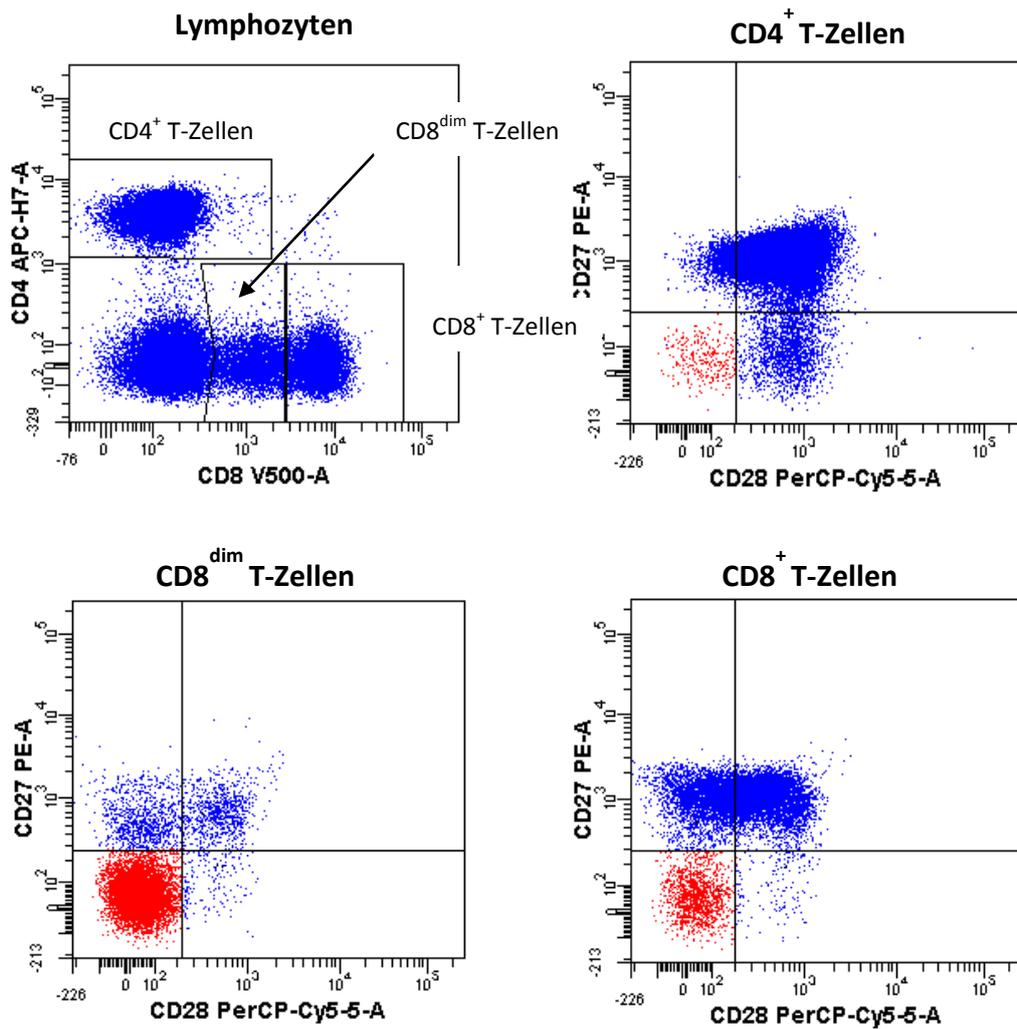


Abbildung 6. Auswertstrategie für CD27⁻CD28⁻ Lymphozyten (Oberflächenfärbung II). Die im FSC/SSC eingegrenzte Lymphozytenpopulation (Abb. 4) wurde weiter in CD4⁺, CD8⁺ und CD8^{dim} T-Zellen aufgeteilt. Weiter erfolgte die Analyse der CD27 und CD28 Expression innerhalb der jeweiligen T-Zell-Populationen. Dafür wurden die verschiedenen T-Zell Populationen weiter in die unterschiedlichen Subgruppen CD27⁻CD28⁻, CD27⁻CD28⁺, CD27⁺CD28⁺ und CD27⁺CD28⁻ aufgeteilt.

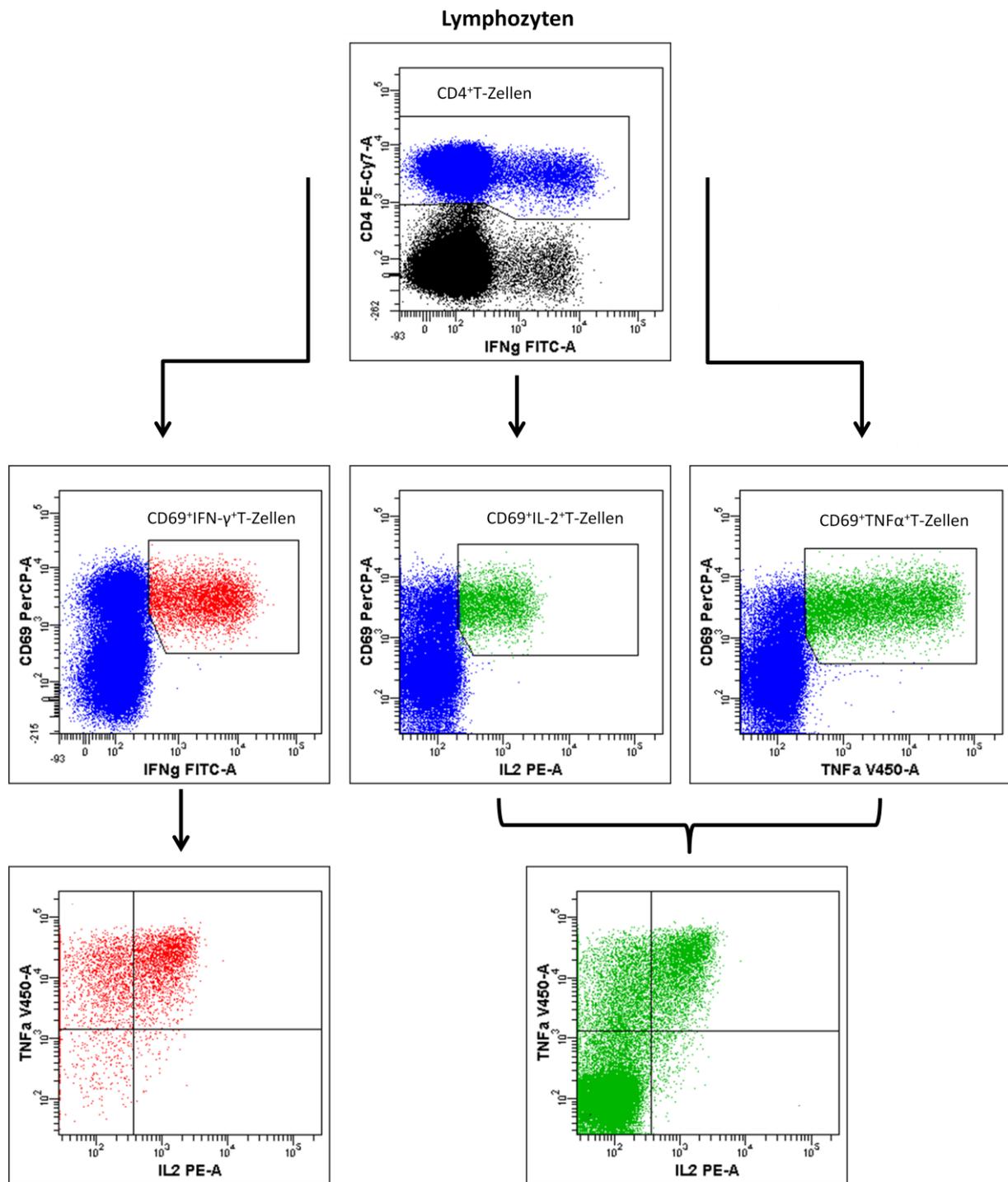


Abbildung 7. Auswertstrategie der intrazellulären IFN- γ , IL-2 und TNF α Färbung nach Vollblutstimulation. Ausgehend von der Lymphozytenpopulation (**Abb. 4**) erfolgte zunächst ein Eingrenzen der CD4⁺T-Zellen. Zur Analyse der induzierten Zytokinproduktion (CD69⁺IFN- γ ⁺) nach Antigen-spezifischer bzw. polyklonaler Stimulation wurden die Zellen weiter auf Koexpression der unterschiedlichen Zytokine analysiert und in folgende Gruppen eingeteilt: IFN- γ ⁺, IFN- γ ⁺/IL-2⁺, IFN- γ ⁺/IL-2⁺/TNF α ⁺, TNF α ⁺, IL-2⁺, TNF α ⁺IL-2⁺ und IFN- γ ⁺TNF α ⁺.

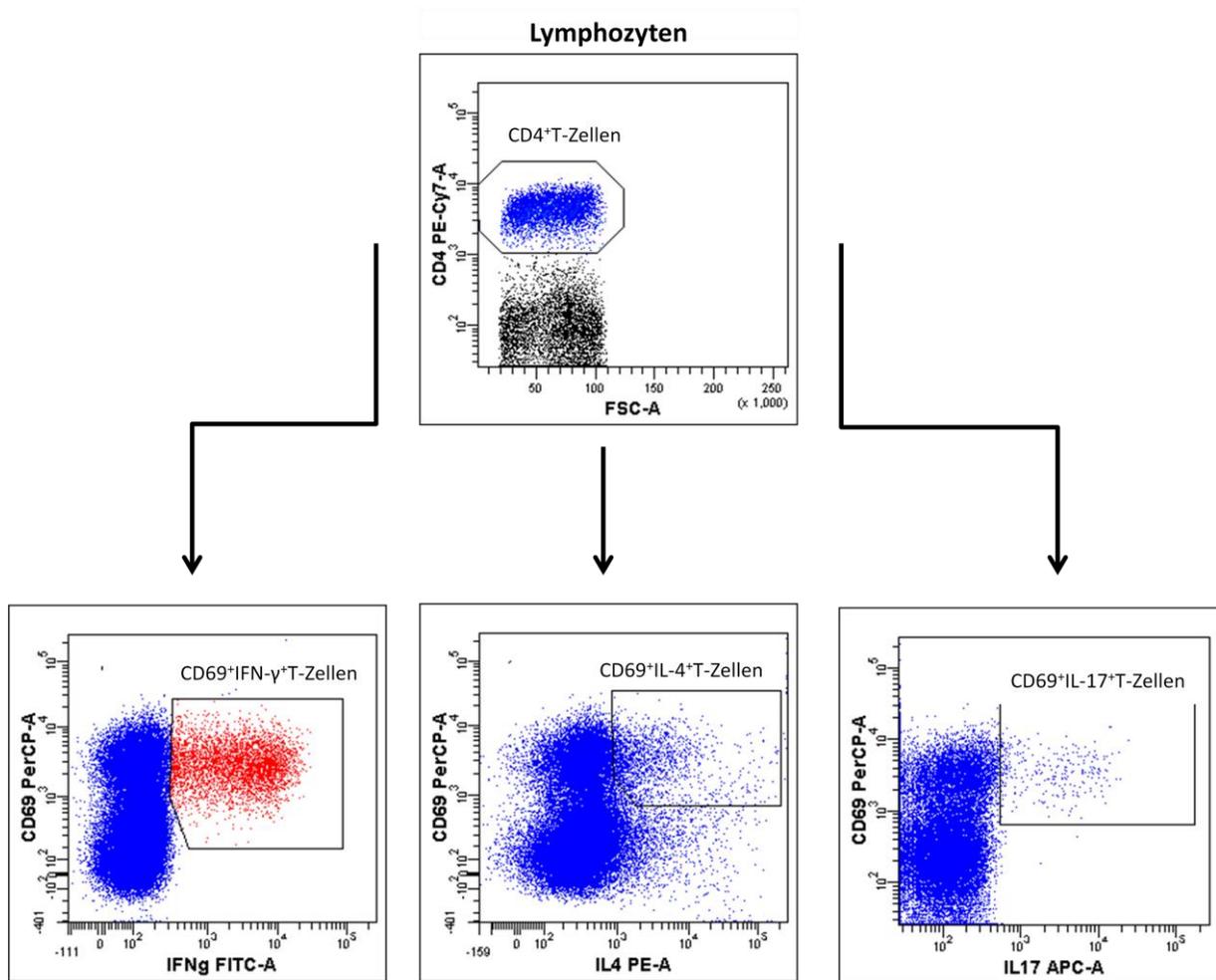


Abbildung 8. Auswertstrategie der T-Helfer-Subpopulationen Färbung nach Vollblutstimulation. Zur Analyse der unterschiedlichen T_H-Subpopulationen wurden die Zellen nach polyklonaler Stimulation mit SEB zunächst ausgehend von den vorbestimmten Lymphozyten (**Abb. 4**) auf die CD4⁺ T-Zellen eingegrenzt und nachfolgend auf die induzierte Produktion von IFN-γ, IL-4 und IL-17 sowie die Expression von CD69 untersucht.

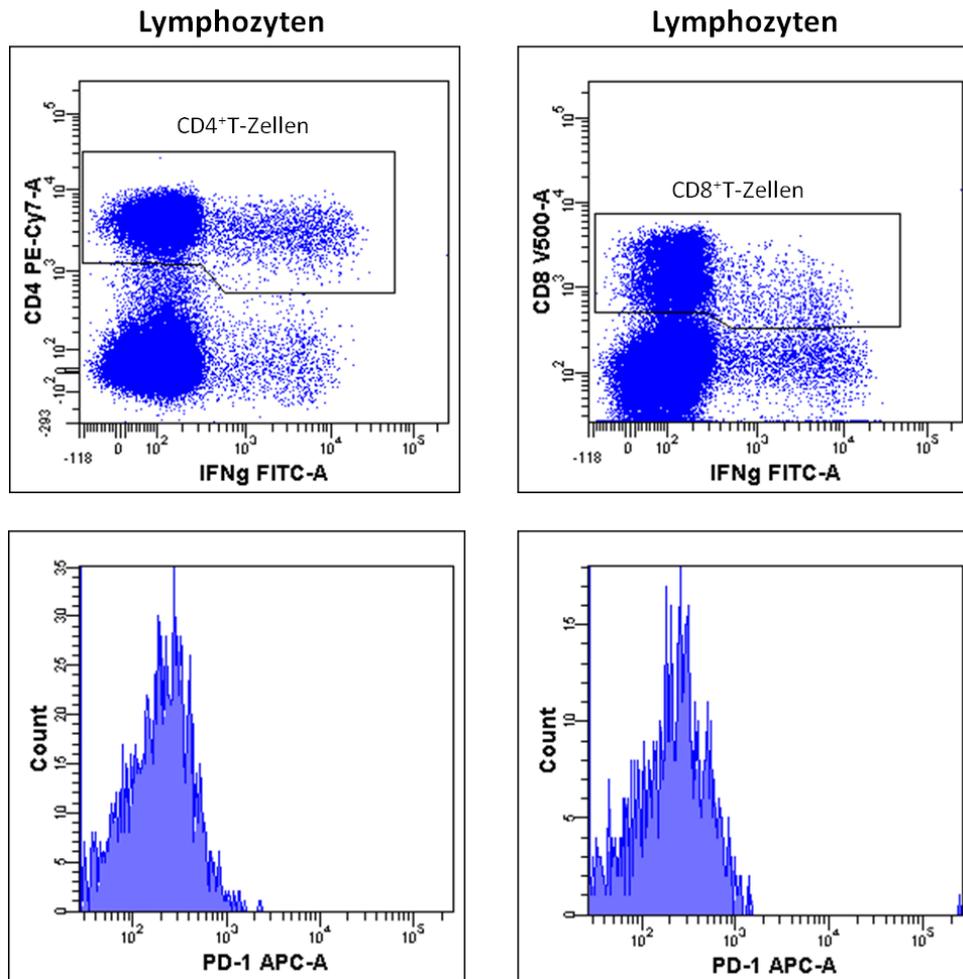


Abbildung 9. Auswertstrategie für PD1 Färbung nach Vollblutstimulation. Die zuvor definierte Lymphozytenpopulation (**Abb. 4**) wurde weiter in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eingegrenzt (obere Dotplots). Reaktive Zellen wurden analog zu Färbung I (**Abb. 8**) und II (**Abb. 9**) als CD69⁺IFN- γ ⁺ T-Zellen festgelegt. Die Analyse des PD-1 Expressionsprofils auf reaktiven Zellen erfolgt anhand der Medianen Fluoreszenz Intensität, hier als Histogramm (untere Diagramme) dargestellt.

3.6.1.3 Auswertung der Erreger-spezifischen Zellen nach Stimulation

Bei der Auswertung der Antigen-spezifisch stimulierten Zellen wurden diese zunächst als CD69⁺IFN- γ ⁺CD4⁺T-Zellen definiert. Dazu erfolgte jeweils zunächst ein Gating auf Lymphozyten ähnlich wie in **Abb. 4** dargestellt, anschließend wurden nur die CD4 positiven Zellen eingegrenzt und in einem weiteren Dotplot die Zellen nach der Expression von CD69 und IFN- γ darstellt (**Abb. 7**). Die Frequenz der Antigen-spezifischen Zellen bezieht sich jeweils auf die Grundgesamtheit der im jeweiligen Röhrchen gemessenen CD4⁺T-Zellen. Um eine Hintergrundreaktivität der Zellen zu berücksichtigen, wurde bei jeder Messung eine Negativkontrolle mitgeführt und der Anteil der reaktiven Zellen in dieser Stimulation abschließend von den Antigen-spezifischen Frequenzen abgezogen. Auch eine

Positivkontrolle mit SEB wurde stets mitgeführt um die allgemeine Reaktionsfähigkeit der Zellen beurteilen zu können. Im in **Abbildung 10** gezeigten Beispiel hat der Proband eine Frequenz von 0% reaktiven Zellen in der Negativkontrolle, 0,27% reaktive Zellen nach der Antigen-spezifischen Stimulation mit VZV-Antigen und 4,51% aktivierte Zellen nach polyklonaler Stimulation. Ab einer Frequenz von $\geq 0,05\%$ bei CMV und PPD und ab $\geq 0,02\%$ bei VZV nach Abzug der Negativkontrolle wurden die Proben als positiv beurteilt, dieser Grenzwert wurde in vorigen Studien als klinisch relevant etabliert und hat sich als solcher gut bewährt (SCHUB et al. 2015, SESTER et al. 2001). In ähnlicher Weise konnten die Zellen, welche die anderen betrachteten Zytokine (IL-2, IL-4, IL-17 und TNF α) produzieren, quantifiziert werden. Auch eine Koexpression der verschiedenen Zytokine innerhalb einer Färbung wurde durch spezifisches Gating evaluiert.

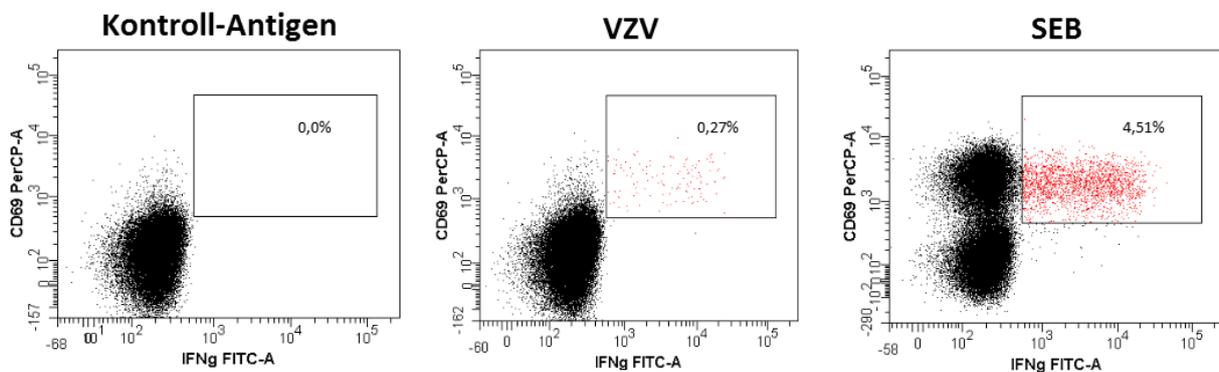


Abbildung 10. Repräsentativer Dotplot eines Kindes mit Down-Syndrom nach Antigen-spezifischer (VZV) bzw. polyklonaler Vollblutstimulation. Es erfolgte zunächst eine Eingrenzung auf Lymphozyten und weiter auf CD4⁺ T-Zellen. Die aktivierten/spezifischen Zellen wurden definiert als CD4⁺CD69⁺IFN- γ ⁺ Zellen. Ihre Frequenz wurde jeweils anteilig an den gesamten CD4⁺ T-Zellen angegeben. Hier gezeigt sind Negativkontrolle (links), Antigen-spezifische Auswertung anhand von Lysaten VZV infizierter Zellen (Mitte), und polyklonal-aktivierte Zellen mit SEB (rechts).

3.7 Quantifizierung von Antikörpern

Der quantitative Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gehört zur Gruppe der direkten Antikörperbindungstests und dient dem Nachweis spezifischer Antikörper im Probandenserum. Auf einer Mikrotiterplatte sind aufgereinigte Antigene des jeweiligen Erregers immobilisiert. Befinden sich im Probandenserum die entsprechenden Antikörper, werden diese bei Kontakt mit der Mikrotiterplatte spezifisch an die dort befindlichen Antigene binden. Anschließend können die Antikörper durch Zugabe eines zweiten enzymgekoppelten Anti-Human Antikörpers, der eine entsprechende Farbreaktion katalysiert, nachgewiesen werden.

Es wurden sowohl ein CMV-IgG als auch ein VZV-IgG ELISA mit allen Probanden außer einem Down-Syndrom Kind durchgeführt, bei dem bei begrenzter Blutmenge nicht genug Plasma zur Durchführung eines ELISA gewonnen werden konnte.

3.7.1 Durchführung

Heparinisiertes Vollblut wurde bei 3000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand (Plasma) wurde anschließend abpipettiert und bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C gelagert. Die Durchführung des Testes erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Nach Auftauen der Proben zur ELISA Durchführung wurden diese in einem Verhältnis von 1:101 mit dem im Test-Kit enthaltenen Probenpuffer verdünnt. Anschließend folgte die Überführung von je 100µl der verdünnten Patientenproben, Positiv- bzw. Negativkontrolle und der Kalibratoren auf die entsprechend mit VZV oder CMV Antigenen beschichtete Mikrotiterplatte und eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden die Reagenzgefäße der Mikrotiterplatte entleert und anschließend dreimalig mit je 300µl Waschpuffer gewaschen. Als nächster Schritt wurde jeweils 100µl des Enzymkonjugats (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG) in die Reagenzgefäße pipettiert und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren wie oben beschriebenen Waschschrift wurden je 100µl der Chromogen/Substratlösung in die Reagenzgefäße pipettiert und anschließend zur Beendigung der Farbreaktion nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Dunkeln 100µl Stopplösung zugegeben. Alle verwendeten Lösungen wurden in gleicher Reihenfolge und Geschwindigkeit auf die Mikrotiterplatte pipettiert.

3.7.2 Messung und Auswertung am multifunktionellen Plattenleser

Die photometrische Messung erfolgte direkt nach Abschluss des ELISA am multifunktionellen Plattenleser Victor X4 bei 450nm Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650nm. Die Auswertung der gemessenen Extinktionen erfolgte mit der WorkOut Software Version 2.5 sowohl quantitativ als auch semiquantitativ, die Ergebnisse wurde entsprechend der Herstellerangaben beurteilt (für VZV: VZV-IgG-Titer <80 IE als IgG-negativ, VZV-IgG-Titer zwischen 80-110 IE/l als grenzwertig und VZV-IgG-Titer>110 IE/l als positiv; Für CMV: CMV-IgG-Titer <16 RE/ml als IgG-negativ, CMV-IgG-Titer zwischen 16-22 RE/ml als grenzwertig und CMV-IgG-Titer >22 RE/ml als positiv).

3.8 Software und statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gemessenen Daten, sowie die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Graph Pad Prism Software (Version 5.02). Zum statistischen Vergleich der gemessenen Werte zwischen den beiden Probandenkollektiven wurde der nicht gepaarte und nicht parametrische Mann-Whitney-Test angewandt. Zur statistischen Analyse der Übereinstimmung von Serostatus und dem Vorhandensein einer nachweisbaren T-Zell-Immunität wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen berechnet. Korrelationskoeffizienten wurde nach Spearman berechnet. P-Werte die unter 0,05 liegen, wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

Zur Charakterisierung des Immunsystems von Kindern mit Down-Syndrom in Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern wurden 40 Probanden mit Down-Syndrom (37 Kinder, 3 junge Erwachsene) und 51 Kontrollen (46 Kinder, 5 junge Erwachsene) rekrutiert (**Tabelle 11**). Die beiden Studienkollektive wurden alters- und geschlechtsangepasst rekrutiert und die Rate an Kindern, welche in ihrer Vorgeschichte Kontakt mit dem Varizella Zoster Virus hatten, entweder im Sinne einer Impfung ($p=1,0$) oder einer früheren Infektion ($p=0,816$), unterschied sich in den beiden Gruppen nicht. Des Weiteren gab es keinen Unterschied im Prozentsatz der Kinder, welche zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen milden, respiratorischen Infekt (DS: 20,0%, K: 15,7%) durchmachten. Aufgrund der Assoziation von Down-Syndrom mit kongenitalen Herzfehlern war innerhalb der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom ein erhöhter Anteil an Kindern, welche eine offen chirurgische Intervention (DS: 50,0%, K: 15,7%, $p<0,001$) durchgemacht hatten. In Folge dessen war auch der Anteil an Kindern, die im Rahmen einer Herzoperation eine komplette oder partielle Resektion des Thymus bekommen haben bei den Kindern mit Down-Syndrom erhöht ($p<0,001$).

Tabelle 11: Charakteristika der Probandenkollektive

Studienkollektiv	Kinder mit DS	Kontrollkinder	p
Anzahl	40	51	
Alter [Jahre]	7,4 ± 1,1	8,8 ± 1,0	0,34
Geschlecht (m/w)	23/17	25/26	0,652
Respiratorische Infektion [#]	8 (20,0%)	8 (15,7%)	0,594
Varizella Zoster Virus			
Vorangegangene Infektion	10 (25,0%)	14 (27,5%)	0,816
Impfung	18 (45,0%)	23 (45,1%)	1,0
Herzfehler	30 (75,0%)	11 (21,5%)	<0,001
Herzoperation	20 (50,0%)	8 (15,7%)	<0,001

Studienkollektiv	Kinder mit DS	Kontrollkinder	p
Autoimmunphänomene*	10 (25,0%)	5 (9,8%)	0,086
Thymektomie	18 (45,0%)	6 (11,8%)	<0,001

zum Zeitpunkt der Analyse; *Autoimmunphänomene: Autoimmunthyroiditis (Hashimoto, M.Basedow), Psoriasis, Autoimmune Thrombozytopenie, Zöliakie. Geräte und Materialien. Die Tabelle wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHOCH et al. 2017).

4.2 Quantitative Analyse von Blutzell-Subpopulationen

4.2.1 Veränderte Verteilung der Lymphozytensubpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom

Die Verteilung der Leukozyten bzw. Lymphozyten und T-Zellen in ihre unterschiedlichen Subpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern wurde mittels zweier Oberflächenfärbungen (I und II) sowie der Expression charakteristischer Leitzytokine von T-Helferzellen (T_H) nach polyklonaler Stimulation mit SEB analysiert. Die Oberflächenfärbungen konnten mit dem gesamten Probandenkollektiv (n=91) durchgeführt werden, während für die Färbung der T_H -Subpopulationen nur von 87 Probanden (DS: n=37; K: n=50) ausreichend Blut zur Verfügung stand.

Zunächst wurden die Leukozytensubpopulationen im Scatterplot durch die physikalischen Eigenschaften Größe und Granularität identifiziert und ihre prozentualen Anteile quantifiziert. Weder bei den Granulozyten (DS: Median 55,59% (IQR 35,99%); K: 51,40% (IQR 28,3%)) noch bei den Monozyten (DS: Median 4,23% (IQR 4,07%); K: 5,12% (IQR 2,58%)) und Lymphozyten (DS: Median 40,02% (IQR 20,94%); K: 44,79% (IQR 17,71%)) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kindern mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern (**Abb. 11A**). Innerhalb der Lymphozytensubpopulationen, welche mittels Oberflächenfärbung I analysiert wurden, konnte bei Kindern mit Down-Syndrom jedoch ein signifikant erhöhter Anteil an NK-Zellen (Median 14,68% (IQR 8,45%)) im Gegensatz zu den Kontrollkindern (Median 8,10% (IQR 6,92%), $p < 0,001$) beobachtet werden. Demgegenüber war der B-Zell-Anteil bei Kindern mit Down-Syndrom deutlich geringer (Median 11,96% (IQR 6,72%)) als bei Kontrollkindern (Median 15,79% (IQR 12,01%), $p < 0,001$, **Abb. 11B**). Während der Gesamtanteil an T-Zellen keine messbaren Unterschiede zwischen den beiden

Kollektiven zeigte (DS: Median 68,04% (IQR 14,54%), K: 68,37% (IQR 10,35%)), waren bei Kindern mit Down-Syndrom die CD4⁺ T-Zellen mit einem medianen Anteil von 33,83% (IQR 12,16%) erniedrigt, während der mediane Anteil an CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven T-Zellen mit 0,64% (IQR 0,69%) deutlich erhöht war. Im Vergleich dazu wiesen die Kontrollkinder einen medianen, prozentualen Anteil von 38,74% (IQR 10,54%, p=0,012) CD4⁺ T-Zellen an ihrer Gesamt T-Zell-Population auf, während sie nur 0,36% (IQR 0,48%, p<0,001) doppelt positive CD4⁺CD8⁺ T-Zellen besaßen. Bei den CD8⁺ T-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (DS: Median 21,64% (IQR 15,15%), K: 20,26 (IQR 7,89%), **Abb. 11C**).

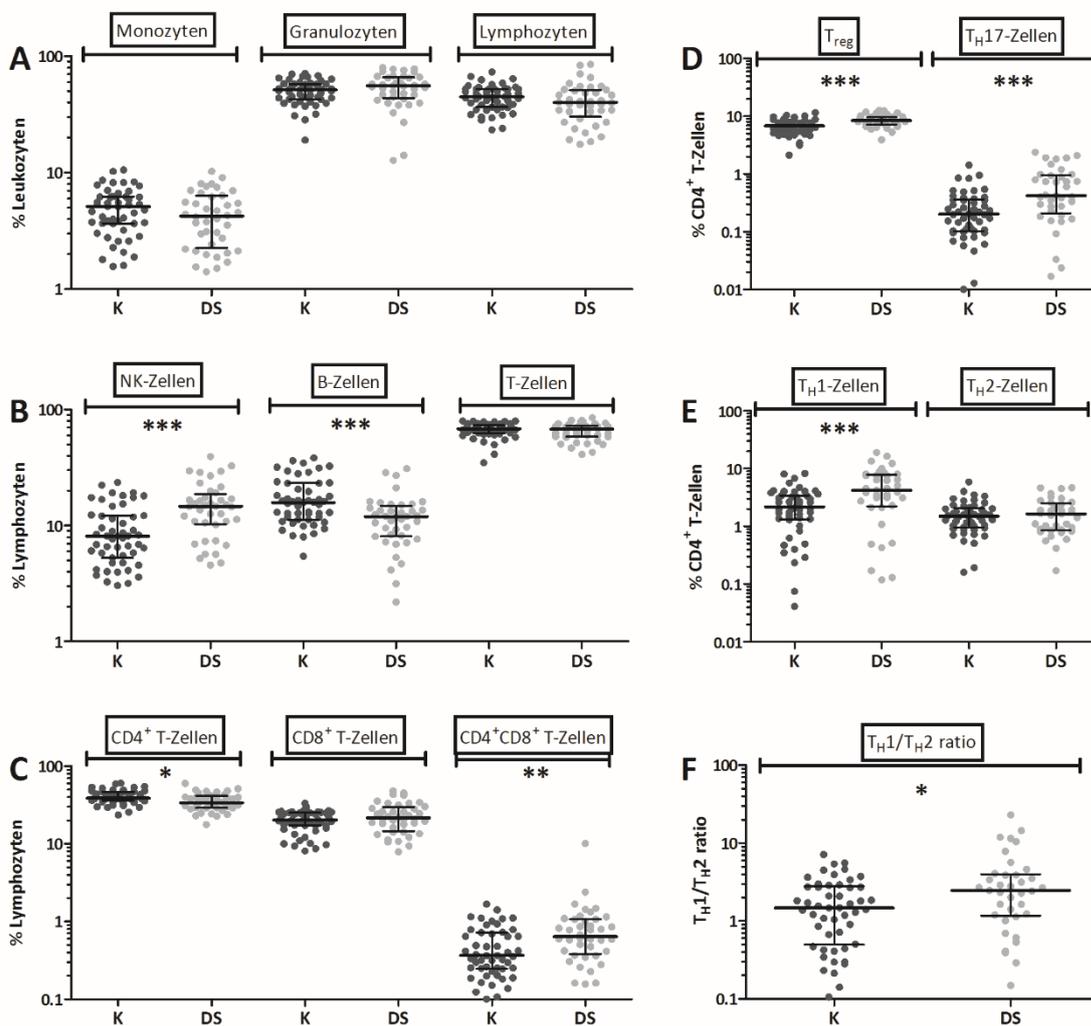


Abbildung 11. Detaillierte Analyse der Leukozyten-, Lymphozyten-, sowie T-Zell-Subpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollen. Durchflusszytometrische Analyse der **A** Monozyten-, Granulozyten- und Lymphozytenanteile an der Gesamtleukozytenzahl durch Vorwärts/Seitwärts Scatter und der **B** Anteile der Lymphozytensubpopulationen (NK Zellen, B Zellen, T Zellen) und **C** weitere Charakterisierung der T-Zell Subpopulationen in die unterschiedlichen Subpopulationen/T (CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺CD8⁺ T-Zellen) anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle. **D** Prozentsatz an regulatorische T-Zellen (Tregs: CD25⁺CD127^{low}CD4⁺ T-Zellen; K: n=51, DS: n=40; p<0,001) und TH17-Zellen (IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit SEB; K: n=50, DS: n=37; p<0,001) an CD4⁺ T-Zellen. **E** Quantifizierung von Th1 und Th2-

Zellpopulationen mit Hilfe der Expression der Zytokine IFN- γ und IL-4 nach polyklonaler Stimulation mit SEB. **F** Berechnung der T_H1/T_H2 Ratio bei 50 immungesunden Kontrollen und 37 DS Kindern ($p=0,025$). Balken repräsentieren Median und Interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. $p^*<0,05$; $p^{***}<0,001$. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHOCH et al. 2017).

Eine weitere Unterteilung der $CD4^+$ Helfer-T-Zellen wurde durch Analyse der Expression unterschiedlicher Leitzytokine nach polyklonaler Stimulation mit SEB getroffen. So produzieren T_H1 -Zellen nach polyklonaler Aktivierung IFN- γ , T_H2 -Zellen IL-4 und T_H17 -Zellen entsprechend IL-17; die jeweiligen Zytokine wurden nach Stimulation intrazellulär angefärbt (Färbung III) und durchflusszytometrisch analysiert. Zudem wurden regulatorische T Zellen (T_{reg}) durch Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD127 quantifiziert (Färbung II) (**Abb. 11C-F**).

Interessanterweise zeigten Kinder mit Down-Syndrom auch einen mit 8,51% (IQR 2,25%) deutlich höheren medianen Anteil von regulatorischen T-Zellen an der Gesamt- $CD4^+$ T-Zell Population als Kontrollkinder (6,77% (IQR 2,31%); $p<0,001$, **Abb. 11D**). Zusätzlich ließen sich bei Kindern mit Down-Syndrom signifikant erhöhte Anteile an T_H17 -Zellen (DS: Median 0,42% (IQR 0,75%), K: 0,20% (IQR 0,26%), $p<0,001$), und T_H1 -Zellen detektieren (DS: Median 4,21% (IQR 5,61%); K: 2,175% (IQR 2,13%); $p<0,001$). Die T_H2 Populationen unterschieden sich in den beiden Kollektive jedoch nicht voneinander (DS Median 1,65% (IQR 1,65); K: 1,51% (IQR 1,10%); $p=0,82$, **Abb. 11E**). Anschließend wurde die T_H1/T_H2 Ratio berechnet, die ein signifikant erhöhtes Verhältnis von T_H1 - zu T_H2 -Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom zeigte (DS: Median 2,47 (IQR 2,84); K: 1,48 (IQR 2,27); $p=0,025$, **Abb. 11F**).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Kinder mit Down-Syndrom eine verhältnismäßige Verschiebung ihrer Lymphozytensubpopulationen zugunsten der NK-Zellen und einem geringeren Anteil an B-Zellen zeigen. Des Weiteren scheint innerhalb der T-Helfer-Subpopulationen ein verschobenes Zellgleichgewicht von der anti-inflammatorischen (T_H2 -Zellen, regulatorische T-Zellen) zur pro-inflammatorischen (T_H1 -Zellen, T_H17 -Zellen) Immunantwort im Vergleich zu immungesunden Kindern vorzuherrschen.

4.2.2 Einfluss von Thymektomie auf die T-Zell-Populationen von Kindern mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern

Da Thymektomie einen nachweislichen Einfluss auf lymphozytäre Subpopulationen hat (PRELOG et al. 2009, ZLAMY et al. 2009), wurde der Einfluss der neonatalen Thymektomie

auf die anteilmäßige Verschiebung der Lymphozytensubpopulationen in unserer Studienpopulation untersucht. Hierzu wurden die gemessenen Daten in Abhängigkeit des Vorliegens einer Teil- bzw. Komplettresektion des Thymus (DS-: n=18, K-: n=6) stratifiziert.

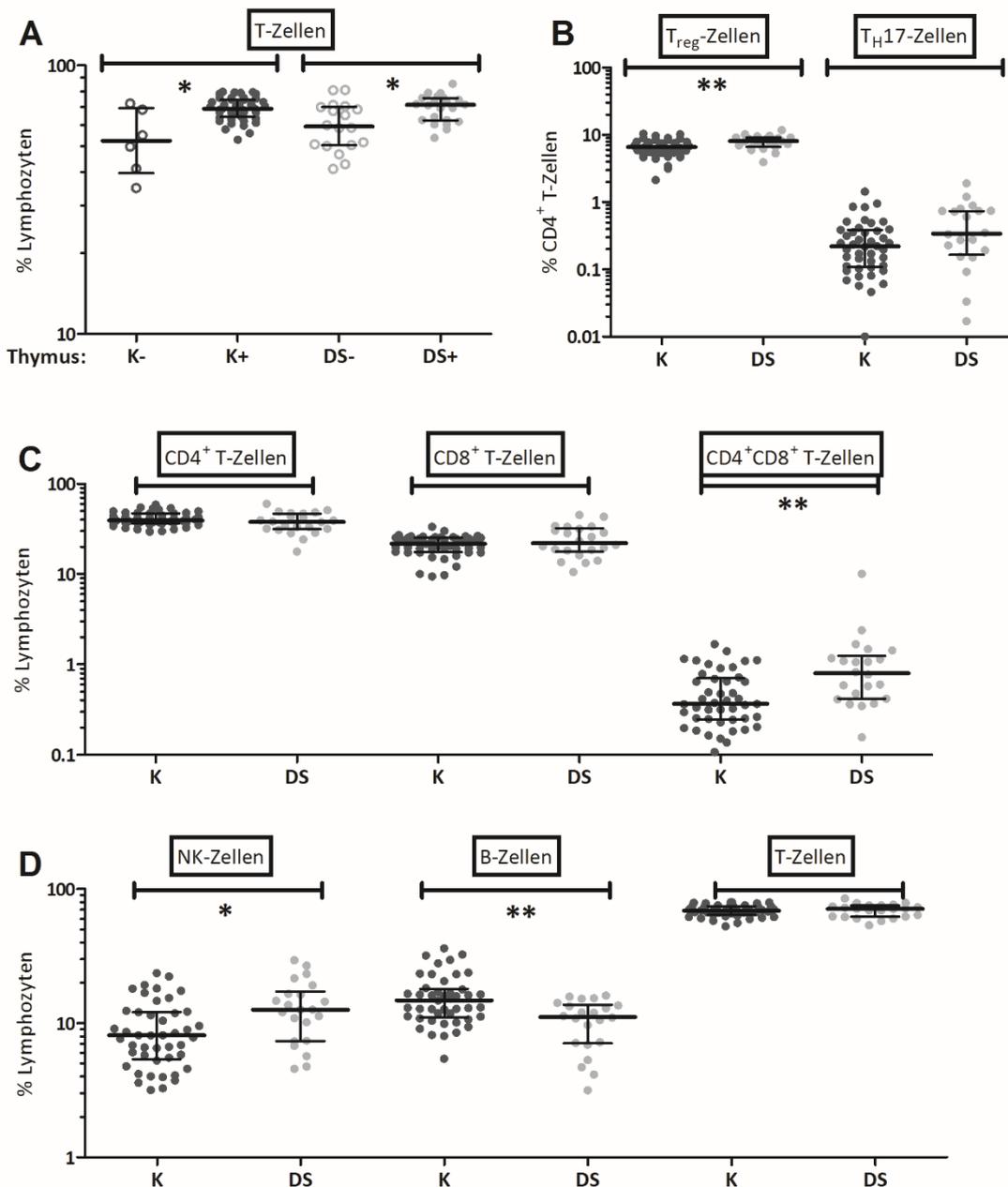


Abbildung 12. Einfluss von neonataler Thymektomie auf die Gesamt-T-Zellen und T-Zell-Sub-Populationen. **A** Sowohl bei Kindern mit Down-Syndrom als auch in der Kontrollgruppe war der prozentuale Anteil der Gesamt-T-Zellen bei neonataler Thymektomie (DS-, K-) geringer. **B-D** In der Subgruppenanalyse nicht-thymektomierter Kinder mit Down-Syndrom im Vergleich zu nicht-thymektomierten Kontrollkindern blieben die Unterschiede der verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der Lymphozyten und T-Zellen weiterhin bestehen und die Thymektomie hatte einen verstärkenden Effekt auf die Unterschiede bezüglich der regulatorischen T-Zellen und T_H2 -Zellen. Balken repräsentieren Median und Interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHOCH et al. 2017).

Wie erwartet war die Anzahl der Kinder mit einem angeborenen Herzfehler (DS: 75%, K: 21,5%; $p < 0,001$), gefolgt von einer notwendigen offenen Herzoperation (DS: 50%, K: 15,7%; $p < 0,001$) und damit einhergehend einer Teil- oder Komplettresektion des Thymus (DS: 45%, K: 11,8%; $p < 0,001$) in der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom signifikant höher (siehe **Tabelle 1**). Diese Beobachtungen sind auf die starke Assoziation von Trisomie 21 und dem Auftreten von kongenitalen Herzfehlern zurückzuführen. Erwartungsgemäß ließ sich in unserer Studienpopulation ein Einfluss von neonataler Thymektomie auf die T-Zell-Population sowohl in der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom (DS-: Median 59,82% (IQR 19,81%); DS+ 70,23% (IQR 14,11%), $p = 0,04$) als auch bei den immungesunden Kontrollkindern (K-: Median 52,34% (IQR 29,55%), K+ 68,97% (IQR 10,17%), $p = 0,016$), nachweisen (**Abb. 12A**). Um den Einfluss des Down-Syndroms unabhängig von der Thymektomie zu analysieren, wurden im Folgenden lediglich nicht-thymektomierte Kinder betrachtet. In der Subgruppenanalyse nicht-thymektomierter Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu nicht-thymektomierten Kontrollkindern blieben die Unterschiede bezüglich den anteiligen Populationen an B-Zellen ($p = 0,002$), NK-Zellen ($p = 0,01$), $CD4^+CD8^+$ T-Zellen ($p = 0,002$) sowie regulatorischen T-Zellen ($p = 0,007$) als signifikant bestehen (**Abb. 12**). Neonatale Thymektomie scheint zudem innerhalb der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom noch einen weiter verstärkenden Effekt auf den erhöhten Prozentsatz regulatorischer T-Zellen ($p = 0,036$), sowie einen erhöhenden Effekt auf den Anteil an T_H2 -Zellen zu haben ($p = 0,029$, Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen lässt sich ein allgemeiner Effekt von neonataler Thymektomie auf die T-Zell-Population schlussfolgern, während bei Kindern mit Down-Syndrom die prozentualen Unterschiede in den Zellverteilungen von Lymphozyten- und T- bzw. T_H -Subpopulationen hierdurch noch deutlicher zum Vorschein kamen.

4.3 Phänotypische Charakterisierung der Lymphozytensubpopulationen

4.3.1 Erhöhte Expression des Anergemarkers PD1 bei Kindern mit Down-Syndrom

Nach der quantitativen Analyse der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen folgte eine weitere Charakterisierung der Expression des Anergemarkers PD-1, um phänotypische Anzeichen einer funktionellen Anergie zu evaluieren. Die PD-1 Expression auf Lymphozyten sowie auf T-Zell-Subpopulationen (Treg, CD4 und CD8 T-Zellen) wurde über die mediane Fluoreszenz-Intensität (MFI) quantifiziert (**Abb. 13**).

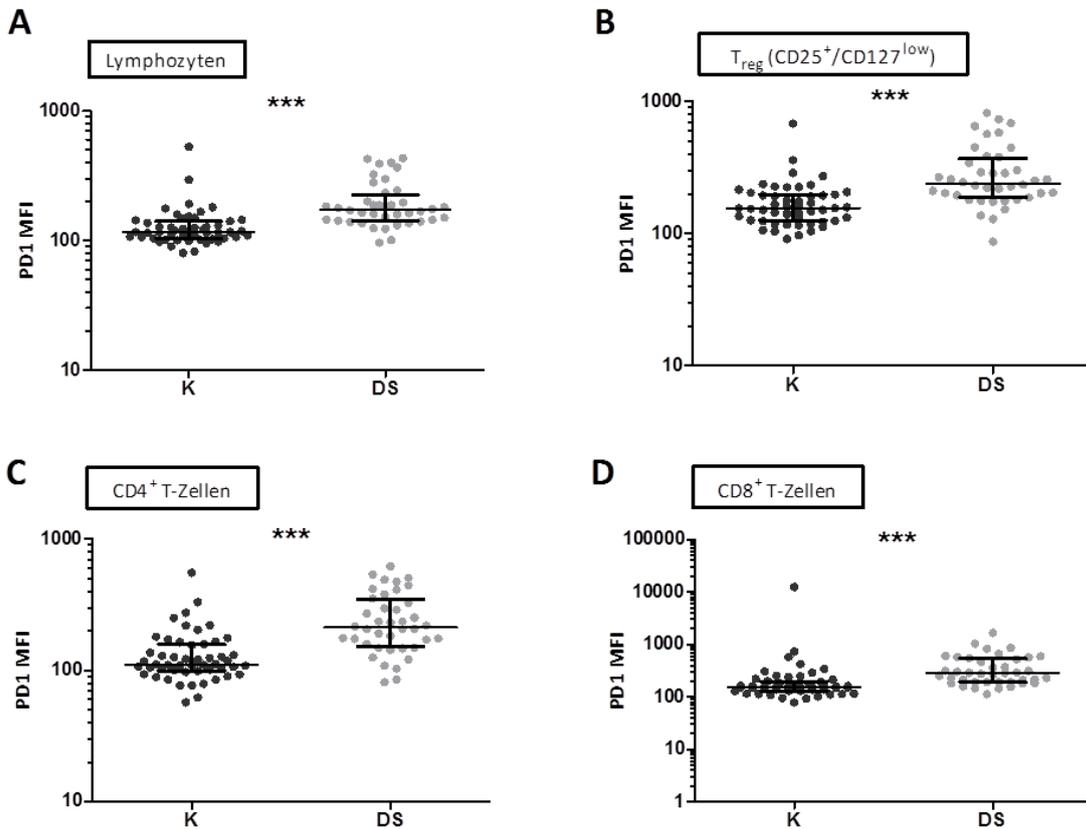


Abbildung 13. Expressionsanalyse des Anergiemarkers PD-1 mittels medianer Fluoreszenz Intensität (MFI) auf unterschiedlichen Zellpopulationen. A-D Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen (A Lymphozyten gesamt, B Regulatorische T-Zellen (CD25⁺/CD127^{low}), C CD4⁺ T-Zellen und D CD8⁺ T-Zellen) durch die Expression des Oberflächenmoleküls PD-1 anhand der medianen Fluoreszenz Intensität (MFI). Balken repräsentieren Median und Interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. p***<0,001. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHUCH et al. 2017).

Interessanterweise zeigten Kinder mit Down-Syndrom eine signifikant erhöhte Expression des Anergiemarkers PD-1 nicht nur auf Gesamtlymphozyten (p<0,001), sondern auch auf regulatorischen T-Zellen (p<0.001), CD4⁺ Zellen (p<0.001) und CD8⁺ T-Zellen (p<0.001). (**Abb. 13**). Diese Ergebnisse waren unabhängig von einer Thymektomie (Daten nicht gezeigt).

Unsere Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Anergie der Lymphozyten und wichtigsten T-Zell-Subpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern hin.

4.3.2 CD27/CD28 Expression in Abhängigkeit des CMV-Serostatus auf T-Zellpopulationen

Eine latente CMV Infektion ist assoziiert mit einer erhöhten Frequenz zirkulierender, end-differenzierter CD4⁺ T-Zellen, die sich durch das Fehlen sowohl des kostimulatorischen

Oberflächenmoleküls CD28 als auch des Oberflächenmoleküls CD27 auszeichnen. Auf Basis früherer Studien unserer Arbeitsgruppe bei Erwachsenen hat sich ein Prozentsatz von >0,44% CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen als diagnostisches Mittel zur Diagnose einer CMV-Infektion etabliert, während CD27⁺CD28⁺CD8⁺ T-Zellen nicht geeignet waren (DIRKS et al. 2013). Im Folgenden wurde analysiert, inwieweit die Population an CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom und Kontrollkindern zur Definition des CMV-Serostatus geeignet ist. Sowohl in der Gruppe der CMV seronegativen Kinder (p=0.0603) als auch in der Gruppe der seropositiven Kinder (p=0.121) lässt sich ein erhöhter Prozentsatz an CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom erkennen (**Abb. 14**). Diese Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz, was besonders bei den seropositiven Kindern vermutlich auf die geringen Fallzahlen zurückzuführen sein könnte. CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen waren zur Identifizierung eines positiven CMV Serostatus geeignet. In unseren Messungen liegt nur ein CMV-seropositives Kontrollkind mit einer Frequenz von 0,34% an CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen knapp unterhalb der definierten Nachweisgrenze, so dass sich insgesamt eine Sensitivität von 93,33% ergibt. Die Spezifität lag insgesamt bei 88,16%. Diese unterschied sich nicht zwischen Kindern mit Down-Syndrom und Kontrollkindern.

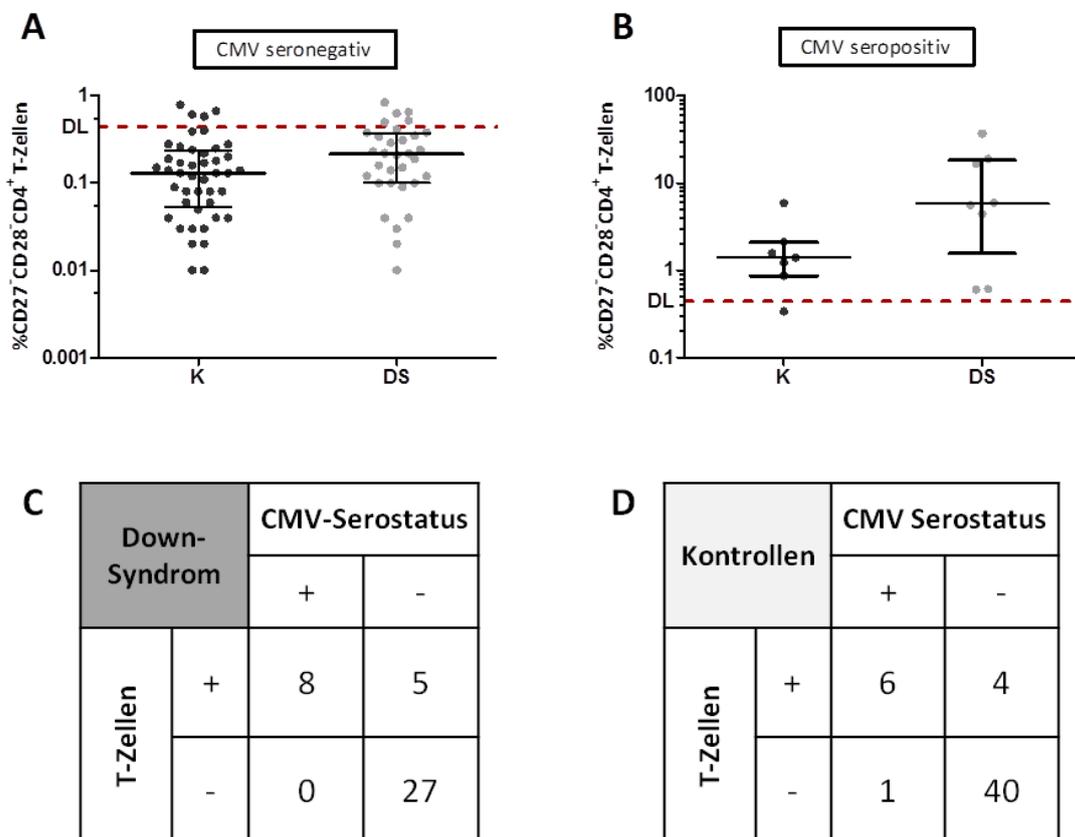


Abbildung 14. Expression von CD27 und CD28 auf CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom CMV Serostatus. **A, B** Weder in der Gruppe der CMV seronegativen noch der seropositiven Kinder lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studienkollektiven nachweisen, auch wenn eine Tendenz zur erhöhten Anzahl an CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom erkennbar ist. Die Nachweisgrenze (DL) für den Anteil CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen zur Identifizierung eines positiven CMV-Status auf Basis von Erwachsenen liegt bei 0,44%. Balken repräsentieren Median und Interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. **C, D** Vergleich der Übereinstimmung des CMV-Serostatus mit dem Vorliegen von CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen über der Nachweisgrenze anhand einer 4-Felder-Tafel für Kinder mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern (DS: $\kappa=0,68$; K: $\kappa=0,71$). Zur statistischen Analyse wurde der κ -Koeffizient nach Cohen berechnet.

Kinder mit Down-Syndrom scheinen somit unabhängig vom CMV Serostatus zu einem erhöhten Anteil an CD27⁺CD28⁺CD4⁺ T-Zellen zu neigen, was für eine vermehrte Enddifferenzierung zum Memory-Phänotyp spricht.

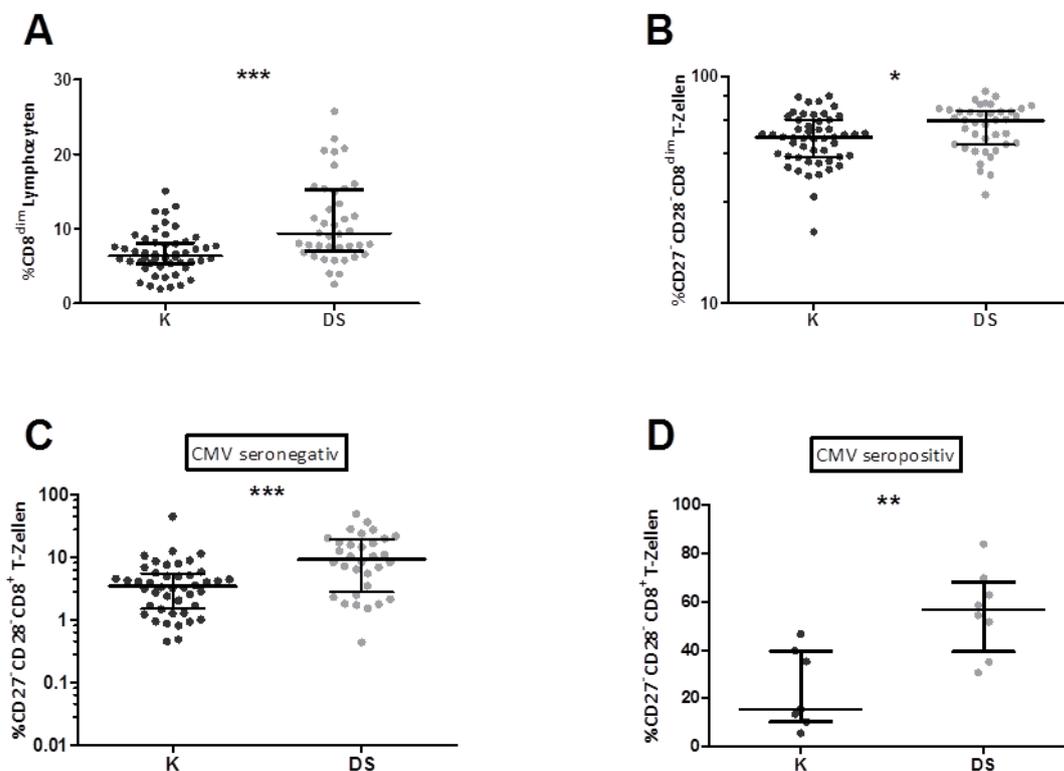


Abbildung 15. Analyse enddifferenzierter CD27⁺CD28⁻ Zellpopulationen innerhalb von CD8⁺ und CD8^{dim} Zellen. **A, B** Beim Gating der CD8⁺ Zellen war bei Kindern mit Down-Syndrom eine erhöhte Anzahl an CD8^{dim} Zellen festzustellen, in welcher wiederum ein erhöhter Anteil an CD27⁺CD28⁻ Zellen bei den Kindern mit Down-Syndrom nachgewiesen werden konnte. **C, D** Sowohl innerhalb der CMV seronegativen als auch der seropositiven Gruppe weisen Kinder mit Down-Syndrom eine erhöhte Frequenz an CD27⁺CD28⁻ enddifferenzierten Zellen innerhalb ihrer CD8⁺ Zellen auf. Balken repräsentieren Median und interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$.

Die weitere Betrachtung enddifferenzierter Zellen mit dem Phänotyp CD27⁺CD28⁻ erfolgte innerhalb der Population der CD8⁺ und CD8^{dim} Zellpopulationen mit der Vermutung auch hier

einen erhöhten Anteil enddifferenzierter CD27⁻CD28⁻ in der Gruppe der Kindern mit Down-Syndrom nachweisen zu können. CD8^{dim} Zellen exprimieren zwar CD8, jedoch in einem geringeren Ausmaß als die deutlich CD8 exprimierenden T-Zellen (**Abb. 6**). Bei Kindern mit Down-Syndrom waren anteilig an den Gesamtlymphozyten signifikant mehr CD8^{dim} Zellen zu beobachten als bei Kontrollkindern ($p < 0.001$, **Abb. 15A**). Innerhalb der CD8^{dim} Zellen zeigte sich, dass die meisten Zellen unabhängig vom CMV Serostatus den CD27⁻CD28⁻ Phänotyp aufwiesen. Der prozentuale Anteil dieser Zellen war jedoch bei den Kindern mit Down-Syndrom signifikant höher ($p = 0,017$, **Abb. 15B**). Auch innerhalb der stärker CD8 exprimierenden CD8⁺ Zellen zeigten sich sowohl bei den CMV Seropositiven ($p = 0,009$), als auch bei den CMV Seronegativen ($p < 0,001$) ein erhöhter Anteil CD27⁻CD28⁻ Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom (**Abb. 15 C, D**).

Das deutlich erhöhte Vorkommen des enddifferenzierten Phänotyps mit Verlust der kostimulatorischen Moleküle CD27 und CD28 ist innerhalb der CD4⁺ Zellen nahezu pathognomonisch für das Vorliegen einer latenten CMV Infektion. Betrachtet man jedoch andere Zellgruppen wie CD8⁺ oder CD8^{dim} Zellpopulationen, konnten wir einen erhöhten Anteil CD27⁻CD28⁻ Zellen hauptsächlich in der Gruppe von Kindern mit Down-Syndrom finden, was für eine übermäßige Reifung bis hin zur vorzeitigen Alterung der Zellen dieser Kinder spricht.

4.4 Funktionelle Charakterisierung der Effektor T Zellen

Für die umfassende Charakterisierung der zellulären Immunantwort analysierten wir weiter die Funktionalität der Effektor T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern. Dafür betrachteten wir zunächst die allgemeine Reaktivität durch detaillierte Analyse der Stimulierbarkeit von CD4⁺ und CD8⁺ Effektor T-Zellen durch den polyklonalen Stimulus SEB im Hinblick auf Frequenz, Zytokinexpression und Expression von Anergiemarkern (PD-1, CTLA-4) der reaktiven Zellen. Des Weiteren evaluierten wir die Antigen-spezifische Immunantwort unter Einbeziehung des entsprechenden Serostatus (CMV, VZV).

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der funktionellen Analyse Antigen-spezifisch und polyklonal stimulierter T Zellen gezeigt. Eine Negativkontrolle mit Lysat nicht infizierter Zellen wurde stets mitgeführt, des Weiteren diente die polyklonale Stimulation

mit SEB nicht nur zur Evaluation der allgemeinen Reaktivität, sondern entsprach gleichzeitig der mitgeführten Positivkontrolle. Aufgrund der begrenzten Blutmenge konnte diese Serie von Experimenten lediglich mit 87 von 91 Probanden durchgeführt werden (DS: n=37, K: n=50).

4.4.1 Erhöhte Frequenz reaktiver Effektor T-Zellen nach polyklonaler Stimulation bei Kindern mit Down-Syndrom

Um den Einfluss der phänotypischen Veränderungen der Lymphozyten- und T-Zell-Populationen auf den Aktivitätsstatus der Effektor T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom zu analysieren, wurde die Funktionalität der Effektor T-Zellen untersucht. Zur Beurteilung der allgemeinen Reaktivität von Effektor T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern, wurde die Induktion von Effektorzytokinen (IFN- γ , TNF α , IL-4, IL-2, IL-17) und die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 nach polyklonaler Stimulation mit dem Superantigen SEB untersucht. Reaktive Effektor T-Zellen sind normalerweise in der Lage multiple Zytokine zu koexprimieren (**Abb. 16**). Für die funktionelle Analyse individueller Koexpressionsprofile haben wir zusätzlich zwischen 7 Kombinationsmöglichkeiten der Zytokinexpression einer einzelnen Zelle unterschieden: IFN- γ^+ , IFN- γ^+ /IL-2 $^+$, IFN- γ^+ /IL-2 $^+$ /TNF α^+ , TNF α^+ , IL-2 $^+$, TNF α^+ IL-2 $^+$ und IFN- γ^+ TNF α^+ .

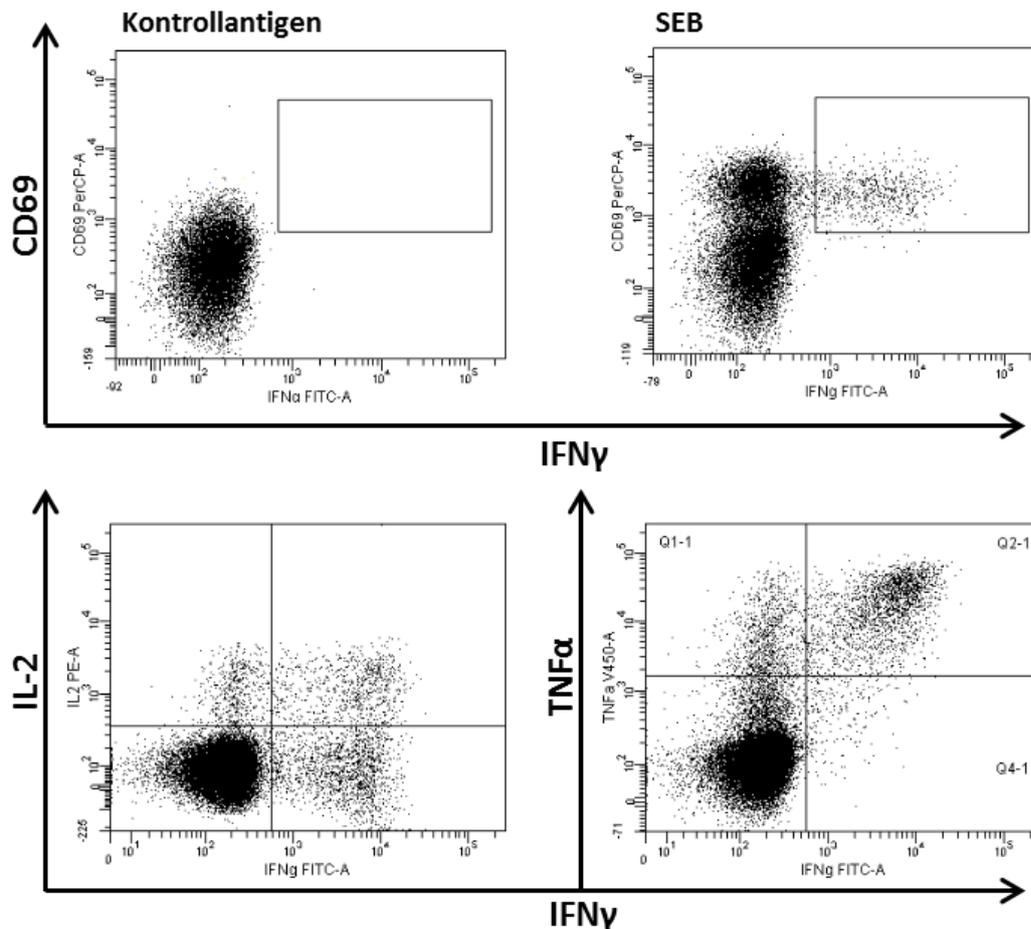


Abbildung 16. Typischer Dotplot Zytokin-produzierender CD4⁺T-Zellen nach Stimulation von Vollblut eines repräsentativen Kindes mit Down-Syndrom. Reaktive CD69⁺CD4⁺T-Zellen koexprimieren nach Stimulation verschiedene Zytokine (IFN- γ , TNF α , IL-2). Hier dargestellt ist die Koexpression von CD69 und IFN- γ (oben rechts) nach polyklonaler Stimulation mit SEB, sowie die Koexpression von IL-2 und TNF α (untere Plots). Die Negativkontrolle ist links oben dargestellt. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHOCH et al. 2017).

Lediglich ein Kontrollkind zeigte eine CD4⁺CD69⁺IFN- γ ⁺ T-Zell-Frequenz, die nach polyklonaler Stimulation unter der Nachweisgrenze von 0,05% lag. Dieses Kind war noch sehr jung und so liegt die Annahme nahe, dass hier die IFN- γ Produktionsfähigkeit der Effektor T-Zellen noch nicht komplett ausgereift war. Generell waren die medianen Frequenzen reaktiver CD4⁺ Effektor T-Zellen in Kindern mit Down-Syndrom (4,25% (IQR 5,25%)) signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (2,12% (IQR 2,77%), $p < 0,001$). Dieser Unterschied in der Frequenz SEB-reaktiver Zellen scheint jedoch spezifisch für die CD4⁺ Effektor T-Zellen und lässt sich in den reaktiven CD8⁺IFN- γ ⁺CD69⁺ T-Zellen nach polyklonaler Stimulation nicht detektieren (DS: Median 3,15% (IQR 6,68%), K: 3,86% (IQR 6,07%), $p = 0,947$, **Abb. 17A**). Somit beschränkten wir uns für unsere weiteren Analysen auf die detaillierte Untersuchung

der CD4⁺ Effektor T-Zellen. Wir beschäftigten uns zunächst mit der Frage, ob dieser Unterschied der allgemeinen T-Zell-Reaktivität altersabhängig ist und sich in den verschiedenen Altersgruppen unterschiedlich stark zwischen den beiden Gruppen unterscheidet: Hierfür wurden vier verhältnismäßig ausgeglichene Altersgruppen aus unserem Studienkollektiv verglichen. Nach dem ersten Lebensjahr zeigten Kinder mit Down Syndrom aller Altersgruppen höhere Frequenzen an reaktiven Effektor T-Zellen. Auch die Daten der jüngeren Gruppe weisen die gleiche Tendenz zu höheren Frequenzen in der Gruppe mit Down-Syndrom auf, jedoch wird hier wahrscheinlich aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistische Signifikanz erreicht (DS: Median 0,48% (IQR 1,16%); K 0,17% (IQR 2,77%), $p=0,073$, **Abb. 17B**).

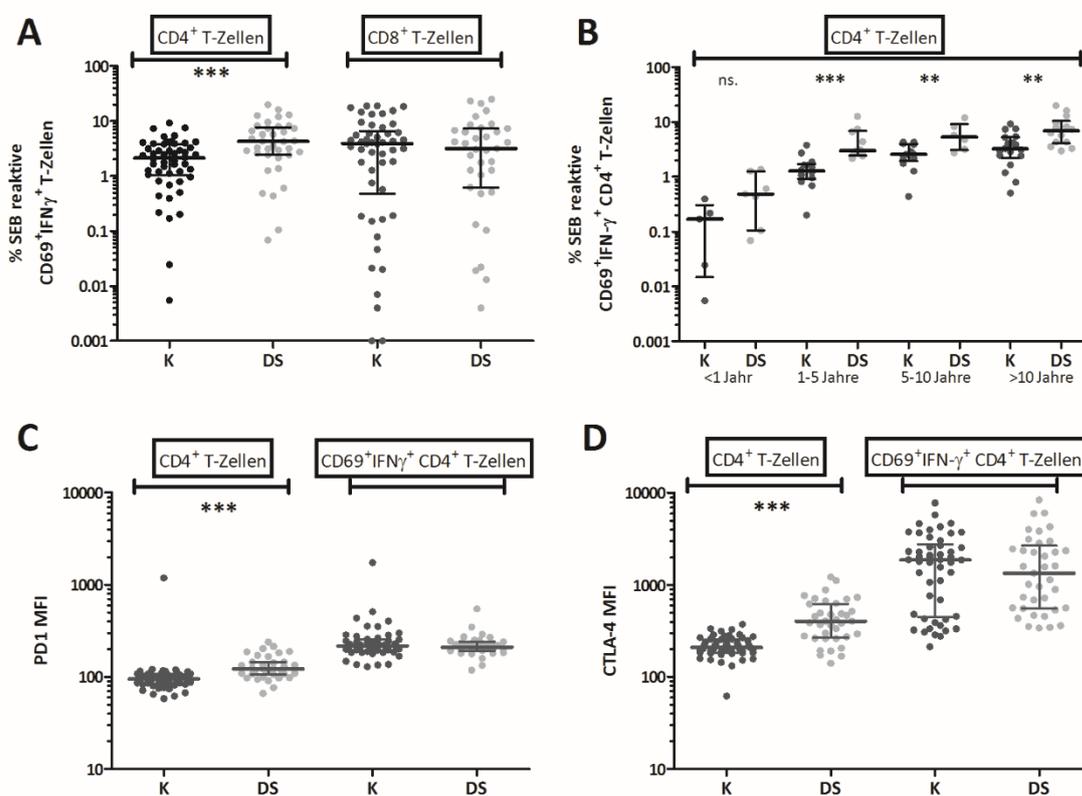


Abbildung 17. Funktionelle und phänotypische Analyse reaktiver Zellen nach polyklonaler Stimulation mit SEB. **A** Erhöhte Frequenz IFN- γ -produzierender CD69⁺CD4⁺T-Zellen nach polyklonaler Stimulation bei Kindern mit DS ($p=0,001$), die Frequenz SEB-reaktiver CD8⁺ T-Zellen unterscheidet sich in den beiden Gruppen nicht. **B** Zur Analyse nach Altersgruppen wurden vier verschiedene Altersspannen definiert und die Kinder nach diesen eingeteilt (Kinder im ersten Lebensjahr (DS: $n=7$, K: $n=5$), Kinder von 1-5 Jahren (DS: $n=10$, K: $n=14$), Kinder von 5-10 Jahren (DS: $n=6$, K: $n=13$), Jugendliche und junge Erwachsene über 10 Jahren (DS: $n=14$, K: $n=18$)). Kinder mit Down-Syndrom zeigen eine signifikant erhöhte Frequenz reaktiver Zellen in allen Altersgruppen nach dem 1. Lebensjahr. Bei jüngeren Kindern zeichnet sich eine ähnliche Tendenz ab, aber die Unterschiede erreichen keine statistische Signifikanz ($p=0,072$). **C, D** Erhöhte Expression der Anergienmarker PD-1 und CTLA-4 ist bei Kindern mit DS nur allgemein auf den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, nicht aber auf den reaktiven Zellen (CD69⁺IFN- γ ⁺CD4⁺ oder CD69⁺IFN- γ ⁺CD8⁺T-Zellen) nach Stimulation nachweisbar. Balken repräsentieren Median und

interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHOCH et al. 2017).

Nach der quantitativen Analyse der Reaktivität erfolgte weiter die phänotypische Charakterisierung von Effektor T-Zellen in Kindern mit Down-Syndrom und Kontrollkindern: Interessanterweise zeigten die Kinder mit Down-Syndrom auf ihren reaktiven $CD69^+IFN-\gamma^+CD4^+$ T-Zellen keine erhöhte Expression der Anergiemarker PD-1 und CTLA-4 im Vergleich zu den in der Oberflächenfärbung auf Lymphozyten und $CD4^+$ T-Zellen im allgemeinen gesehenen Unterschieden (**Abb. 17C, D**). Auch die medianen Fluoreszenzintensitäten und damit die Menge an produzierten Zytokinen ($IFN-\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-2$) unterschieden sich im Vergleich zu den Kontrollkindern nicht (**Daten nicht gezeigt**).

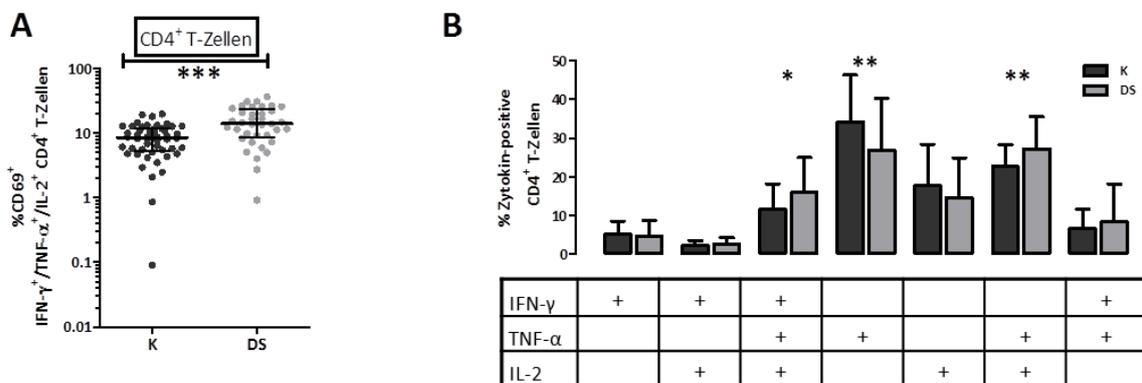


Abbildung 18. Moderate Veränderungen des Zytokinexpressionsprofils von Effektor T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom. **A** Auch unter Einschluss anderer Zytokine zur Charakterisierung von Effektor T Zellen ($IFN-\gamma$ und/oder $IL-2$ und/oder $TNF\alpha$) bleibt bei Kindern mit Down-Syndrom eine erhöhte Frequenz polyklonal aktivierbarer Zellen bestehen. **B** Zur Analyse des individuellen Expressionsprofils werden 7 mögliche Kombinationsmöglichkeiten der Zytokinexpression unterschieden: $IFN-\gamma^+$, $IFN-\gamma^+/IL-2^+$, $IFN-\gamma^+/IL-2^+/TNF\alpha^+$, $TNF\alpha^+$, $IL-2^+$, $TNF\alpha^+IL-2^+$ und $IFN-\gamma^+TNF\alpha^+$ (DS: n=37, K: n=50). Balkendiagramme repräsentieren jeweils Median und Interquartil Range. Balken repräsentieren Median und interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHOCH et al. 2017).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die erhöhte Frequenz reaktiver Zellen nicht nur in Bezug auf die $IFN-\gamma$ Produktion als Read-out nachzuweisen ist, sondern auch bei der allgemeinen Betrachtung aller Zytokin-positiver ($IFN-\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-2$) $CD69^+CD4^+$ T-Zellen nach polyklonaler Stimulation bei Kindern mit Down-Syndrom signifikant erhöht ist (DS: Median 13,98% (IQR 14,38%); K 8,48% (IQR 6,407), $p < 0,001$, **Abb. 18A**). Beim Vergleich der Zytokinexpressionsmuster (**Abb. 18B**) zwischen Kindern mit Down-Syndrom und den immunkompetenten Kontrollkindern lassen sich geringfügige Unterschiede feststellen: So

neigen Effektor T-Zellen bei Kinder mit Down-Syndrom vermehrt zur multifunktionellen Zytokinexpression aller drei betrachteten Zytokine (DS: Median 15,23% (IQR 11,82%); K: 11,30% (IQR 8,93%), $p=0,027$), sowie zu einer Koexpression von $\text{TNF}\alpha$ und IL-2 (DS: Median 27,13% (IQR 10,08%); K: 23,71% (IQR 7,45%), $p=0,002$) während bei den Kontrollkindern die Monoexpression von $\text{TNF}\alpha^+$ (DS: Median 23,80% (IQR 18,91%); K: 32,92% (IQR 15,41%), $p=0,004$) überwiegt.

Schlussfolgern lässt sich aus diesen Ergebnissen, dass Kinder mit Down-Syndrom in der Lage sind eine phänotypisch und funktionell mit der Kontrollgruppe vergleichbare Effektor T-Zell-Immunität aufzubauen, wohingegen eine vermehrte Frequenz dieser Zellen nötig zu sein scheint um eine adäquate Pathogenkontrolle sicherstellen zu können. Die Unterschiede im Zytokinexpressionsmuster der Effektor T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom nach polyklonaler Stimulation sind nur schwach ausgeprägt und lassen keine Rückschlüsse auf eine eingeschränkte Funktionalität dieser Zellen zu. Gestützt wird diese Aussage dadurch, dass sich auch die Menge der induzierten Zytokine gemessen an der MFI (**Daten nicht gezeigt**) in den beiden Gruppen nicht signifikant unterscheidet. Somit unterscheiden sich die funktionell und phänotypisch unauffälligen Effektor T-Zellen eindeutig von dem Pool an Gesamt-Lymphozyten, die phänotypische Zeichen funktioneller Anergie aufweisen (**Abb. 13**).

4.4.2 Erhöhte Korrelation von humoraler und zellulärer Immunität gegen CMV und VZV bei Kindern mit Down-Syndrom

Um die Korrelation zwischen Antigen-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantwort bei den Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu den immungesunden Kontrollkindern beurteilen zu können, wurden T-Zell-Frequenzen ($\text{CD}69^+\text{IFN-}\gamma^+\text{CD}4^+$ T-Zellen) gegen spezifische Antigene analysiert (CMV und VZV Antigene) und der Anteil der Probanden mit spezifischer T-Zellfrequenz über der Nachweisgrenze ermittelt. Des Weiteren erfolgte auch eine semiquantitative Analyse der CMV- und VZV-spezifischen Antikörper mittels ELISA, bei welchem die Antikörpertiter basierend auf den Herstellerangaben als positiv, negativ und grenzwertig beurteilt wurden. Zusätzlich wurden die IgG-Antikörpertiter gegen CMV und VZV quantitativ aus dem Blutplasma bestimmt. Beide Gruppen wiesen validiert am Serostatus eine altersgerechte, endemische Durchseuchungsrate mit CMV und VZV auf. Anschließend wurden die beiden Datensätze der semiquantitativen Auswertungen in einer 4- bzw. 6-Feldertafel zusammengeführt.

		CMV $\kappa=1.0$		IgG	
		+	-	+	-
Kontrollen	T-Zellen	+	7	0	
		-	0	43	

		CMV $\kappa=0.92$		IgG	
		+	-	+	-
Down-Syndrom	T-Zellen	+	7	0	
		-	1	29	

		VZV $\kappa=0.77$			
		+	+/-	-	
Kontrollen	T-Zellen	+	22	3	1
		-	16	0	8

		VZV $\kappa=0.29$			
		+	+/-	-	
Down-Syndrom	T-Zellen	+	20	4	1
		-	2	1	8

Abbildung 19. Starke Korrelation von Antigen-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantwort bei Kindern mit Down-Syndrom. Vergleich der Antigen-spezifischen T-Zell-Immunität nach Vollblutstimulation mit den Antigen-spezifischen IgG-Titern anhand einer 4-(CMV) bzw. 6-(VZV)-Felder Tafel bei Kindern mit Down-Syndrom (A) im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern (B). Ab einem Anteil von $\geq 0,05\%$ Antigen-spezifischen IFN- γ^+ CD69 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen gemessen an den Gesamt CD4 $^+$ T-Zellen für CMV und einer Frequenz von $\geq 0,02\%$ Antigen-spezifischen IFN- γ^+ CD69 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen gemessen an den Gesamt CD4 $^+$ T-Zellen für VZV wurden die Ergebnisse bezüglich einer vorhandenen T-Zell-Immunität als positiv beurteilt. Die semiquantitative Antikörperbestimmung erfolgte mittels ELISA und wurde basierend auf den Herstellerangaben nach folgendem Schema definiert: VZV-IgG-Titer <80 IE/l als IgG-negativ), VZV-IgG-Titer zwischen 80-110 IE/l als grenzwertig und VZV-IgG-Titer >110 IE/l als positiv - CMV-IgG-Titer <16 RE/ml als IgG-negativ, CMV-IgG-Titer zwischen 16-22 RE/ml als grenzwertig und CMV-IgG-Titer >22 RE/ml als positiv. Zur statistischen Analyse der Interrater-Reliabilität wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen berechnet und die grenzwertigen Ergebnisse in der VZV-Serologie ausgeschlossen. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHÖCH et al. 2017).

Bezüglich der CMV-spezifischen Immunantwort war die Übereinstimmung zwischen humoral und zellulär nachweisbarer Immunantwort sowohl in der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom als auch bei den immungesunden Kontrollen sehr gut (DS: $\kappa=0,92$; K: $\kappa=1,00$, **Abb. 19A**). Lediglich zwei VZV-seropositive Kinder mit Down-Syndrom wiesen eine spezifische T-Zell-Frequenz unterhalb der Nachweisgrenze auf, wobei nur ein Kind wirklich keine messbare zelluläre VZV-spezifische Immunantwort zeigte und das zweite Kind mit einer spezifischen T-Zell Frequenz von 0,019% nur knapp unter der Nachweisgrenze von 0,02% lag. Weiter ließ sich feststellen, dass die VZV-spezifischen humorale und zelluläre Immunität sowohl bei den Kindern mit Down-Syndrom ($\kappa=0,77$) als auch in der Kontrollgruppe ($\kappa=0,29$) weniger gut

übereinstimmte (**Abb. 19B**). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in den unterschiedlichen Mechanismen liegen, die zu einer Immunität gegen VZV führen können, welche nicht nur eine Infektion sondern auch eine Immunisierung mittels VZV-Lebensimpfstoff einbeziehen. Nichtsdestotrotz unterschied sich der prozentuale Anteil an Kindern, der geimpft wurde oder eine VZV-Infektion anamnestisch durchgemacht hatte, in den beiden Gruppen nicht (**Tabelle 1**). Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass bei fast allen VZV-seropositiven Kindern mit Down-Syndrom (90,91%) eine T-Zell-Antwort nach VZV-spezifischer Stimulation über der Nachweisgrenze von 0,02% nachweisbar war, während bei den VZV-seropositiven Kontrollkindern lediglich 57,89% eine als positiv bewertete T-Zell-Immunität gegen VZV aufwiesen ($p=0,009$).

4.4.3 Keine Unterschiede der Pathogen-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort zwischen Kindern mit Down Syndrom und Kontrollen

Im Folgenden wurden die T-Zellfrequenzen gegen CMV und VZV und die Antikörpertiter quantitativ verglichen. Für diese Analysen wurden nur seropositive Kinder eingeschlossen (CMV: DS: $n=8$, K: $n=7$; VZV: DS $n=22$, K: $n=38$). Zudem wurden reaktive T Zellen gegen mycobakterielle Antigene (Tuberkulin PPD) quantifiziert. Zur Berechnung der Antigen-spezifischen T-Zell-Frequenzen ($CD69^+IFN-\gamma^+CD4^+$ T-Zellen) wurden reaktive Frequenzen, die in der mitgeführten Negativkontrolle auftraten, von den spezifischen Frequenzen abgezogen.

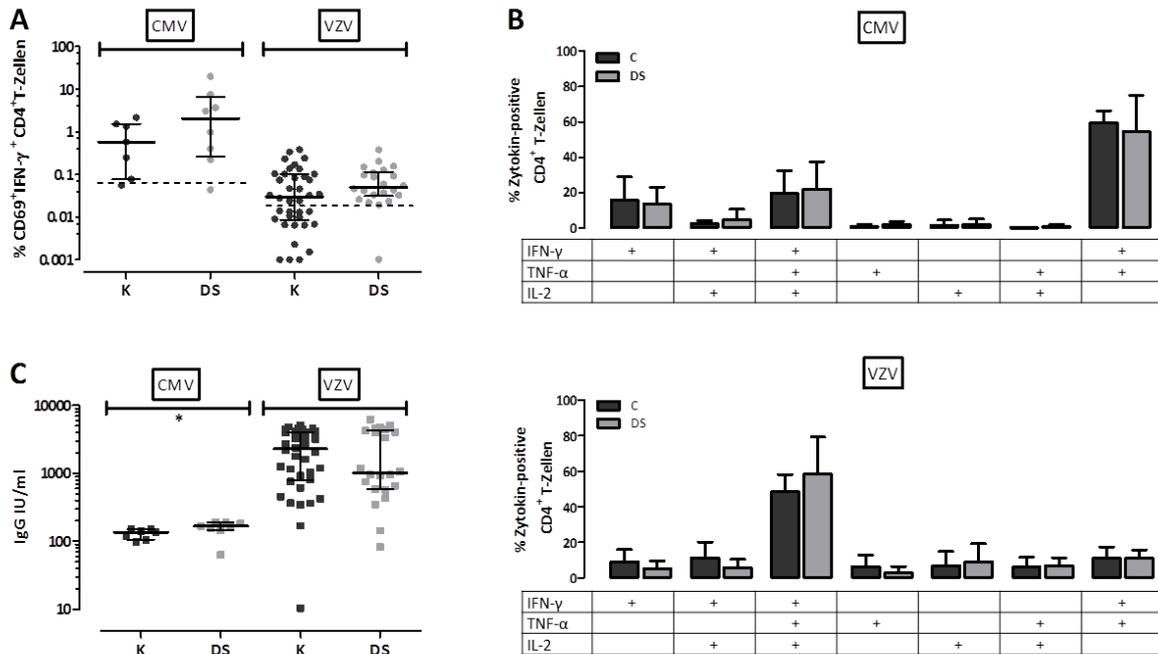


Abbildung 20. Keine Unterschiede der Antigen-spezifischen Immunantwort bei Kindern mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern. **A** Frequenzen reaktiver (IFN- γ ⁺CD69⁺) CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem entsprechenden Antigen (CMV, VZV) unterscheiden sich innerhalb der seropositiven Studienpopulation (CMV: DS: n=8, K: n=7; VZV: DS n=22, K: n=38) nicht signifikant, es lässt sich jedoch bei Kindern mit Down-Syndrom eine Tendenz zu höheren Antigen-spezifischen Frequenzen vermuten. **B** Die individuellen Zytokinexpressionsprofile sind zwischen den beiden Gruppen nicht verschoben. Dargestellt sind nur Probanden mit ≥ 20 Zytokin-positiven Events reaktiver Zellen nach entsprechender Stimulation. CMV (DS: n=8, K: n=7), VZV (DS: n=22, K: n=38). **C** Quantitativ betrachtet weisen CMV-seropositive Kinder mit Down-Syndrom einen erhöhten Anteil an CMV IgG auf, die VZV IgG Level weisen keinen signifikanten Unterschied auf. Balken repräsentieren Median und Interquartil Range. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. $p < 0,05$. Die Abbildung wurde reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (SCHÖCH et al. 2017).

Obwohl seropositive Kinder mit Down-Syndrom eine leichte Tendenz zu erhöhten T-Zell-Frequenzen nach der spezifischen Stimulation mit CMV (DS: Median 2,03% (IQR 6,31%); K: 0,03% (IQR 0,09%)) und VZV (DS: Median 0,05% (IQR 0,08%); K: 0,03% (IQR 0,09%)) im Vergleich zu den Kontrollkinder zeigten, waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. In Bezug auf CMV liegt dies wahrscheinlich an den aufgrund des geringen Alters geringen Fallzahlen an CMV seropositiven Kindern, welche der geringen Inzidenz dieser Infektion in diesem Alterskollektiv geschuldet sein könnte (**Abb. 20A**). Obwohl sich bei der Analyse der Zytokinexpressionsmuster nach Stimulation mit CMV eine leichte Erhöhung der TNF α -single produzierenden Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom nachweisen ließ (DS: Median 1,85% (IQR 2,58%); K: 0% (IQR 1,6%), $p=0,039$), waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant (**Abb. 20B**). Nach der Stimulation mit PPD waren die Frequenzen in beiden Gruppen sehr gering und unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht (DS:

Median 0,005% (IQR 0,02%); K: 0,01% (IQR 0,02%), $p=0,443$, **Daten nicht gezeigt**). Bei der Betrachtung der humoralen Immunantwort zeigten Kinder mit Down-Syndrom leicht erhöhte CMV-spezifischen IgG-Antikörpertiter (DS: Median 167,1 IE/ml (IQR 42,9 IE/ml); K: 135,6 IE/ml (IQR 45,5 IE/ml), $p=0,029$) wohingegen bei VZV-spezifischen IgG-Antikörpern keine Unterschiede nachweisbar waren (**Abb. 20C**).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die quantitativen als auch die qualitativen Analysen dafür sprechen, dass Kinder mit Down-Syndrom in der Lage sind eine effiziente humorale und zelluläre pathogen-spezifische Immunität aufzubauen.

5 Diskussion

Trisomie 21 ist die häufigste genetische Chromosomenaberration, die mit einer Inzidenz von 1:700 - 1:800 Geburten auftritt (SHERMAN et al. 2007). Aufgrund der besseren medizinischen Versorgung, besonders der angeborenen Herzfehler, haben Menschen mit Down-Syndrom heute eine nahezu normale Lebenserwartung (COVELLI et al. 2016). Die mit Trisomie 21 assoziierte erhöhte Anfälligkeit für schwerwiegende respiratorische Infektionen und das vermehrte Auftreten von Autoimmunerkrankungen beeinträchtigen jedoch die Lebensqualität von Menschen mit Down-Syndrom und führen zu häufigen Krankenhauseinweisungen. Als Ursache für diese Phänomene wird neben den charakteristischen anatomischen Veränderungen auch ein mit Trisomie 21 assoziierter Immundefekt angenommen. In den letzten Jahren wurden einige Studien mit dem Ziel der näheren Charakterisierung dieses Immundefekts durchgeführt, um besonders auch Strategien der primären Prävention wie Impfungen in diesem Kollektiv entwickeln zu können.

Das Ziel dieser Arbeit war das Immunsystem von Kindern mit Down-Syndrom hinsichtlich ihrer Antigen-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort zu untersuchen und die quantitativen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von Effektor T-Zellen im Vergleich zu immungesunden Kindern zu analysieren. Hierfür führten wir eine detaillierte Analyse der Lymphozytensubpopulationen, sowie eine umfangreiche Charakterisierung von Effektor T-Zellen in Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern durch. Unsere Ergebnisse konnten die Beobachtungen bisheriger Untersuchungen anderer Arbeitsgruppe in Bezug auf eine veränderte Verteilung an Lymphozyten und T_H -Subpopulationen unterstützen und um weitere phänotypische Ergebnisse sinnvoll ergänzen. Wir konnten bei Kindern mit Down-Syndrom einen deutlich erhöhten Anteil an NK-Zellen nachweisen, während der B-Zell-Anteil deutlich erniedrigt war. Innerhalb der normalprozentigen T-Zell-Population waren prozentual weniger $CD4^+$ T-Zellen und mehr $CD4^+CD8^+$ T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom zu detektieren. Interessanterweise waren auch innerhalb der T_H -Subpopulationen T_H1 , T_H17 und regulatorische T-Zellen signifikant erhöht, während T_H2 und Effektor $CD8^+$ T-Zellen keine Unterschiede im Vergleich zu immungesunden Kindern aufwiesen. Es lässt sich ein Ungleichgewicht der T_H -Subpopulationen erkennen, welche durch eine erhöhte T_H1/T_H2

Ratio bei Kindern mit Down-Syndrom noch weiter unterstützt wird. In einer phänotypischen Analyse konnten wir auf allen großen Lymphozytenpopulationen, einschließlich regulatorischen T-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen insgesamt eine erhöhte Expression des Anergiemarkers PD-1 feststellen, welche auf eine vermehrte Differenzierung dieser Zellen zu Memory T-Zellen hinweisen könnte. Obwohl eine vermehrte Expression von PD-1 auf diesen Zellen einen Hinweis auf die eingeschränkte Funktionalität von T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom liefert, konnten wir bei der Analyse von Effektor T-Zellen nach Stimulation keine Unterschiede in der Expression der Anergiemarker feststellen, was im Gegensatz zu den Gesamt T Zellen für eine normale Reaktivität der Effektor T Zellen spricht. Gestützt wird diese Hypothese durch unsere weiteren funktionellen Analysen von Effektor T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom, in denen wir lediglich ein leicht verändertes Expressionsprofil der Zytokine IFN- γ , TNF α und IL-2 feststellen konnten. Demgegenüber zeigten Kinder mit Down-Syndrom nach Stimulation mit SEB sogar eine erhöhte Reaktivität von Effektor CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu immungesunden Kontrollkindern.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass Kinder mit Down-Syndrom in der Lage zu sein scheinen, eine Effektor T-Zell Antwort aus einem Pool phänotypisch aneurer Zellen aufzubauen, welche normale phänotypische und funktionelle Charakteristiken zeigt. Kinder mit Down-Syndrom scheinen jedoch eine erhöhte Frequenz an reaktiven Effektor T Zellen zu benötigen um eine effiziente Immunität zu erreichen.

5.1 Kritische Bewertung des Studienkollektivs

Die Probanden wurden kontinuierlich in Zusammenarbeit mit der Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie sowie der Klinik für pädiatrische Kardiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes rekrutiert. Es wurde versucht, ein möglichst homogenes Bild der Altersverteilung in einer Altersspanne von 0-18 Jahren abzubilden; da jedoch auch „ältere“ Kinder und junge Erwachsene bis 28 Jahren noch durch die endokrinologische Ambulanz der Kinderklinik betreut werden, haben wir uns entschlossen auch diese Blutproben in unserer Studie einzuschließen, so dass das Kollektiv zwar größtenteils Kinder, aber auch wenige junge Erwachsene umfasste. Eine große Herausforderung war die Rekrutierung sehr junger Studienteilnehmer, denn die Blutentnahme gestaltete sich hier bei einigen Babies schwieriger, so dass in diesen Fällen meist nur ein begrenztes Volumen an Blut verfügbar war. In den Fällen, bei welchen die

gewonnenen Probenvolumina nicht für alle Experimente in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurden zunächst alle Stimulationsversuche mit der Hälfte der angegebenen Blutmenge durchgeführt, so dass auf die zweite Antikörper-Färbung verzichtet werden musste. Bei noch weniger verfügbarem Blut beschränkten wir uns ausschließlich auf die Oberflächenfärbungen und Testungen der humoralen Immunität. Insgesamt entsprachen die Probandenzahlen unseren Erwartungen und bildeten eine recht gleichmäßige Verteilung aller Altersstufen ab. Die Kontrollgruppe konnte gut mit der Gruppe der Probanden mit Down-Syndrom sowohl im Hinblick auf das Alter als auch auf das Geschlecht verglichen werden. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen gab es jedoch im Vorliegen von kongenitalen Herzfehlern, welche eine frühzeitige chirurgische Intervention und im Rahmen dessen eine neonatale Thymektomie notwendig machten. Durch die starke Assoziation von Down-Syndrom und kongenitalen Herzfehlern war der Anteil thymektomierter Kinder in dieser Gruppe deutlich erhöht. Jedoch hatten wir durch unsere Rekrutierung, welche die kardiologisch-pädiatrischen Ambulanz des Universitätsklinikum des Saarlandes einschloss, auch in der Kontrollgruppe ein vermehrtes Vorkommen an kongenitalen Herzfehlern im Vergleich zur Normalbevölkerung.

5.2 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Erwachsene

Die Lebenserwartung von Menschen mit Down-Syndrom ist in den letzten Jahren aufgrund der verbesserten, medizinischen Versorgung enorm angestiegen (GLASSON et al. 2016, IRVING et al. 2008). Durch die wachsende Anzahl an Erwachsenen mit Down-Syndrom stellt sich die Frage in wie weit sich die im Zusammenhang mit Down-Syndrom bei Kindern beobachteten Eigenschaften auf Erwachsene übertragen lassen. In der Literatur zeigen sich bei Erwachsenen mit Down-Syndrom ähnliche Trends wie schon bei Kindern beobachtet, und zwar hin zu einem Ungleichgewicht der Lymphozytenverteilung und einem verschobenen Gleichgewicht in Bezug auf inflammatorische Immunparameter wie Zytokine (BARRENA et al. 1993, TROTTA et al. 2011).

Die Studienlage ist wahrscheinlich aufgrund der einheitlichen, pädiatrischen Betreuung von syndromalen Erkrankungen, welche eine einheitliche Rekrutierung erleichtert und der nur langsam gestiegenen Lebenserwartung, im Bereich der Kinder mit Down-Syndrom sehr viel umfangreicher. Trotz der erleichterten Rekrutierung von Kindern mit Down-Syndrom ist die Interpretation der Ergebnisse in einem größeren oder vielleicht sogar

pathomechanistischem Zusammenhang sehr schwierig, da das Wissen auf diesem Gebiet noch sehr beschränkt ist. Auch fehlt es bei den Erwachsenen mit Down-Syndrom, welche nicht mehr einheitlich in einer Fachdisziplin standardmäßig betreut werden, fast vollständig an longitudinalen Analysen, insbesondere im Hinblick auf langfristige Immunisierungen durch Impfungen. Ein interessanter Punkt in Hinblick auf die Entwicklung der in dieser Arbeit bei Kindern ermittelten, auf Down-Syndrom zurückzuführenden Unterschiede stellt hierbei die Frage dar, inwieweit sich diese Unterschiede mit zunehmendem Alter bei Erwachsenen relativieren, unter Umständen sogar nicht mehr nachweisbar sind oder sich in einigen Punkten vielleicht sogar noch verstärken könnten.

Unsere Studie lässt aufgrund der geringen Fallzahlen von Probanden über 18 Jahren keine Aussage in diesem Kollektiv zu. Für ein weiteres Verständnis der charakteristischen Immundysregulationen im Zusammenhang mit Trisomie 21 wäre es jedoch äußerst interessant das Kollektiv in weiteren Studien auch auf die erwachsene Bevölkerung mit Down-Syndrom auszuweiten.

5.3 Relatives Ungleichgewicht zwischen antiinflammatorischer und proinflammatorischer Immunantwort bei Kindern mit Down-Syndrom

Zunächst konnten wir eine generelle, proportionale Verschiebung der Lymphozytensubpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom feststellen, die in Einklang mit vorbeschriebenen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen steht (CETINER et al. 2010, de Hingh, Yvette C M et al. 2005, TROTTA et al. 2011). Diese Entwicklung scheint zum einen darauf zurückzuführen zu sein, dass die primäre Expansion von B- und T-Lymphozyten in Kindern mit Down-Syndrom im ersten Lebensjahr ausbleibt (de Hingh, Yvette C M et al. 2005). Zum anderen weisen besonders die T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom ein erhöhtes proapoptotisches Potential auf (CORSI et al. 2003). Die in unseren Ergebnissen nachgewiesene anteilige Verschiebung innerhalb der T-Zell-Subpopulationen zu einer erhöhten T_H1/T_H2 Ratio bei Kindern mit Down-Syndrom ist konsistent mit einer erhöhten spontanen Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF α und IL-10 (TROTTA et al. 2011), woraus sich schlussfolgern lässt, dass ein relatives Ungleichgewicht von einem antiinflammatorischen zu einem vermehrt proinflammatorischen Milieu in Kindern mit Down-Syndrom vorherrscht. Als Folge kann es in Kindern mit Down-Syndrom vereinfacht zu überschießenden

Immunantworten kommen, welche zu einem höheren Potential für Autoimmunphänomene beitragen (BARRENA et al. 1993).

Neben dem geringeren proportionalen Anteil an B-Lymphozyten, den auch wir in unserem Kollektiv nachweisen konnten, ist bekannt, dass die B-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom nicht nur quantitativ beeinträchtigt sind, sondern zusätzlich auch eine eingeschränkte Reifung zeigen (BALAJI et al. 2016). Diese Reifungsstörung führt zu geringeren Immunglobulin Titern, insbesondere IgM betreffend, während die IgG Titer normal bis erhöht sind. Innerhalb der IgG Immunglobuline konnten Subgruppenanalysen zeigen, dass erhöhte IgG1 und IgG3 Titer nachweisbar waren, während sich die IgG2 und IgG4 Globuline eher in einem normalen Bereich befanden (BLOEMERS et al. 2010). Gestützt wird diese Beobachtung dadurch, dass wir in unseren Ergebnissen einen erhöhten Prozentsatz an T_H1-Zellen und einen zur Kontrollgruppe gleichwertigen Prozentsatz an T_H2-T-Zellen nachweisen konnten, welche in die jeweilige Stimulation von IgG1/3 und IgG2/4 involviert sind. Verminderte Immunglobulintiter können zu einer ineffektiven humoralen Immunantwort, insbesondere in Bezug auf die mukosale Immunität, führen und in Folge zu einer vermehrten Anfälligkeit für rezidivierende, respiratorische Infekte beitragen.

Somit zeigen Kindern mit Down-Syndrom umfassende Unterschiede in der Anzahl, Reifung und Funktionalität ihrer Lymphozyten, welche ursächlich noch nicht genau erklärt werden können, jedoch in der Folge eindeutig mit einer Immundysregulation, sowohl in die autoimmunologische, als auch die immundefiziente Richtung in Verbindung gebracht werden können.

5.4 Thymektomie im Kindesalter hat Folgen für das Immunsystem im weiteren Verlauf

Es ist bekannt, dass neonatale Thymektomie, im Rahmen der Operation von kongenitalen Herzfehlern, Folgen für das Immunsystem der entsprechenden Kinder hat (SAUCE et al. 2009). Das Ausmaß der langfristigen Auswirkungen auf das Immunsystem der thymektomierten Kinder ist bislang immer noch unklar, aber die Hypothesen reichen soweit, dass sogar eine vorzeitige Alterung des Immunsystems angenommen wird, welche sich durch einen veränderten T-Zell-Phänotyp und eine erhöhte Anfälligkeit für fakultative Infektionen zeigt (APPAY et al. 2010, PRELOG et al. 2009, ZLAMY et al. 2009). Manche

Studien gehen sogar soweit, Empfehlungen abzugeben, falls möglich den Thymus bei Sternotomie nicht ganz sondern nur teilweise zu entfernen, und so viel wie möglich davon zu erhalten (ELDER et al. 2015). Trisomie 21 ist in ca. 50% der Fälle mit dem Vorkommen eines Herzfehlers assoziiert und somit mussten wir uns die Frage stellen, in wie weit unsere Ergebnisse durch Thymektomie beeinflusst werden. Da wir aber auch in der Kontrollgruppe, die teilweise aus der kardiologischen Ambulanz des Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert wurde, Kinder untersucht haben, die eine neonatale Thymektomie im Rahmen einer Herzoperation erhalten haben, war es uns möglich die Daten unter diesem Gesichtspunkt auszuwerten. In unserem Kollektiv haben alle Kinder eine komplette Thymektomie und nicht nur eine Teilresektion des Thymus erhalten. Interessanterweise wird in den meisten Studien zum Down-Syndrom nicht explizit die Thymektomie als Einflussfaktor adressiert. Durch gezielte Subgruppenanalyse in unserem Studienkollektiv konnten wir die Effekte der Thymektomie und des Down-Syndroms gezielt herausarbeiten. Wie erwartet konnten wir sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei Kindern mit Down-Syndrom einen deutlich verminderten Prozentsatz an T-Zellen nach Thymektomie beobachten. Gerade bei Kindern mit Down-Syndrom, die ein hohes Ausmaß an Immundysregulationen aufweisen, ist es somit umso wichtiger die bekannten Defizienzen nicht noch iatrogen zu bestärken, sondern soweit es geht protektiv zu agieren und somit konkret im Rahmen einer kongenitalen Herzoperation explizit darauf zu achten, den Thymus in einem möglichst geringen Maße zu resezieren um mögliche Folgen für das Immunsystem so gering wie möglich halten zu können. Trisomie 21 ist zusätzlich mit Anzeichen einer vorzeitigen Involution des Thymus bis hin zu einer altersähnlichen Atrophie schon in jungen Jahren assoziiert (APPAY et al. 2010, BLOEMERS et al. 2011, PRELOG et al. 2009, SAUCE et al. 2009) und diese vorbestehende Prädisposition zu verminderten T-Zell Populationen sollte durch radikale Thymektomie nicht noch bestärkt werden. Die Thymus-spezifischen Defekte können am ehesten mit dem DiGeorge Syndrom verglichen werden, bei welchem es aufgrund einer Hypo-/Aplasie des Thymus zu schweren Störungen der T-Zell vermittelten Immunität kommt (MORSHEIMER et al. 2017).

Durch gezielte Subgruppen Analyse in nicht-thymektomierten Probanden konnte der Einfluss des Down Syndroms ohne Beeinflussung durch Thymektomie adressiert werden. Hierbei ergaben sich im Vergleich zur Betrachtung des Gesamtkollektivs keine Änderungen in der Aussage unserer Ergebnisse, so dass die beobachteten Unterschiede bezüglich den

anteiligen Populationen an B-Zellen, NK-Zellen, CD4⁺CD8⁺ T-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen auf das Down Syndrom zurückführbar sind. Die gemessenen Veränderungen zu einem erhöhten Prozentsatz regulatorischer T-Zellen, sowie T_H2-Zellen, scheinen jedoch darüber hinaus durch Thymektomie verstärkt zu werden. Nachdem wir durch unsere gezielte Subgruppenanalyse neonatale Thymektomie als möglichen Störfaktor (bzw. Confoundervariable) ausgeschlossen haben, lassen sich die generellen Unterschiede, welche wir in der Lymphozytenverteilung im Vergleich der beiden Gruppen gesehen haben, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf mit Down-Syndrom assoziierte Veränderungen des Immunsystems zurückführen. Ein erniedrigender Einfluss von neonataler Thymektomie auf die T-Zellpopulationen war in beiden Gruppen gleichermaßen nachweisbar, sodass eine Schonung des Thymus im Rahmen einer neonatalen Herzoperation bei chirurgischer Umsetzbarkeit generell als sinnvoll erscheint.

5.5 Etablierung einer funktionell und phänotypisch adäquaten Effektor T-Zell Antwort aus einem anergen, lymphozytären Zellpool bei Kindern mit Down-Syndrom

Bei der phänotypischen Charakterisierung von Lymphozyten und den wesentlichen T-Zell-Subpopulationen konnten wir bei Kindern mit Down-Syndrom eine erhöhte Expression der inhibitorischen Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 beobachten. Diese Moleküle stellen wichtige Kontrollpunkte der Immunantwort dar und verhindern physiologischerweise, dass das Immunsystem außer Kontrolle gerät. Bei andauernder Immunantwort ist es ihre Aufgabe nach Beseitigung der Pathogenität, die Immunantwort wieder herunterzufahren und somit Gewebeschäden und die Entwicklung von Autoimmunität zu unterbinden. Ein veränderter Polymorphismus inhibitorischer Oberflächenmoleküle kann bei vielen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis beobachtet werden (FRANCISCO et al. 2010). Weder PD-1 noch CTLA-4 werden auf Chromosom 21 kodiert, sodass eine vermehrte Expression durch das zusätzliche vorhandene Chromosom per se unwahrscheinlich ist. Des Weiteren ist es bekannt, dass eine vermehrte Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle mit funktioneller Anergie einhergehen und folglich eine adäquate Immunantwort einschränken und in ihrer Effizienz behindern können, wie es zum Beispiel bei Transplantationen, Tumoren oder chronischen Infektionen

vorkommt (BROWN et al. 2010, MURPHY et al. 2003, ODORIZZI et al. 2012, WHERRY2011). Hieraus ergibt sich ein großes, therapeutisches Potential sowohl für die agonistische, als auch die antagonistische Manipulation an diesen inhibitorischen Molekülen um entweder eine beeinträchtigte Immunantwort wiederherstellen zu können, wie es derzeit schon klinisch unter anderem in der Melanomtherapie angewandt wird, oder auch einer potentiell überschießenden Immunität entgegenzuwirken, als mögliche Intervention bei Autoimmunerkrankungen (PEGGS et al. 2009). Besonders im Bereich der adaptiven Immunantwort zeigte sich schon in einigen Studien eine eingeschränkte Diversität naiver Lymphozyten (GUAZZAROTTI et al. 2009, KUSTERS et al. 2010) und Veränderungen in der Differenzierung zu Gedächtniszellen bei Kindern mit Down-Syndrom (CARSETTI et al. 2015, GUAZZAROTTI et al. 2009, KUSTERS et al. 2010, VERSTEGEN et al. 2014). Des Weiteren wurden verminderte humorale Immunantworten nach Impfungen bei Kindern mit Down-Syndrom nachgewiesen (JOSHI et al. 2011, KUSTERS et al. 2011, VALENTINI et al. 2015), welche mit einer geringeren Anzahl an differenzierten Gedächtnis B-Zellen einhergeht (VALENTINI et al. 2015). Weitere funktionelle Einschränkungen wie beispielsweise ein höheres apoptotisches Potential von Zellen oder eine vermehrte proinflammatorische Zytokinproduktion wird in Zusammenhang mit dem oftmals schweren Infektionsverlauf bei Menschen mit Down-Syndrom gebracht (BROERS et al. 2012, ELSAYED et al. 2009, GEMEN et al. 2012). Des Weiteren konnten wir feststellen, dass bei Kindern mit Down-Syndrom der CD27⁻/CD28⁻ enddifferenzierte Zelltyp an T-Zellen, unabhängig vom CMV Serostatus, also sowohl in der seropositiven als auch in der seronegativen Gruppe vermehrt vorliegt. Dies spricht besonders im Zusammenhang mit CD8⁺ T-Zellen für eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit und vermehrte Differenzierung der Zellen zum Memory Zelltyp. Diese Beobachtung könnte für eine chronische Überlastung des Immunsystems sprechen und wurde auch im Kontext der physiologischen Abnahme der Immunfunktionalität im Alter beobachtet (WENG et al. 2009). Somit scheint das Immunsystem von Kindern mit Down-Syndrom einige Parallelen mit der physiologischen Immunseneszenz im Sinne einer vorzeitige Alterung des Immunsystems aufzuweisen, welche besonders auch im Zusammenhang mit chronischen Virusinfektionen beobachtet werden kann (TAVENIER et al. 2015). Das Vorliegen einer vermehrten Population an CD27⁻CD28⁻CD4⁺ T-Zellen gilt als nahezu pathognomonisch für das Vorliegen einer CMV Infektion. In früheren Versuchen hat sich hierbei eine Grenzwert von 0,44% CD27⁻CD28⁻CD4⁺ T-Zellen gemessen an den gesamt

CD4⁺ Zellen etabliert (DIRKS et al. 2013). Die Sensitivität dieses Tests liegt bei diesem Grenzwert in Bezug auf den serologischen Nachweis bei 93,3%, während die Spezifität sogar bei 97,1% liegt. Wichtig zu erwähnen ist zum einen, dass eine Expansion dieser Zellpopulation jedoch nicht nur mit CMV assoziiert ist, sondern zusätzlich bei dem Auftreten diverser Autoimmunphänomene z.B. Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis oder Vaskulitiden beobachtet wurde (MORGAN et al. 2011, THEWISSEN et al. 2007, WENG et al. 2009). Zum anderen muss man beachten, dass dieser Grenzwert in einem Kollektiv an erwachsenen Probanden etabliert wurde und nur unter Vorbehalt auf Kinder zu übertragen ist. In unserem Studienkollektiv lag die Sensitivität bei 93,33% und die Spezifität insgesamt bei 88,16%. In unserer Stichprobe war sowohl in der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom als auch bei den immungesunden Kontrollkindern die positive Vorhersagekraft über das Vorliegen einer CMV Infektion mittels CD27⁻CD28⁻CD4⁺ T-Zellen sehr hoch und stimmte mit der vorbekannten Sensitivität des Testes überein, während der Prozentsatz an Falsch-Positiven in unserem Kollektiv mit 11,84% deutlich erhöht war. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass sowohl in der Gruppe der Kinder mit Down-Syndrom als auch der Gruppe der Kontrollkindern ein nicht unerheblicher Prozentsatz an Komorbiditäten in Bezug auf Autoimmunerkrankungen vorherrschen (DS: n=10/40, K: n=5/51), welche eine Erklärung für diesen relativ hohen Prozentsatz an falsch-positiven Proben verantwortlich sein könnte. Die im Zusammenhang mit Trisomie 21 in unseren Versuchen beobachtete erhöhte Expression von PD-1 und CTLA-4, sowie das vermehrte Vorliegen eines phänotypischen Memory-Zelltyps können als Zeichen eines anergen und funktionell eingeschränkten Zellpools im Sinne einer Immundysregulation bei Kindern mit Down-Syndrom gesehen werden. Alternativ könnten die phänotypischen Hinweise auf Anergie auch Folge der vermehrt auftretenden, rezidivierenden Infektionen mit ineffizienter Immuninduktion bei Kindern mit Down-Syndrom sein.

Trotz der erhöhten Expression der Anergiemarker auf T Zellen und deren Subpopulationen insgesamt war auffällig, dass dieser Phänotyp und Hinweise für eine eingeschränkte Funktionalität nicht für Effektor T Zellen zu beobachten waren. Sobald es daher einmal zu einer effizienten Immuninduktion gekommen ist, scheinen die Zellen von Kindern mit Down-Syndrom in der Lage zu sein, eine funktionell und phänotypisch adäquate, normale Effektor T-Zell Antwort aufbauen zu können. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass sich das Zytokinexpressionsprofil der beiden Studienkollektive insgesamt nicht unterscheidet und die

Frequenz an reaktiven T-Zellen nach Antigen-Kontakt in vitro bei Kindern mit Down-Syndrom sogar erhöht ist. Die T-Zell-Immunität gegen CMV und VZV war in der Gruppe mit Down-Syndrom vergleichbar und besonders die CMV-spezifische zelluläre Immunität zeigte eine starke Korrelation zur humoralen Immunität. Des Weiteren scheinen Kinder mit Down-Syndrom auch eine einmal aufgebaute, Pathogen-spezifische Immunität langfristig aufrecht erhalten zu können, da der Prozentsatz an Kindern mit nachweisbarer VZV-spezifischer zellulärer Immunität in der Gruppe seropositiver Kinder mit Down-Syndrom deutlich höher war als in der Kontrollgruppe. In CMV-infizierten Probanden scheint eine kontinuierlich subklinische Replikation zu einer lebenslangen Aufrechterhaltung CMV-spezifischer Zellen beitragen (KLENERMAN et al. 2016, SESTER et al. 2016), während eine Abwesenheit von aktiver Virusreplikation bei VZV zu einem Nachlassen der zellulären Immunität zu führen scheint (SCHUB et al. 2015). Es lässt sich mutmaßen, dass der erhöhte Anteil an Individuen mit Down-Syndrom mit nachweisbaren VZV-spezifischen T-Zellen auf häufigere subklinische Virusreplikationen und folgender Auffrischung der zellulären Immunität zurückzuführen ist. In Bezug auf Effektor T-Zellen konnten wir bei Kindern mit Down-Syndrom normale phänotypische Eigenschaften sowie eine normale qualitative Funktionalität nachweisen, welche zusätzlich durch einen erhöhten quantitativen Anteil ausgezeichnet ist. Die erhöhten Frequenzen reaktiver Effektor T-Zellen könnten entweder auf ein höheres Aktivitätslevel und/oder eine vermehrte Expansion zurückzuführen sein. Die Induktion einer effektiven Immunantwort aus einem Pool anergischer Zellen scheint ein erhöhtes Ausmaß an Stimulation zu bedürfen. Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass im Vergleich zu immungesunden Kindern ein deutlich geringerer Anteil an Kindern mit Down-Syndrom nach der ersten Influenza-Impfung eine nachweisbare Immunität aufgebaut hat, wohingegen nach einer Pneumokokken Auffrisch-Impfung der Anteil immunisierter Kinder in der Down-Syndrom Gruppe signifikant anstieg und kein Unterschied zur Kontrollgruppe nachweisbar war (VALENTINI et al. 2015). Zusätzlich könnte die vermehrte Frequenz reaktiver Zellen, im Zusammenhang mit veränderten Immunglobulintitern, Ausdruck einer verlängerten Antigen Exposition bei aktiver Infektion sein, welche möglicherweise auf eine ineffizientere Expansion spezifischer T-Zellen aus dem Pool an Zellen mit anergem Phänotyp bei Kindern mit Down-Syndrom zurückzuführen sein könnte. Die rezidivierende Infekthistorie im Zusammenhang mit erhöhten Reaktivitätsfrequenzen der Effektor T-Zellen stellt ein zusätzliches Potential für Entwicklung autoimmuner Phänomene dar.

Die Möglichkeit der therapeutischen Intervention in Bezug auf den PD-1 Signalweg erscheint in Hinsicht auf die erfolgreiche, zielgerichtete Intervention in anderen klinischen Situationen sehr vielversprechend zu sein, um die Funktionalität und Proliferationsfähigkeit der T-Zellen wieder herzustellen. Im Zusammenhang mit hoher PD-1 Expression auf CMV-spezifischen T-Zellen konnte durch Blockade des PD-1 Signalweges eine Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit und verbesserte Funktionalität der T-Zellen bereits nachgewiesen werden (DIRKS et al. 2013). Die therapeutische Gabe dieser Antikörper ist aufgrund der Entwicklung einer Autoimmunität bei Kindern mit Down-Syndrom mit ohnehin erhöhtem autoimmunem Potential kritisch zu sehen. Zudem wäre die therapeutische Gabe dieser Antikörper möglicherweise von begrenztem Nutzen, da zwar eine Anergie der Zellen im Allgemeinen nachweisbar ist, jedoch keine Einschränkungen im Phänotyp und in der Funktionalität der adaptiven, spezifischen Effektor T-Zell Immunität vorzuliegen scheint.

5.6 Erhöhtes autoimmunes Potential bei Kindern mit Down-Syndrom

Obwohl die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ein großes wissenschaftliches Feld mit vielen intensiven Forschungsansätzen ist, gibt es noch keine befriedigende Erklärung für die ursächliche Entstehung von Autoimmunität. Die in der Wissenschaft führende Hypothese geht davon aus, dass zur Entwicklung von Autoimmunität mehrere Faktoren zusammenkommen müssen. Es herrscht zumeist eine prädisponierende, genetische Veranlagung vor, welche durch Umweltfaktoren und individuelle Lebensgewohnheiten bestärkt wird. Des Weiteren ist oftmals vor dem erstmaligen Auftreten bzw. einem erneuten Schub einer chronischen Autoimmunerkrankung die Konfrontation des Organismus mit einem bestimmten „Trigger“, wie zum Beispiel ein vorangegangener Virusinfekt, Sonnenexposition oder auch Stress, beschrieben (KUCHROO et al. 2012).

Neben diesem grundsätzlichen, multifaktoriell bedingten Modell der Entwicklung von Autoimmunität wurden 2005 die T_H17-Zellen als eine neue Subpopulation an T-Zellen entdeckt (HARRINGTON et al. 2005, LANGRISH et al. 2005, PARK et al. 2005). Diese sind durch Expression von IL-17 charakterisiert und scheinen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Autoimmunität zu spielen (CHEN et al. 2008). Besonderes für die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), einem etablierten Mausmodell für Multiple Sklerose scheinen T_H17-Zellen eine Schlüsselrolle zu spielen (CUA et al. 2003). Man geht davon aus, dass es sich bei Multipler Sklerose um eine Autoimmunerkrankung handelt,

welche auf entzündliche Veränderungen im zentralen Nervensystem zurückzuführen ist. Neben einer generellen Begünstigung von entzündlichen Gewebeveränderungen durch IL-17-produzierende Zellen (WILKE et al. 2011) ist auch ein starker Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von T_H17-Zellen und einer Reihe von weiteren entzündlichen Erkrankungen beschrieben, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (CASCAO et al. 2010). Die meisten Studien stützen ihre Hypothese zum proautoimmunen Potential jedoch nicht alleinig auf eine erhöhte Population an T_H17-Zellen, sondern auf das Verhältnis von T_H17-Zellen zu den protektiv gegen Autoimmunität wirkenden regulatorischen T-Zellen, welches sich inzwischen etabliert hat. In Folge eines erhöhten Verhältnisses handelt es sich somit um ein verschobenes Gleichgewicht, welches die Entstehung von Autoimmunität begünstigt (JADIDI-NIARAGH et al. 2012). Ein weiterer Schritt, der heutzutage in Erwägung gezogen wird, ist das Wiederherstellen dieses verschobenen Gleichgewichts als therapeutische Option für Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Diese Überlegungen stehen jedoch noch am Anfang und benötigen für die Umsetzung ein weitaus tieferes Verständnis über die Wirkungsweisen und molekularen Kreuzfunktionalitäten der verschiedenen Zellpopulationen.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass Kinder mit Down-Syndrom einen erhöhten Anteil an IL-17 produzierenden Zellen besitzen, was die Entstehung von Autoimmunerkrankungen in diesen Kindern begünstigen könnte. Gegen unsere Erwartung zeigten die Kinder mit Down-Syndrom jedoch auch erhöhte Proportionen an regulatorischen T-Zellen, denen eine protektive, antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird. Eine mögliche Erklärung könnte die Beobachtung liefern, dass regulatorische T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom eine eingeschränkte Funktionalität aufzuweisen scheinen (ABRAMSON et al. 2016, PELLEGRINI et al. 2012). Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass auch wir in unseren Versuchen durch die erhöhte Expression von PD-1 auf regulatorischen T-Zellen phänotypische Anzeichen einer eingeschränkten Funktionalität dieser Zellen nachweisen konnten. Ein weiteres charakteristisches Merkmal in Kindern mit Down-Syndrom ist eine veränderte Expression molekularer Transkriptionsfaktoren im Thymus, die unter anderem den Autoimmunregulator AIRE betrifft (DRANOFF2004, GIMENEZ-BARCONS et al. 2014, MOREIRA-FILHO et al. 2016, SKOGBERG et al. 2014); durch diese könnte man möglicherweise eine gestörte T-Zell Reifung erklären, welche die Entwicklung von Autoimmunität zusätzlich unterstützen kann.

Zusammenfassend könnte der von uns beobachtete erhöhte Anteil regulatorischer T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom auf den kompensatorischen Effekt einer eingeschränkten Funktionalität zurückzuführen sein. Zusammenfassend lässt sich bei erhöhten T_H17-Zellen und erhöhter Anzahl an regulatorischen T-Zellen mit möglicherweise eingeschränkter Funktionalität bei Kindern mit Down-Syndrom, eine verschobene Balance dieser Zellen vermuten, welche zur vermehrten Inzidenz von Autoimmunerkrankungen, beitragen könnte.

5.7 Stärken und Limitationen

Trotz unseres begrenzten Probandenkollektivs mit geringen Fallzahlen innerhalb der jeweiligen Gruppen, konnten wir deutliche Unterschiede zwischen Kindern mit Down-Syndrom und Kontrollkindern aufzeigen. Zusätzlich war es uns möglich, obwohl teilweise nur eine sehr limitierte Blutmenge zur Verfügung stand, durch selektive Auswahl unserer Versuche den größtmöglichen Informationsgehalt zu erreichen. Das Problem bei der Probengewinnung bestand besonders bei sehr jungen Probanden (<1 Jahr) und ging teilweise aufgrund des geringeren Blutvolumens zwangsweise mit Abstrichen bei den Stimulationsversuchen einher. Aufgrund der Breite der Altersspanne sind auch unterschiedliche Reifestadien des Immunsystems in unserer Stichprobe enthalten, was zu einer Heterogenität führen könnte. Um die Anfälligkeit unserer Ergebnisse gegenüber Confounding und Bias bestmöglich zu stabilisieren, haben wir auf ein gutes Matching der beiden Studienkollektive geachtet. Des Weiteren schlossen sich an alle signifikanten Ergebnisse weitere Subgruppen-Analysen an um eine alters- und thymektomiebedingte Verzerrung möglichst auszuschließen. Auch durch Exklusion der Daten, welche von Probanden >18 Jahren gewonnen wurden änderte sich die Aussage unserer Ergebnisse nicht. Somit lassen sich die beobachteten Unterschiede auf das Down-Syndrom zurückführen.

Unsere Daten sind zum jetzigen Zeitpunkt rein deskriptiver Art, es wäre jedoch interessant in Zukunft die Dynamiken der Induktion und Funktionalität Antigen-spezifischer T-Zellen während und nach Episoden von respiratorischen Infektionen auch longitudinal zu analysieren. Zur Ausweitung der Fallzahlen und Validierung unserer Ergebnisse bei Erwachsenen würde es sich anbieten die Fallzahl an Probanden durch Kollaboration mit weiteren für Trisomie 21 spezialisierten Zentren zu erweitern.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte diese Arbeit das bisherige Wissen über die Immundysregulation in Assoziation mit dem Down-Syndrom im Hinblick auf die quantitative und qualitative T-Zell-Immunität erweitern. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine funktionell und phänotypisch normale, langfristige Effektor T-Zell-Antworten aus einem Pool aneurer Lymphozyten induziert werden kann, hierfür jedoch mitunter eine ausgeprägtere bzw. wiederholte Exposition mit Pathogenen notwendig sein könnte. Klinisch wird diese Schlussfolgerung dadurch gestützt, dass die vermehrte Infektanfälligkeit dieser Kinder besonders in jungen Jahren zu beobachten ist und mit zunehmendem Alter auch bei Menschen mit Down Syndrom die Infektionsinzidenz abzunehmen scheint. Die entsprechende Klinik der Down-Syndrom Kinder mit vermehrter Infektanfälligkeit und gleichzeitig erhöhter Inzidenz an Autoimmunerkrankungen ist jedoch nicht alleine durch die in dieser Arbeit gesehenen Veränderungen zu erklären, sondern multifaktoriell bedingt: Neben den zellulären und humoralen Veränderungen des Immunsystems von Kindern mit Down-Syndrom müssen auch die individuellen anatomischen Gegebenheiten und entsprechende Umweltfaktoren berücksichtigt werden. Eine Vorhersage über den klinischen Verlauf des einzelnen Kindes kann somit kaum gemacht werden. Umso wichtiger ist es für diese Kinder eine effiziente Prävention von Erkrankungen zu etablieren. Besonders der Entwicklung von individuellen Therapiekonzepten für Kinder mit Down-Syndrom kommt hier eine große Bedeutung zu, welche eine individuelle Infektionsprophylaxe im Rahmen einer primären, sekundären und tertiären Prävention einschließen. Ein besonderer Stellenwert verlangt die frühzeitige und effiziente Immunisierung der Kinder mittels Impfungen. Im Vordergrund steht hier besonders die Etablierung von eigens auf Trisomie 21 abgestimmten Impfplänen, die besonders die Prävention von respiratorischen Infekten und das verminderte Ansprechen auf Immunisierung bei diesen Kindern mit berücksichtigen. Weiter sind auch eine Sensibilisierung im klinischen Alltag und eine Aufklärung der Eltern zur Durchführung einer effizienten Infektionsprophylaxe notwendig.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnte der bisherige Wissenstand über Immundysregulation im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom insbesondere im Hinblick auf die zelluläre Immunantwort ergänzt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten weitere Studien in großen Probandenkollektiven durchgeführt werden, um die hier

beobachteten immunologischen Veränderungen in Relation zur individuellen Anfälligkeit für Infektionen zu analysieren. Dies kann dazu beitragen, für Kinder mit Down-Syndrom ein optimales immunsupportives Protokoll zu entwickeln um diesen Kindern ein möglichst beschwerdefreies Leben ohne Einschränkungen durch Immunpathologien mit möglichst guter Lebensqualität ermöglichen zu können.

6 Literatur

1. Abramson J, Husebye E S (2016) Autoimmune regulator and self-tolerance - molecular and clinical aspects. *Immunol Rev* 271: 127–140.
2. Anwar A J, Walker J D, Frier B M (1998) Type 1 diabetes mellitus and Down's syndrome: prevalence, management and diabetic complications. *Diabet Med* 15: 160–163.
3. Appay V, Sauce D, Prelog M (2010) The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)* 2: 78–81.
4. Arason G J, Jorgensen G H, Ludviksson B R (2010) Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol* 71: 317–328.
5. Aversa T, Valenzise M, Salerno M, Corrias A, Iughetti L, Radetti G, Luca F de, Wasniewska M (2015) Metamorphic thyroid autoimmunity in Down Syndrome: from Hashimoto's thyroiditis to Graves' disease and beyond. *Ital J Pediatr* 41: 87.
6. Balaji K, Milne T J, Drummond B K, Cullinan M P, Coates D E (2016) A comparison of salivary IgA in children with Down syndrome and their family members. *Arch Oral Biol* 67: 39–45.
7. Barrena M J, Echaniz P, Garcia-Serrano C, Cuadrado E (1993) Imbalance of the CD4+ subpopulations expressing CD45RA and CD29 antigens in the peripheral blood of adults and children with Down syndrome. *Scand J Immunol* 38: 323–326.
8. Bloemers B L P, Bont L, Weger R A de, Otto S A, Borghans J A, Tesselaar K (2011) Decreased thymic output accounts for decreased naive T cell numbers in children with Down syndrome. *J Immunol* 186: 4500–4507.
9. Bloemers B L P, Broers C J M, Bont L, Weijerman M E, Gemke, Reinoud J B J, van Furth A M (2010) Increased risk of respiratory tract infections in children with Down syndrome: the consequence of an altered immune system. *Microbes Infect* 12: 799–808.
10. Borghesi L, Milcarek C (2007) Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? *Cancer Res* 67: 3989–3993.

11. Broers C J M, Gemke, Reinoud J B J, Weijerman M E, van der Sluijs, Koen F, van Furth A M (2012) Increased pro-inflammatory cytokine production in Down Syndrome children upon stimulation with live influenza A virus. *J Clin Immunol* 32: 323–329.
12. Brown K E, Freeman G J, Wherry E J, Sharpe A H (2010) Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr Opin Immunol* 22: 397–401.
13. Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Picard C, Puel A, Abel L, Casanova J-L (2008) Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 20: 39–48.
14. Canick J (2012) Prenatal screening for trisomy 21: recent advances and guidelines. *Clin Chem Lab Med* 50: 1003–1008.
15. Carnicer J, Farre C, Varea V, Vilar P, Moreno J, Artigas J (2001) Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 263–267.
16. CARR D H (1962) The chromosome abnormality in mongolism. *Can Med Assoc J* 87: 490–495.
17. Carsetti R, Valentini D, Marcellini V, Scarsella M, Marasco E, Giustini F, Bartuli A, Villani A, Ugazio A G (2015) Reduced numbers of switched memory B cells with high terminal differentiation potential in Down syndrome. *Eur J Immunol* 45: 903–914.
18. Cascao R, Moura R A, Perpetuo I, Canhao H, Vieira-Sousa E, Mourao A F, Rodrigues A M, Polido-Pereira J, Queiroz M V, Rosario H S, Souto-Carneiro M M, Graca L, Fonseca J E (2010) Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R196.
19. Cetiner S, Demirhan O, Inal T C, Tastemir D, Sertdemir Y (2010) Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet* 37: 233–237.
20. Chen Z, O'Shea J J (2008) Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 41: 87–102.
21. Collier R (2012) Surge in Down syndrome prenatal testing anticipated. *CMAJ* 184: E449-50.

22. Corsi M M, Ponti W, Venditti A, Ferrara F, Baldo C, Chiappelli M, Licastro F (2003) Proapoptotic activated T-cells in the blood of children with Down's syndrome: relationship with dietary antigens and intestinal alterations. *Int J Tissue React* 25: 117–125.
23. Covelli V, Raggi A, Meucci P, Paganelli C, Leonardi M (2016) Ageing of people with Down's syndrome: a systematic literature review from 2000 to 2014. *Int J Rehabil Res* 39: 20–28.
24. Cua D J, Sherlock J, Chen Y, Murphy C A, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira S A, Gorman D, Kastelein R A, Sedgwick J D (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744–748.
25. da Rosa Utiyama, Shirley Ramos, Nisihara R M, Nass F R, Oliveira N P, Fiedler P T, Messias-Reason I T de (2008) Autoantibodies in patients with Down syndrome: early senescence of the immune system or precocious markers for immunological diseases? *J Paediatr Child Health* 44: 182–186.
26. de Hingh, Yvette C M, van der Vossen, Petrus W, Gemen E F A, Mulder A B, Hop W C J, Brus F, Vries E de (2005) Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. *J Pediatr* 147: 744–747.
27. Dirks J, Egli A, Sester U, Sester M, Hirsch H H (2013) Blockade of programmed death receptor-1 signaling restores expression of mostly proinflammatory cytokines in anergic cytomegalovirus-specific T cells. *Transpl Infect Dis* 15: 79–89.
28. Dirks J, Tas H, Schmidt T, Kirsch S, Gartner B C, Sester U, Sester M (2013) PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients. *Am J Transplant* 13: 3132–3141.
29. Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 11–22.
30. Elder R W, George R P, McCabe N M, Rodriguez Iii F H, Book W M, Mahle W T, Kirk A D (2015) Immunologic Aging in Adults with Congenital Heart Disease: Does Infant Sternotomy Matter? *Pediatr Cardiol* 36: 1411–1416.
31. Elsayed S M, Elsayed G M (2009) Phenotype of apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. *Immun Ageing* 6: 2.

32. Fearon D T, Locksley R M (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50–53.
33. Francisco L M, Sage P T, Sharpe A H (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236: 219–242.
34. Gavazzi G, Krause K-H (2002) Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2: 659–666.
35. Gemen E F A, Verstegen R H J, Leuvenink J, Vries E de (2012) Increased circulating apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 59: 1310–1312.
36. Gillespie K M, Dix R J, Williams A J K, Newton R, Robinson Z F, Bingley P J, Gale E A M, Shield J P H (2006) Islet autoimmunity in children with Down's syndrome. *Diabetes* 55: 3185–3188.
37. Gimenez-Barcons M, Casteras A, Armengol M d P, Porta E, Correa P A, Marin A, Pujol-Borrell R, Colobran R (2014) Autoimmune predisposition in Down syndrome may result from a partial central tolerance failure due to insufficient intrathymic expression of AIRE and peripheral antigens. *J Immunol* 193: 3872–3879.
38. Glasson E J, Jacques A, Wong K, Bourke J, Leonard H (2016) Improved Survival in Down Syndrome over the Last 60 Years and the Impact of Perinatal Factors in Recent Decades. *J Pediatr* 169: 214-20.e1.
39. Guazzarotti L, Trabattoni D, Castelletti E, Boldrighini B, Piacentini L, Duca P, Beretta S, Pacei M, Caprio C, Vigan Ago A, Di Natale B, Zuccotti G V, Clerici M (2009) T lymphocyte maturation is impaired in healthy young individuals carrying trisomy 21 (Down syndrome). *Am J Intellect Dev Disabil* 114: 100–109.
40. Hall B M (2015) T Cells: Soldiers and Spies--The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol* 10: 2050–2064.
41. Harrington L E, Hatton R D, Mangan P R, Turner H, Murphy T L, Murphy K M, Weaver C T (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123–1132.
42. Irving C, Basu A, Richmond S, Burn J, Wren C (2008) Twenty-year trends in prevalence and survival of Down syndrome. *Eur J Hum Genet* 16: 1336–1340.

43. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A (2012) The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34: 727–739.
44. Joshi A Y, Abraham R S, Snyder M R, Boyce T G (2011) Immune evaluation and vaccine responses in Down syndrome: evidence of immunodeficiency? *Vaccine* 29: 5040–5046.
45. Kamradt T, Ferrari-Kuhne K (2011) Das adaptive Immunsystem. *Dtsch Med Wochenschr* 136: 1678–1683.
46. Klenerman P, Oxenius A (2016) T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol* 16: 367–377.
47. Kuchroo V K, Ohashi P S, Sartor R B, Vinuesa C G (2012) Dysregulation of immune homeostasis in autoimmune diseases. *Nat Med* 18: 42–47.
48. Kusters M A, Jol-Van Der Zijde, Els C M, Gijsbers, Rianne H J M, Vries E de (2011) Decreased response after conjugated meningococcal serogroup C vaccination in children with Down syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 30: 818–819.
49. Kusters M A A, Gemen E F A, Verstegen R H J, Wever P C, Vries E de (2010) Both normal memory counts and decreased naive cells favor intrinsic defect over early senescence of Down syndrome T lymphocytes. *Pediatr Res* 67: 557–562.
50. Kusters M A A, Verstegen R H J, Gemen E F A, Vries E de (2009) Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol* 156: 189–193.
51. Lang P O, Govind S, Michel J P, Aspinall R, Mitchell W A (2011) Immunosenescence: Implications for vaccination programmes in adults. *Maturitas* 68: 322–330.
52. Langrish C L, Chen Y, Blumenschein W M, Mattson J, Basham B, Sedgwick J D, McClanahan T, Kastelein R A, Cua D J (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201: 233–240.
53. Linabery A M, Li W, Roesler M A, Spector L G, Gamis A S, Olshan A F, Heerema N A, Ross J A (2015) Immune-related conditions and acute leukemia in children with Down syndrome: a Children's Oncology Group report. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24: 454–458.
54. Mateos M K, Barbaric D, Byatt S-A, Sutton R, Marshall G M (2015) Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Transl Pediatr* 4: 76–92.

55. Moreira-Filho C A, Bando S Y, Bertonha F B, Silva F N, Costa L d F, Ferreira L R, Furlanetto G, Chacur P, Zerbini M C N, Carneiro-Sampaio M (2016) Modular transcriptional repertoire and MicroRNA target analyses characterize genomic dysregulation in the thymus of Down syndrome infants. *Oncotarget* 7: 7497–7533.
56. Morgan M D, Pachnio A, Begum J, Roberts D, Rasmussen N, Neil D A H, Bajema I, Savage C O S, Moss P A, Harper L (2011) CD4+CD28- T cell expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) is driven by latent cytomegalovirus infection and is associated with an increased risk of infection and mortality. *Arthritis Rheum* 63: 2127–2137.
57. Morris J K, Mutton D E, Alberman E (2002) Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen* 9: 2–6.
58. Morsheimer M, Brown Whitehorn T F, Heimall J, Sullivan K E (2017) The immune deficiency of chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*.
59. Murphy C A, Langrish C L, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein R A, Sedgwick J D, Cua D J (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198: 1951–1957.
60. Murphy K M, Travers P, Walport M (2014) *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, korrigierter Nachdruck 2014. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
61. Notarangelo L D, Fischer A, Geha R S, Casanova J-L, Chapel H, Conley M E, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartrom L, Nonoyama S, Ochs H D, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J (2009) Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 124: 1161–1178.
62. O'Donnell E A, Ernst D N, Hingorani R (2013) Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw* 13: 43–54.
63. Odorizzi P M, Wherry E J (2012) Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J Immunol* 188: 2957–2965.
64. Park H, Li Z, Yang X O, Chang S H, Nurieva R, Wang Y-H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133–1141.

65. Peggs K S, Quezada S A, Allison J P (2009) Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists. *Clin Exp Immunol* 157: 9–19.
66. Pellegrini F P, Marinoni M, Frangione V, Tedeschi A, Gandini V, Ciglia F, Mortara L, Accolla R S, Nespoli L (2012) Down syndrome, autoimmunity and T regulatory cells. *Clin Exp Immunol* 169: 238–243.
67. Picot J, Guerin C L, van Kim C, Boulanger C M (2012) Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64: 109–130.
68. Prelog M, Keller M, Geiger R, Brandstatter A, Wurzner R, Schweigmann U, Zlamy M, Zimmerhackl L B, Grubeck-Loebenstein B (2009) Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+)CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin Immunol* 130: 123–132.
69. Roizen N J, Patterson D (2003) Down's syndrome. *Lancet* 361: 1281–1289.
70. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, Ferrand C, Debre P, Sidi D, Appay V (2009) Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest* 119: 3070–3078.
71. Schmidt T, Sester M (2013) Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 1064: 267–274.
72. Schoch J, Rohrer T R, Kaestner M, Abdul-Khaliq H, Gortner L, Sester U, Sester M, Schmidt T (2017) Quantitative, phenotypical and functional characterization of cellular immunity in pediatric individuals with Down syndrome. *J Infect Dis*.
73. Schub D, Janssen E, Leyking S, Sester U, Assmann G, Hennes P, Smola S, Vogt T, Rohrer T, Sester M, Schmidt T (2015) Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection. *J Infect Dis* 211: 600–612.
74. Sester M, Leboeuf C, Schmidt T, Hirsch H H (2016) The "ABC" of Virus-Specific T Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant* 16: 1697–1706.
75. Sester M, Sester U, Gartner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Kohler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71: 1287–1294.

76. Sharma P, Wagner K, Wolchok J D, Allison J P (2011) Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer* 11: 805–812.
77. Sherman S L, Allen E G, Bean L H, Freeman S B (2007) Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 13: 221–227.
78. Skogberg G, Lundberg V, Lindgren S, Gudmundsdottir J, Sandstrom K, Kampe O, Anneren G, Gustafsson J, Sunnegardh J, van der Post S, Telemo E, Berglund M, Ekwall O (2014) Altered expression of autoimmune regulator in infant down syndrome thymus, a possible contributor to an autoimmune phenotype. *J Immunol* 193: 2187–2195.
79. Tavenier J, Langkilde A, Haupt T H, Henriksen J H, Jensen F K, Petersen J, Andersen O (2015) Immunosenescence of the CD8(+) T cell compartment is associated with HIV-infection, but only weakly reflects age-related processes of adipose tissue, metabolism, and muscle in antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients and controls. *BMC Immunol* 16: 72.
80. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P (2007) CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol* 179: 6514–6523.
81. Trotta M B, Serro Azul J B, Wajngarten M, Fonseca S G, Goldberg A C, Kalil J E (2011) Inflammatory and Immunological parameters in adults with Down syndrome. *Immun Ageing* 8: 4.
82. Valentini D, Marcellini V, Bianchi S, Villani A, Facchini M, Donatelli I, Castrucci M R, Marasco E, Farroni C, Carsetti R (2015) Generation of switched memory B cells in response to vaccination in Down syndrome children and their siblings. *Vaccine* 33: 6689–6696.
83. Verstegen R H J, Driessen G J, Bartol S J W, van Noesel, Carel J M, Boon L, van der Burg M, van Dongen, Jacques J M, Vries E de, van Zelm M C (2014) Defective B-cell memory in patients with Down syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 134: 1346-1353.e9.
84. Verstegen R H J, Kusters M A A, Gemen E F A, Vries E de (2010) Down syndrome B-lymphocyte subpopulations, intrinsic defect or decreased T-lymphocyte help. *Pediatr Res* 67: 563–569.

85. Walker C (1991) Down syndrome and congenital heart defects. Part 1: Anatomical and functional anomalies, prognosis and treatment. *Intensive Care Nurs* 7: 94–104.
86. Weijerman M E, Winter J P de (2010) Clinical practice. The care of children with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 169: 1445–1452.
87. Weng N-P, Akbar A N, Goronzy J (2009) CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol* 30: 306–312.
88. Wherry E J (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12: 492–499.
89. Wilke C M, Bishop K, Fox D, Zou W (2011) Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol* 32: 603–611.
90. Zlamy M, Prelog M (2009) Thymectomy in early childhood: a model for premature T cell immunosenescence? *Rejuvenation Res* 12: 249–258.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus, Cytomegalievirus
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DS	Down-Syndrom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
FACS	Fluoreszenz assoziiertes Zellsorting
FCS	Fetales Kälber Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

IL	Interleukin
IQR	Interquartil Range
IUIS	International Union of Immunological Societies
K	Kontrollkinder
MFI	Mediane Fluoreszenz Intensität
MHC	Major histocompatibility complex
n	Größe der Grundgesamtheit
NaN ₃	Natriumacid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Inhibitory Receptor Programmed Death-1
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin Cyanin 7
PerCP	Staphylococcus Enterotoxin B
PFA	Peridinin Chlorophyll
PPD (Tuberkulin)	purified protein derivative
RE/ml	Relative Einheit pro Milliliter
SEB	Paraformaldehyd
SSC	Side Scatter
TCR	T-Zell Rezeptor
T _H -Zellen	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
VZV	Varizella Zoster Virus

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Typische Facies von Kindern mit Trisomie 21	9
Abbildung 2. Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems	13
Abbildung 3. Mechanismus der T-Zell-Aktivierung und Inhibition	16
Abbildung 4. Repräsentativer Dotplot einer durchflusszytometrisch gemessenen Vollblutprobe.....	35
Abbildung 5. Auswertstrategie für Lymphozytensubpopulationen (Oberflächenfärbung I)...	38
Abbildung 6. Auswertstrategie für CD27 ⁻ CD28 ⁻ Lymphozyten (Oberflächenfärbung II).	39
Abbildung 7. Auswertstrategie der intrazellulären IFN- γ , IL-2 und TNF α Färbung nach Vollblutstimulation.....	40
Abbildung 8. Auswertstrategie der T-Helfer-Subpopulationen Färbung nach Vollblutstimulation.....	41
Abbildung 9. Auswertstrategie für PD1 Färbung nach Vollblutstimulation.....	42
Abbildung 10. Repräsentativer Dotplot eines Kindes mit Down-Syndrom nach Antigen-spezifischer (VZV) bzw. polyklonaler Vollblutstimulation.....	43
Abbildung 11. Detaillierte Analyse der Leukozyten-, Lymphozyten-, sowie T-Zell-Subpopulationen bei Kindern mit Down-Syndrom im Vergleich zu immungesunden Kontrollen.....	48
Abbildung 12 Einfluss von neonataler Thymektomie auf die Gesamt-T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen	50
Abbildung 13. Expressionsanalyse des Anergienarkers PD-1 mittels medianer Fluoreszenz Intensität (MFI) auf unterschiedlichen Zellpopulationen	52
Abbildung 14. Expression von CD27 und CD28 auf CD4 ⁺ T-Zellen in Abhängigkeit vom CMV Serostatus.....	54
Abbildung 15. Analyse enddifferenzierter CD27 ⁻ CD28 ⁻ Zellpopulationen innerhalb von CD8 ⁺ und CD8 ^{dim} Zellen	54
Abbildung 16. Typischer Dotplot Zytokin-produzierender CD4 ⁺ T-Zellen nach Stimulation von Vollblut eines repräsentativen Kindes mit Down-Syndrom.....	57
Abbildung 17. Funktionelle und phänotypische Analyse reaktiver Zellen nach polyklonaler Stimulation mit SEB.....	58

Abbildung 18. Moderate Veränderungen des Zytokinexpressionsprofils von Effektor T-Zellen bei Kindern mit Down-Syndrom.....	59
Abbildung 19. Starke Korrelation von Antigen-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantwort bei Kindern mit Down-Syndrom	61
Abbildung 20. Keine Unterschiede der Antigen-spezifischen Immunantwort bei Kindern mit Down-Syndrom und immungesunden Kontrollkindern	63

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	24
Tabelle 2: Chemikalien und Testkits.....	25
Tabelle 3: Puffer und Medien.....	26
Tabelle 4: Kostimulatorische Antikörper und Antigene	27
Tabelle 5: Antikörper	27
Tabelle 6: Verwendete Antikörpermengen Oberflächenfärbung I	29
Tabelle 7: Verwendete Antikörpermengen Oberflächenfärbung II	30
Tabelle 8: Ansatz der Vollblutstimulation mit Menge der zugegebenen kostimulatorischen Antikörpern und Antigenen	32
Tabelle 9: Färbung I	32
Tabelle 10: Übersicht über die Zusammensetzung der einzelnen Färbungen	34
Tabelle 11: Charakteristika der Probandenkollektive	46

10 Publikationen

10.1 Originalarbeit

Die wesentlichen Teile dieser Arbeit sind publiziert. Die Darstellung der publizierten Ergebnisse in dieser Dissertationsschrift orientiert sich an diesem Manuskript.

Schoch, J., Rohrer, T.R., Kaestner, M., Abdul-Khaliq, H., Gortner, L., Sester, U., Sester, M., and Schmidt, T. Quantitative, phenotypical and functional characterization of cellular immunity in children and adolescents with Down syndrome. *J Infect Dis* 2017; 215: 1619-1628; *Impact Punkte*: 6.273.

10.2 Kongressbeiträge

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, Frankfurt; April 2016

Poster und Kurzvortrag:

Schoch, J., Schmidt, T., Jung, A.-M., Kästner, M., Abdul-Khaliq, H., Gortner, L., Sester, M., Rohrer, T. Effektor-T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom zeigen quantitative, phänotypische und funktionelle Unterschiede im Vergleich zu Immungesunden Kindern.

Das Poster wurde mit einem **Posterpreis** ausgezeichnet.

2. Jahrestagung der European Society for Pediatric Endocrinology, Paris; September 2016

ePoster:

Schoch, J., Schmidt, T., Jung, A.-M., Kästner, M., Abdul-Khaliq, H., Gortner, L., Sester, M., Rohrer, T. Children with Down syndrome show quantitative, phenotypical and functional differences of effector T-cells compared to immunocompetent controls.

3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hamburg; September 2016

Vortrag:

Schoch, J., Schmidt, T., Rohrer, T., Jung, A.-M., Kästner, M., Abdul-Khaliq, H., Gortner, L., Sester, M. Children with Down syndrome show quantitative, phenotypical and functional differences of effector T-cells compared to immunocompetent controls.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Martina Sester, welche mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in der Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie gegeben hat, für die ausgezeichnete Betreuung der letzten Jahre. Danke für deine Geduld und Unterstützung, sowie deine Erklärungen zu wissenschaftlichen und immunologischen Fragestellungen. Nicht nur auf intellektueller und fachlicher, sondern auch auf persönlicher Ebene konnte ich sehr viel von dir lernen.

Weiter möchte ich Dr. Tina Schmidt und Prof. Dr. Urban Sester für die Betreuung der letzten Jahre und die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit danken.

Stefanie Marx, Michaela Fischer und Lisa Lieblang möchte ich besonderen Dank aussprechen für die Unterstützung in allen Lebensbelangen, die über die fachliche Arbeit weit hinaus geht. Ihr habt jeden Labortag zu etwas besonderem gemacht.

Danke auch an Candida Guckelmus für die fachliche Unterstützung im Labor.

Des Weiteren danke ich unseren Kollaborationspartnern der endokrinologischen und kardiologischen Ambulanz des Universitätsklinikums des Saarlandes. Dr. Anna-Maria Jung, Prof. Dr. Tilman Rohrer, Prof. Dr. Michael Kästner, Prof. Dr. Hashim Abdul-Khaliq und Prof. Ludwig Gortner, sowie allen Probanden, die sich bereit erklärt haben an dieser Studie teilzunehmen und durch ihren Einsatz die Durchführung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden, die mich moralisch unterstützt haben und mir den notwendigen Ausgleich zur Laborarbeit ermöglicht haben.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern danken, dafür dass sie mich immer im Erreichen meiner Ziele bestärkt und unterstützt haben.

12 Lebenslauf

Name	Justine Lisa Schoch
Wohnort	Arndtstr. 11 66121 Saarbrücken
Geburtsdatum	13. Januar 1993
Geburtsort	Karlsruhe
Familienstand	ledig
Schulbildung	
September 1999 bis Juli 2003	Grund- und Hauptschule Grünwinkel
September 2003 bis Juni 2012	Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe
Studium	
Seit Oktober 2012	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
seit Oktober 2014	Promotion an der Universität des Saarlandes in der Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie
Berufstätigkeit	
Juli 2012	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffiziersanwärter SaZ 17
Mai 2015 - August 2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität des Saarlandes in der Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie