

Maximilian von Au

Dr. med.

Entwicklung von Methoden zur Messung lymphozytärer Immunkompetenz bei Säuglingen

Geboren am 18.12.1982 in Karlsruhe

(Staats-)Examen am 18.5.2010 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hans – Georg Kräusslich

Lymphozyten sind die Hauptträger der adaptiven Immunabwehr und unter ihnen nehmen die T-Helferzellen eine zentrale Rolle wahr. Die lymphozytäre Immunfunktion bei Säuglingen unterscheidet sich von der Erwachsener.

Um die lymphozytäre Immunfunktion bei Säuglingen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besser charakterisieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden zur Bestimmung dieser Immunfunktion aus Vollblut von Säuglingen entwickelt.

Die Anwendbarkeit der Methoden unter Verwendung geringer Mengen venösen und kapillaren Blutes spielt eine entscheidende Rolle. Die durchflusszytometrische Analyse der Verteilung von Lymphozytensubpopulationen mittels der Single Tube Methode und die Verfolgung der immunologischen Gedächtnisentwicklung anhand von Reifungsstadien der T-Zellen dienen der Erfassung quantitativer Aspekte. Die Single Tube Methode kann dabei eine vollständige Subpopulationsanalyse der Lymphozyten in einem Teströhrchen mit einem Minimum an gemessenen Parametern (Durchflusszytometer mit nur 3 Fluoreszenzkanälen benötigt) liefern. Die qualitative Immunkompetenz wird abgebildet in der Messung reaktiver T-Helferzellen nach in vitro Kurzzeitstimulation mit Antigenen und mit Cytostim. Cytostim stimuliert die T-Helferzellen unabhängig von ihrer Antigenspezifität. Reaktive T-Helferzellen werden dabei jeweils anhand der Zytokinproduktion und der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 identifiziert.

Die Single Tube Methode erfasst sowohl die Lymphozytengrundgesamtheit als auch deren Subpopulationen präzise und die Messergebnisse lassen sich gut reproduzieren. Einzig die Messung des Anteils der NK-Zellen ist mit relevanten Fehlern behaftet. Es zeigt sich eine hohe Robustheit der Methode gegenüber typischen präanalytischen Fehlern. Die Verteilungsanalyse der Lymphozytensubpopulationen kann bereits in 25 µl Blut zuverlässig erfolgen, dabei ist die Verwendung von Kapillarblut möglich. Auch die Ansätze zur Bestimmung der Reifungsstadien der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen lassen eine Miniaturisierung auf 25 µl Blut und die Verwendung von Kapillarblut zu.

Optimale Versuchsbedingungen zur Stimulation und anschließenden Messung reaktiver T-Helferzellen wurden ermittelt und die Methode für die Anwendung bei Säuglingen optimiert. Auch hier zeigt sich gute Reproduzierbarkeit. Die experimentell ermittelte Grenze der Miniaturisierbarkeit liegt (je nach benötigter Sensitivität für niedrige Frequenzen aktivierter T-Helferzellen) zwischen 50

und 200 µl Blut pro Stimulationsansatz. Eine Verwendung von Kapillarblut ist möglich. Cytostim erweist sich in der praktischen Anwendung als geeignetes unspezifisches Stimulans.

In einer Impfstudie zeigte sich die Stimulationsmethode bei Erwachsenen als nicht sensitiv genug, um T-Helferzellvermittelte Impfantworten im Zuge einer Hepatitis B Impfung nachzuweisen.

Zwei CMV infizierte Neugeborene wurden im Rahmen der CMV - Diagnostik mit den entwickelten Methoden (Single Tube, Reifungsstadien, T-Helferzellantworten) untersucht, wobei die klinische Anwendbarkeit der Methoden demonstriert werden konnte. Die Kinder zeigten dabei niedrigere CMVpp65-Antigen spezifische T-Helferzellantworten als infizierte Erwachsene. Gleichzeitig war die unspezifische Stimulierbarkeit mit Cytostim vergleichbar.

Die entwickelten Methoden werden bezüglich ihres Wertes zur Bestimmung der lymphozytären Immunfunktion unter besonderer Berücksichtigung der Eignung für Säuglinge diskutiert und mit anderen Ansätzen verglichen. Alternativen zu Cytostim werden mit ihren Vor- und Nachteilen dargelegt. Möglichkeiten und Grenzen von CD154 als Aktivierungsmarker werden erörtert.

Weitere Untersuchungen zur lymphozytären Immunfunktion im Kontext konnataler CMV Infektion sind geplant. Von besonderem Interesse ist dabei die Frage, ob Parameter der lymphozytären Immunfunktion eine verlässliche Prognose über den Verlauf der CMV Infektion zulassen und somit als Richtschnur für die Therapieentscheidung dienen können. Zur Bestimmung von Referenzwerten ist es erforderlich, auch gesunde Neugeborene zu untersuchen. Diese Referenzwerte könnten dann auch für Studien zur veränderten Immunfunktion unter anderen pathologischen Bedingungen verwendet werden.

Bei Studien zur Hepatitis B Impfung bei Neugeborenen sollte anstelle der extrem schwachen T-Helferzellantwort besser der spezifische Antikörperspiegel im Blut bestimmt werden.