

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten

**Charakterisierung von humanen Milchzellen während der
Laktation und der mögliche Einfluss der Reaktivierung
von humanem Zytomegalievirus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Kussmann, Thorsten Volkmar
Tübingen, 2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Iftner

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. E. Autenrieth

Tag der Disputation: 16.05.2024

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die dauerhafte Unterstützung meiner Familie,
welche über all die Jahre mit Geduld und Verständnis hinter mir standen.

Ich danke meiner Mutter, die all das erst möglich machte, meiner Frau und meinen Kindern
für die Liebe und die guten Nerven.

Ihnen widme ich diese Arbeit.

Inhalt

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | Einleitung | 11 |
| 1.1 | Das humane Cytomegalievirus (HCMV) | 11 |
| 1.1.1 | Struktur von HCMV | 11 |
| 1.1.2 | Epidemiologie und Klinik | 12 |
| 1.1.3 | Immunantwort des Infizierten auf eine HCMV-Infektion..... | 13 |
| 1.1.4 | Latenz und Reaktivierung | 13 |
| 1.1.5 | HCMV Infektion beim Fetus und bei Neugeborenen | 14 |
| 1.1.6 | Nachweismethoden von HCMV bei vertikaler Transmission | 15 |
| 1.2 | Muttermilch..... | 18 |
| 1.2.1 | Nichtzelluläre Bestandteile der Muttermilch..... | 19 |
| 1.2.2 | Muttermilchzellen..... | 19 |
| 1.2.3 | Laktation | 22 |
| 1.2.4 | Virustransmission von HCMV über das Medium Muttermilch..... | 22 |
| 1.3 | Virusinaktivierung in Muttermilch | 23 |
| 1.4 | Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit..... | 24 |
| 2 | Material und Methoden | 26 |
| 2.1 | Material..... | 26 |
| 2.1.1 | Untersuchungs-Kohorte | 26 |
| 2.1.2 | Muttermilch | 27 |
| 2.1.3 | Molke | 28 |
| 2.1.4 | Zellen | 28 |
| 2.1.5 | Reagenzien (Tabelle 3)..... | 29 |
| 2.1.6 | Lösungen und Puffer (Tabelle 4) | 30 |
| 2.1.7 | Kits (Tabelle 5)..... | 31 |
| 2.1.8 | Primer (Tabelle 6)..... | 31 |
| 2.1.9 | Antikörper (Tabelle 7)..... | 31 |
| 2.1.10 | Antikörper Durchflusscytometrie/ImageStream (Tabelle 8) | 31 |
| 2.1.11 | Arbeitsgeräte (Tabelle 9)..... | 32 |
| 2.1.12 | Software (Tabelle 10)..... | 33 |
| 2.1.13 | Ethikvotum | 33 |
| 2.2 | Methoden | 34 |
| 2.2.1 | Aufarbeitung der Muttermilch..... | 34 |
| 2.2.2 | Aufteilung der Molke-Fraktion..... | 35 |
| 2.2.3 | Aufteilung der Gesamtmilchzellfraktion | 35 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.2.4 | Cytospinpräparation..... | 36 |
| 2.2.5 | Färbung der Zellen..... | 37 |
| 2.2.6 | Viraler DNA-Nachweis..... | 39 |
| 2.2.7 | Durchflusszytometrische-Analyse (FACS)..... | 43 |
| 2.2.8 | ImageStream-Analyse..... | 47 |
| 2.2.9 | Datenauswertung..... | 47 |
| 3 | Ergebnisse..... | 48 |
| 3.1 | Fraktionierung der Muttermilch und Virusnachweis mittels real-time PCR und Viruskultur 48 | |
| 3.2 | Mikroskopische Darstellung und Charakterisierung der Muttermilchzellen..... | 49 |
| 3.2.1 | Zellzahlkinetik abhängig vom Serostatus der Spenderin..... | 50 |
| 3.2.2 | Panoptische Färbung nach Pappenheim..... | 53 |
| 3.2.3 | Alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung..... | 55 |
| 3.3 | Durchflusszytometrische Untersuchung der Gesamtmilchzellpopulation und Image-Stream 58 | |
| 3.3.1 | Etablierung von erweiterter mehrfarbiger durchflusszytometrischer Analyse von Proben humaner Milchzellen..... | 60 |
| 3.3.2 | Ergänzende Untersuchungen mittels ImageStream-Verfahren..... | 61 |
| 3.4 | Verteilung der humanen Muttermilchzellen im Vergleich von Proben HCMV-seropositiver und -negativer Spenderinnen..... | 70 |
| 3.4.1 | Visuelle Analyse mittels Heatmap..... | 72 |
| 3.4.2 | Statistische Analyse der Leukozytenuntergruppen an Hand des HCMV-Serostatus der Spenderin..... | 76 |
| 3.4.3 | tSNE-Analyse (t-distributed stochastic neighbourhood embedding)..... | 82 |
| 3.4.4 | Epithelzellen/Laktozyten in Muttermilch..... | 84 |
| 4 | Diskussion..... | 86 |
| 4.1 | HCMV-Reaktivierung in Muttermilch..... | 86 |
| 4.2 | Charakterisierung von Muttermilchzellen..... | 88 |
| 4.2.1 | Muttermilchzellzahl in Abhängigkeit des HCMV-Serostatus..... | 88 |
| 4.2.2 | Charakterisierung von Muttermilchzellen mittels Färbung..... | 89 |
| 4.2.3 | Durchflusszytometrische Analyse..... | 89 |
| 4.2.4 | Muttermilchzell-Analyse mittels ImageStream..... | 93 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 94 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 97 |
| 7 | Erklärung zum Eigenanteil der Disertationsschrift..... | 104 |
| 8 | Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit..... | 106 |

Abkürzungen und Definitionen

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazol |
| Bp (kbp) | Basenpaare (kilo Basenpaare) |
| CD (45/14/3/etc.) | Oberflächenmarker zur Charakterisierung von Zellsubpopulationen – „Cluster of differentiation“ |
| CID | Cytomegale Einschlußerkrankung |
| CPE | zytopathischer/zytopathogener Effekt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethyldiaminessigsäure |
| ELISA | Enzym-linked Immunosorbent Assay |
| FACS | Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting) |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| HFF | Humane Vorhautfibroblasten |
| HCMV | Humanes Zytomegalievirus |
| IE1 | Immediate Early-Antigen 1 |
| IgG/IgM | Immunglobulin G/M |
| n-PCR | nested-PCR |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PBMC | Periphere mononukleäre Blutzellen |
| p.p. | post partum |
| Taq Polymerase | Thermophilus aquaticus – DNA – Polymerase |
| Virolaktie | Nachweis von infektiösem HCMV in der Muttermilch durch Kulturverfahren |

1 Einleitung

1.1 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

Das humane Cytomegalievirus, kurz HCMV, zählt innerhalb der Familie der Herpesviridae zur Subfamilie der β -Herpesviren und ist auch unter dem Namen humanes Herpesvirus 5 (HHV5) bekannt. Eine wesentliche Eigenschaft, die alle Herpesviren teilen, ist die lebenslange Persistenz des Virus im infizierten Wirtsorganismus nach Primärinfektion.

Erstmals wurden Protozoen-ähnliche Zellen 1881 durch den deutschen Pathologen Moritz Wilhelm Hugo Ribbert (1855-1920) beschrieben, welche er in der Niere eines totgeborenen Kindes entdeckte. Der Begriff der Eulenaugenzellen wurde 1932 durch S. Farber und S.B. Wolbach geprägt, welche im Rahmen der Beschreibung der „Speicheldrüsen-Virus-Erkrankung“ die cytomegale Zellen entdeckten (Farber & Wolbach, 1932). Dies führte zur Definition der Cytomegalen Einschlußerkrankung (CID). 1956 gelang nach Etablierung der Zellkulturtechnik erstmals die Isolierung und Virusanzucht des Cytomegalievirus aus Speicheldrüsenzellen (M. G. Smith, 1956).



Abbildung 1: Schematischer Genomaufbau des humanen Cytomegalievirus. TR = terminale Wiederholungssequenz; IR = internale Wiederholungssequenz; U = einmalige Genomabschnitte; _L = zum langen einmaligen Segment gehörig; _S = zum kurzen einmaligen Segment gehörig; LO = Ursprung Genomreplikation (modifizierte Abbildung nach Modrow und Falke, 1998).

1.1.1 Struktur von HCMV

Das etwa 150-200nm große, reife Viruspartikel besteht aus einer Lipiddoppelmembran, welches sich aus der zellulären Membran ableitet, von welcher sich das Virus abscheidet. In dieser Membran werden verschiedenste virale Glykoproteine eingelagert. Innerhalb der Virushülle befindet sich der Matrixraum (Tegument) mit Strukturproteinen und Enzymen. Ein etwa 100nm großes ikosaedrisches Kapsid aus 162 Kapsomeren enthält das virale Genom als lineare, doppelsträngige DNA. Die HCMV DNA umfasst eine Größe von etwa 230.000 Basenpaaren und codiert für etwa 200 Genprodukte und gehört damit zu den humanpathogenen Viren mit der höchsten Codierungskapazität. Das Genom selbst setzt sich aus einem langen (U_L) und einem kurzen Segment (U_S) zusammen, welche nur einmalig präsent sind und deshalb als „unique“ (U) bezeichnet werden. An den Genomenden befinden sich jeweils Wiederholungssequenzen, die „terminal repeat“ (TR), und zwischen dem kurzen

und langen Genomsegment ebenso eine Wiederholungssequenz „internal repeat“ (IR) (Bundesgesundheitsblatt 2018). Die Replikation des viralen Genoms während des lytischen Replikationszyklus startet nach dem rolling circle-Mechanismus im Zentrum des langen Segements (U_L) (Modrow & Falke, 1998) (Abbildung 1).

Anhand des Zeitpunktes der Proteinexpression nach Infektion einer Zelle werden die codierten Gene des HCMV Genoms in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Bereits 2 Stunden nach Infektion lassen sich im Zellkern der infizierten Zelle die sehr frühen Proteine (Immediate early, IE) nachweisen, welche durch die DNA-abhängige-RNA-Polymerase II transkribiert werden. Die IE-Proteine sind zur Regulation der frühen Proteine (early, E), wie der viralen DNA-Polymerase, zuständig. Diese können nach etwa 6 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden. Etwa 18 Stunden nach Infektion lassen sich die späten Proteine (late, L) nachweisen, welche von den E-Proteinen abhängig sind. Zu diesen zählen die viralen Strukturproteine. Die Fertigstellung des viralen Kapsids erfolgt im Zellkern der infizierten Zelle, die Ausschleusung und Umhüllung des Virus nachfolgend an der inneren Kernmembran (Hampracht & Jahn, 2007).

Struktur-Proteine, wie das pp65-Protein, welches schon früh im Kern der infizierten Zelle nachgewiesen werden kann, werden als frühe Marker der Infektion verwendet (Jahn et al., 1987). Die spezifische Anfärbung mittels Immediate-Early-Antigen gehört zur Routine-Diagnostik zum Nachweis infizierter Zellen in der Viruskultur.

1.1.2 Epidemiologie und Klinik

Das humane Cytomegalievirus ist weltweit verbreitet und zeigt nach epidemiologischen Studien eine HCMV-Seroprävalenz in Abhängigkeit von Lebensalter sowie sozioökonomischen Standard eines Landes zwischen 50 und 100% (Furui et al., 2013; Krech, 1973; Lamberson & Dock, 1992). Die HCMV-Seroprävalenz wird mittels anti-HCMV-IgG Antikörpern bestimmt. Während die Prävalenz HCMV-spezifischer Antikörper in westlichen Industriestaaten zwischen 40 und 70% liegt, zeigen sich in vielen Ländern Afrikas und Asiens eine Seroprävalenz im Erwachsenenalter mit bis zu 100% (Bundesministeriums für Gesundheit, 2018). Daten für Deutschland zeigten eine durchschnittliche Seroprävalenz von 56,7% mit höherer Seroprävalenz bei Frauen (62,3%) als bei Männern (51,0%) (Lachmann et al., 2018) und eine HCMV-Seroprävalenz von schwangeren Frauen in den analysierten Jahren von 1995 bis 2010 zwischen 40,9 und 44,3% (Enders et al., 2012).

Die Virusübertragung mit dem streng wirtsspezifischen humanen Cytomegalievirus erfolgt durch Schleimhautkontakte, parenteral über zellhaltige Blutkomponenten oder Organtransplantationen sowie transplazentar von Mutter auf den Foetus, peripartal über Genitalsekrete oder postnatal via Muttermilch auf das Kind. Die primäre Infektion zeigt bei immunkompetenten Personen meist einen asymptomatischen Verlauf oder äußert sich in einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild mit Fieber, Lymphadenopathie und/oder Pharyngitis, einer laborchemischen absoluten oder relativen Lymphozytose sowie leichter Transaminasenerhöhung (Mandell et al., 2010). In immunsupprimierten Patienten, zum Beispiel Transplantationspatienten, Karzinom- oder AIDS-Patienten, kann es zu einer generalisierten Infektion mit multipler Organbeteiligung, wie Enzephalitis, Nephritis, Hepatitis, Colitis, Retinitis oder Pneumonie, führen.

1.1.3 Immunantwort des Infizierten auf eine HCMV-Infektion

Die initiale Virusbekämpfung erfolgt unspezifisch zellulär durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Nachfolgend wird durch antigenpräsentierende T-Helfer-Lymphozyten sowie CD8-positive T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort eingeleitet, welche vor allem zur frühen Kontrolle der Infektion dient. Wichtige Zielantigene für zytotoxische T-Lymphozyten zur Bekämpfung des Virus sind das Phosphoprotein pp65, pp150 sowie das Hüll-Glykoprotein B (gB). Ebenso stellen IE-Proteine ein Ansatzpunkt für die spezifische Immunantwort dar (siehe 1.1.1 zur Struktur von HCMV). Durch CD4-positive T-Lymphozyten werden immunologische Gedächtniszellen (memory cells) induziert und gesteuert, was zu einer anhaltenden Immunität führt. Begleitend führen durch B-Zellen produzierte Antikörper zur gezielten Terminierung der Infektion.

HCMV wirkt mit seinen immunmodulatorischen Eigenschaften, welche spezifisch die Antigenpräsentation infizierter Zellen hemmt, der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten entgegen, was zu einer Persistenz der Viren beziehungsweise Latenz des viralen Genoms in befallenen Zellen führt. (Bundesministeriums für Gesundheit, 2018)

1.1.4 Latenz und Reaktivierung

Nach Primärinfektion geht HCMV, vergleichbar mit anderen Herpesviren, in einen Zustand der nichtreplikativen Latenz über. Dabei ist virales Genom weiterhin in den Zellen des Infizierten nachweisbar, ohne die Produktion von infektiösen Viruspartikeln. Die infizierte Person zeigt während der Latenzphase des Virus keinerlei Krankheitssymptome. Der Ort der zellulären Latenz ist seit langem Gegenstand der Forschung. Es werden unter anderem

neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen sowie Monozyten und Makrophagen als Reservoir diskutiert (Bolovan-Fritts et al., 1999; Larsson et al., 1998; Taylor-Wiedeman et al., 1991). In späteren Forschungen wurden ebenso CD34 positive Zellen des Knochenmarks als ein zentraler Ort der zellulären Latenz beschrieben (Goodrum et al., 2002).

Die Reaktivierung des Virus wird auf Grund zellulärer Immundefekte, wie lymphatische Leukämien, Autoimmunkrankheiten oder immunsuppressive Therapie, ausgelöst. Die Reaktivierung verläuft dabei meist schwerer als die Primärinfektion. Ergänzend dazu zeigt sich bei fast allen HCMV-positiven Frauen während der Schwangerschaft eine Reaktivierung des Virus lokal in den Brustdrüsen mit Ausscheidung von infektiösen Viruspartikeln über die Muttermilch ohne Nachweis einer systemischen Infektion der Mutter (Hamprecht & Jahn, 2007). Eine Ausföhrung zur Reaktivierung in Muttermilch erfolgt in 1.2.4.

1.1.5 HCMV Infektion beim Fetus und bei Neugeborenen

Das humane Cytomegalievirus föhrt als föhrender Erreger durch vertikale Transmission von Mutter auf Kind zu einer kongenitalen Infektion. 0,3 bis 1,2% aller Neugeborenen zeigen abhängig vom sozioökonomischen Umfeld eine kongenitale HCMV-Infektion (Hamprecht & Jahn, 2007). Diese kann einerseits aus einer Primärinfektion der Mutter mit HCMV und einer intrauterinen Transmissionsrate von 40-50% während der Schwangerschaft resultieren. Andererseits kann bei HCMV-seropositiven Schwangeren das sich in Latenz befindliche Virus reaktiviert werden und so in etwa 1% der Fälle zu einer Infektion des Neugeborenen föhren (Hamprecht & Jahn, 2007). Reaktivierung und Reinfektion beschreiben die rekurrente Infektion. Infektionen mit einem weiteren Virusstamm in Hochprävalenzländern föhren ebenfalls zu einer Infektion des Feten im Sinne der Non-Primärinfektion (Mussi-Pinhata et al., 2010; Mussi-pinhata et al., 2018). Die kongenitale Infektion des Neugeborenen wird durch Virusausscheidung in Urin oder Speichel oder spezifische IgM-Antikörper im Serum nachgewiesen. In den meisten Fällen ist auch eine disseminierte CMV-Infektion mit Detektion viraler DNA im EDTA-Gesamtblut oder Plasma nachweisbar (Hamprecht & Goelz, 2022). Eine symptomatische Infektion zeigt sich bei etwa 7-10% aller infizierten Neugeborenen mit Ikterus, petechialen Blutungen, Retinitis, Hepatosplenomegalie und/oder neurologischen Störungen, bei Beteiligung des zentralen Nervensystems, wie geistige Retardierung, motorischen Defiziten oder Schwerhörigkeit bis zur Taubheit (Mandell et al., 2010). Im europäischen Raum zeigten sich von etwa 5,4 Millionen jährlichen Geburten 0,7% (37.800 Kinder) kongenital mit HCMV infiziert (Kenneson & Cannon, 2007), wovon 18%

(6807 Kinder) bleibende Folgeschäden davontrugen (De Vries et al., 2011) und 0,5% (192 Kinder) verstarben (Dollard et al., 2007).

Eine Muttermilch-assoziierte postpartale HCMV-Infektion kommt bei 35-40% aller Neugeborener von HCMV-seropositiven Müttern vor und gefährdet frühgeborene Kinder vor der 30. Schwangerschaftswoche und/oder mit unter 1500g Geburtsgewicht deutlich stärker als Reifgeborene, bei denen die Infektion fast immer asymptomatisch oder mit leichten Mononukleose-ähnlichen Symptomen abläuft (Hamprecht et al., 2001; Hamprecht & Jahn, 2007; Lanzieri et al., 2013; Meier et al., 2005).

1.1.6 Nachweismethoden von HCMV bei vertikaler Transmission

Zum Nachweis des Virus werden sowohl Verfahren zum direkten Virusnachweis (Virusisolierung, Virus-Antigen oder virale DNA) wie auch zum indirekten Virusnachweis (Serologie) angewendet. Das humane Cytomegalievirus lässt sich in unterschiedlichsten Sekreten wie Urin, Vollblut, Trockenblutfilterkarte (Guthrie-Karte), Liquor, Speichel sowie Trachealsekret als auch Fruchtwasser und Muttermilch nachweisen (Hamprecht & Jahn, 2007).

Direkte Nachweisverfahren stellen die qualitative wie quantitative PCR, der nachweisbare cytopathische Effekt in Kultur bei Virusisolierung (CPE; Durchlichtmikroskopische Detektion von HCMV-spezifischen morphologischen Zellveränderungen) und der pp65-Antigentest dar, welcher nicht-permissiv infizierte neutrophile Granulozyten im Blut nachweist.

Indirekte Nachweisverfahren sind der Nachweis von HCMV-spezifischen IgG- und IgM-Immunglobulinen mittels ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) sowie bei Primärinfektionen die HCMV-IgG-Avidität (Hamprecht & Jahn, 2007) und HCMV-Neutralisation (Eggers et al., 2001).

An Hand der Trockenblut-Filterkarten, welche im Rahmen des Neugeborenen Screenings am 2. bis 4. Lebenstag des Neugeborenen angelegt werden, lässt sich eine konnatale Infektion mit HCMV von einer postnatalen differenzieren (Barbi et al., 2000).

1.1.6.1 Serologie

Mit Hilfe serologischer Untersuchungen von HCMV-spezifischen Antikörpern lässt sich der Serostatus eines Individuums bestimmen. Es gibt dazu diverse Screening-Verfahren, welche HCMV-IgM, HCMV-IgG und die IgG-Avidität nachweisen (Hamprecht, Jahn in Neumeister,

Geiss and Braun, 2009). Im Gegensatz zu HIV, HBV oder Röteln-Virus, welche in der Schwangerschaft zur Testung vorgeschrieben sind, wird der HCMV Serostatus nicht erhoben. Basierend auf der AWMF-Leitlinie zur Labordiagnostik Schwangerschafts-relevanter Virusinfektionen (2014) soll bei jeder Schwangeren mit Risikofaktoren für vertikale Transmission durch Präsenz von Kindern unter 3 Jahre im Haushalt eine serologische Untersuchung zur Bestimmung von CMV IgG durchgeführt werden.

Dabei definiert die IgG/IgM-Serokonversion den Goldstandard zur Diagnostik einer HCMV-Primärinfektion. Sie beschreibt die Serokonversion von initial gebildeten IgM- und IgG-Antikörpern gegen HCMV. Bei bereits bestehender HCMV-IgG Seropositivität vor Schwangerschaftsbeginn mit hoher CMV IgG Avidität kann von einer zurückliegenden, latenten HCMV-Infektion ausgegangen werden. Theoretisch kann im Verlauf der Schwangerschaft eine Reinfektion mit einem neuen Virusstamm oder eine Reaktivierung des eigenen Virus im Sinne einer Non-Primärinfektion stattfinden (Mussi-pinhata et al., 2018) .

Bedeutsam für eine Infektion in der Schwangerschaft ist die Einteilung des Infektionszeitpunkt in prä- bzw. perikonzeptionell sowie in 1., 2. oder 3. Trimenon. Das Risiko der Virusübertragung von Mutter auf Foetus liegt prä-, bzw. perikonzeptionell bei 16,7 bzw. 34,5% und ansteigend im 1. Trimenon bei 30,1%, im 2. Trimenon bei 38,2% und im 3. Trimenon bei 72,2%. Das Risiko für einen symptomatischen Verlauf beim Kind und bleibende Schädigungen ist umgekehrt im 1. Trimenon sowie perikonzeptionell stark erhöht und nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab (Enders et al., 2011) Erst die Kombination aus serologischen Untersuchungen mittels IgM- und IgG-Titer, IgG-Avidität, anti-gB-Serokonversion (rekombinanter Immunoblot) und das Vorhandensein oder Fehlen neutralisierender Antikörper im Fibroblastensystem ermöglichen eine genauere Charakterisierung des Infektionstypes sowie Infektionszeitraums (Hamprecht, Jahn in Neumeister, Geiss and Braun, 2009)(Tabelle 1).

1.1.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die gesuchte DNA-Sequenz wird nach Extraktion der DNA aus dem zu untersuchenden Material (zum Beispiel Blut, Liquor, Muttermilch) mittels Nukleinsäureamplifikation vervielfältigt. Die dazu verwendeten Primer (spezifische kurze DNA-Oligonukleotide) stammen aus essentiellen HCMV Gen-Regionen wie der IE1-Genregion (Immediate Early), der MIE- (Major Immediate Early) oder der gB-Region (Hamprecht, Jahn in Neumeister, Geiss and Braun, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Extraktion des zu detektierenden Virus mittels QIAcube (FA. QIAGEN) und die anschließende Amplifikation

im Thermocycler (FA. MJ Research) durchgeführt und nachfolgend mittels Gelelektrophorese nachgewiesen (qualitative HCMV-PCR). Für die Bestimmung der CMV-DNA Viruslast aus EDTA-Gesamtblut und Muttermilch mittels real time PCR wurde die Silica-basierte, automatisierte DNA Extraktion durch QiaCube (Quiagen) sowie die real time PCR mittels des CMV Argene Kit (Biomerieux) und dem LightCycler 2.0 (Roche) eingesetzt.

1.1.6.3 Zellkultur

Nach Aufreinigung des zu untersuchenden Materials mittels Zentrifugation beziehungsweise Sterilfiltration wird das Inokulum auf humanen Vorhaut-Fibroblasten angezüchtet. Zu Kurzzeit-Mikrokultur erfolgt nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C eine Färbung mittels HCMV-IE1-pp72-Antigen (IEAG – Immediate Early Antigen) unter Zuhilfenahme eines monoklonalen Maus anti IE1 -Antikörpers sowie eines peroxidasekonjugierten Anti-Maus-Antikörpers, welcher in einer Redoxreaktion mit Aminoethylcarbazol (AEC) den Zellkern einer HCMV-infizierten Zelle rotbraun anfärbt (Hamprecht, Jahn in Neumeister, Geiss and Braun, 2009). In den 14-tägigen Langzeitkulturen kann eine HCMV-Virusisolierung mittels zytopathischem Effekt zur Bestätigung der Kurzzeit-Kultur sowie zur Virusanzüchtung für eventuell nachfolgende Charakterisierung des Virusstammes durchgeführt werden. Dabei verändert sich die Fibroblastenmorphologie durch HCMV-Infektion charakteristisch (Zellvergrößerung und charakteristische Einschlusskörperchen; „Eulenaugenzellen“). Die Virusisolation und Zellkultur zeigt jedoch eine geringere diagnostische Sensitivität gegenüber der quantitativen HCMV-PCR (Hamprecht, Jahn in Neumeister, Geiss and Braun, 2009).

Tabelle 1: Nachweismethoden abhängig vom Infektionszeitpunkt.

| | Serologie | Fruchtwasser |
|---|--|--|
| Primärinfektion Mutter | Hoher IgM Titer - im Verlauf abfallend | Qualitative PCR-Nachweis |
| | Kein/Niedriger IgG-Titer - im Verlauf zunehmend | Quantitativer PCR-Nachweis ab 21. SSW |
| | Fehlende gB-Reaktivität | |
| | Niedrige IgG-Avidität | |
| Fehlende neutralisierende Antikörper bei Verwendung von Fibroblasten-Targetzellen | | |

| | Urin | Liquor (V.a. Enzephalitis) |
|--|--|----------------------------|
| Kongenitale Infektion Kind (cCMV) | Kurz- (IEAG) und Langzeitkultur (CPE) | Nicht isolierbar aus CSF |
| | PCR Nachweis bis 14. Tag p.p. beweisend | PCR |

| | EDTA-Blut | Guthrie-Karte |
|--|--|---|
| | PCR (Quantitativ zu Bestimmung Viruslast) | PCR (retrospektiv) Nachweis aus Trockenblut- Filterkarte (Kapillarblutentnahme an Tag 4 p.p.) beweisend für cCMV |

| | Urin | Muttermilch |
|--|--------------------------------|--|
| Postnatale Infektion Kind | Kurz- und Langzeitkultur | Kurz- und Langzeitkultur |
| | PCR Nachweis ab Tag 20 p.p. | PCR |
| | Ggfs. EDTA-Blut | Früherer DNAlaktie- Nachweis als Virolaktie |
| | PCR positiv ab Tag 20 | |

1.2 Muttermilch

Stillen, als optimale Ernährungsgrundlage, zeigt deutlich positive Effekte für alle Neugeborenen und Säuglinge sowohl im Sinne kurzfristiger Vorteile wie auch langfristiger. Langzeit Studien zeigen, dass gestillte Kinder eine geringere Kindessterblichkeit sowie eine durchschnittlich höhere Intelligenz aufweisen und weniger chronische Erkrankungen, wie Asthma, Adipositas oder Diabetes mellitus, entwickeln (Armstrong & Reilly, 2002; L. Hanson et al., 1994; Victora et al., 2015). Kurzfristig versorgt die Muttermilch das Kind nicht nur mit wichtigen Nährstoffen, sondern ebenso mit immunologischen Faktoren, welche den kindlichen Organismus schützen und das Immunsystem des Neugeborenen stimulieren (L. Å. Hanson, 1998).

Muttermilch ist ein komplexes Kompartiment, welches seine Zusammensetzung abhängig vom Stadium der Laktation, der Fütterungshäufigkeit, dem Gesundheitszustand von Mutter und Kind, der mütterlichen Ernährung, womöglich genetischen Faktoren sowie vielen anderen Faktoren verändert (Hinde & German, 2012). Sie enthält sowohl unspezifische sowie spezifische humorale und zelluläre Bestandteile, welche Funktionen im kindlichen Stoffwechsel übernehmen und sowohl aktiv wie auch passiv zur Abwehr von Infektionen durch Parasiten, Bakterien oder Viren dienen. Als humorale Bestandteile zur unspezifischen Immunabwehr liefert die Muttermilch unter anderem Lysozym, Laktoferrin sowie Komplementfaktoren. Zur spezifischen Immunabwehr werden IgA, IgG, IgM sowie IgD Immunglobuline übertragen, welche sich im Blut gestillter Kinder als signifikant höher nachweisen lassen (Speer & Hein-Kreikenbaum, 1993). Ebenso konnten polymere Antikörpern der IgA-Klasse gegen spezifische Proteine von Rotaviren, RS-Viren (respiratorisches synzytial Virus) und Herpes simplex Viren (HSV) in der Muttermilch

nachgewiesen werden (Xanthou et al., 1995). Die Arbeit von Van de Perre und Kollegen lieferte weitergehend Hinweise auf eine lokale Synthese von Immunglobulinen (hier IgA und IgM-HIV-Immunglobuline) selektiv im Kompartiment Muttermilch, während im mütterlichen Serum keiner dieser Antikörpersubklassen nachgewiesen werden konnte (Van De Perre, 2003).

Zellen, welche in der Muttermilch nachgewiesen werden können, dienen ebenso zur unspezifischen (Makrophagen, Epithelzellen, neutrophile Granulozyten) wie auch zur spezifischen (T- und B-Lymphozyten) Abwehr. Es zeigte sich, dass selbst bei niedrigem pH-Wert im kindlichen Magen nach Ingestion Milchleukozyten intakt bleiben (Paxson & Cress, 1979). In Pavianen konnte die Adhärenz von radioaktiv-markierten Leukozyten an der Darmschleimhaut sowie die Aufnahme intakter Leukozyten in den kindlichen Organismus und Speicherung in lymphatischen Organen nachgewiesen werden (Jain et al., 1989).

1.2.1 Nichtzelluläre Bestandteile der Muttermilch

Neben Lipiden, Kohlenhydraten wie Laktose, Spurenelementen, Mineralien und Vitaminen die im Verlauf der Laktation sich an die Bedürfnisse des heranwachsenden Säuglings anpassen enthält die Muttermilch verschiedenste immunologische Faktoren. IgA-Immunglobuline, Laktoferrin oder Lysozyme werden nach Ingestion nicht von kindlichen Verdauungsenzymen unbrauchbar gemacht und wirken im Intestinaltrakt des Säuglings als antimikrobieller Schutz (Xanthou et al., 1995). Antiinflammatorische Substanzen wie Cortisol, Zytoprotektoren und epitheliale Wachstumsfaktoren modulieren intestinale, epitheliale Barrieren des Säuglings und bewirken somit eine Barrierefunktion gegen Pathogene und Antigene die eine Gefahr für den kindlichen Organismus darstellen könnten (Goldman, 1993). Ebenso sind verschiedenste Hormone, Nukleotide und –side sowie Polyamine nachgewiesen worden, welche unter dem Begriff Wachstumsmodulatoren oder „milk-born trophic factors“ zusammengefasst werden (Buts, 1998).

1.2.2 Muttermilchzellen

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit stellt die Detektion verschiedener Muttermilch-Leukozyten dar. Der erste Nachweis von zellartigen Bestandteilen in der Muttermilch wurde 1844 durch Alexander Donne erbracht, welche er als „Corpuscles“ bezeichnete (Donne, 1845). 1966 wurden im durch Zentrifugation aufbereiteten Colostrum mikroskopisch Leukozyten identifiziert (C. W. Smith & Goldman, 1968). Im Laufe der Jahre wurden unterschiedlichste Gruppen von Zellen in Muttermilch identifiziert, welche sich in drei Hauptkategorien einteilen lassen: Probiotische Bakterien, der Brustdrüse entstammende

Zellen sowie Zellen, welche aus dem Blut der Mutter in die Muttermilch übertreten (Witkowska-Zimny, 2017).

Probiotische Bakterien wie Laktobacillen und Bifidobakterien sind Teil eines Mikrobioms der Muttermilch, von welchen der Säugling, bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 800ml Muttermilch täglich, etwa 10^7 - 10^8 Bakterien täglich aufnimmt (Boix-Amorós et al., 2016). Dieses Mikrobiom umfasst weiterhin Staphylokokken, Pseudomonaden, Streptokokken sowie Acinetobacter. Es wird vermutet, dass die übertragenen Bakterien einerseits zur Infektprävention des Säuglings beitragen, andererseits zum Schutz einer Kolonisation mit schädlichen Bakterien, wie zum Beispiel *Staphylokokkus aureus*, führen (Iwase et al., 2010). Es fanden sich Hinweise darauf, dass immunologische Zellen, wie dendritische Zellen, nichtpathogene Bakterien aus dem mütterlichen Gastrointestinaltrakt aktiv aufnehmen und über einen enteral-mammären Pfad in die laktierende Brust einschleusen (Langa et al., 2012; Rescigno et al., 2001). Dazu konnten lebende Bakterien eigenständig, sowie assoziiert mit Immunzellen nachgewiesen werden (Boix-Amorós et al., 2016).

Neben Bakterien finden sich nicht-immunologische Zellen, welche der Brust selbst entstammen und nicht aus dem mütterlichen Blut übertreten. Diese heterogene Gruppe beinhaltet Laktozyten, welche für die Milchsekretion der Brustdrüse zuständig sind sowie myoepitheliale Zellen aus den Gängen der Brustdrüse. Bereits 1956 konnten Epithelzellen als Bestandteil von Muttermilch nachgewiesen werden (Papanicolaou et al., 1956). Des Weiteren finden sich Stamm- und Progenitorzellen, welche vor allem in den letzten Jahren Zentrum mehrerer Studien waren, und bis zu 15% der Zellen in Colostrum ausmachen können (Cregan et al., 2007; Patki et al., 2010). Pluripotente Stammzellen in Muttermilch, hBSCs (human breast milk stem cells), wurden das erste Mal 2012 beschrieben und zeigten die Fähigkeit selbsterneuerbare Stammzellen zu generieren, mit dem Potential sich in Zellen aller drei Keimblätter, Ektoderm, Entoderm und Mesoderm, zu differenzieren (Hassiotou et al., 2012). Es wird vermutet, dass diese Zellen nicht nur zu Ausdifferenzierung der Brust zur Milchsekretion beitragen, sondern auch durch Integration im kindlichen Gewebe zur Differenzierung, Ausreifung und Regulation beitragen. Ein Übertritt nach Laktation und Integration in unterschiedlichen Organen des Säuglings konnte im Mausmodell nachgewiesen werden (Hassiotou et al., 2014). Woher diese Zellen stammen, wie sie während der Laktation aktiviert werden und ihr volles Potential ist bisher unklar.

Immunologische Zellen, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, stellen einen aktiven Immunschutz für den Säugling dar, welcher bereits über die Plazenta in Utero beginnt

und postnatal über die Muttermilch weitergegeben wird (Zhou et al., 2000). Auch für immunologische Zellen wurde im Tiermodell nachgewiesen, dass eine Aufnahme von lebenden Zellen durch den kindlichen Intestinaltrakt in das kindliche Blut und Transport zu immunologischen Organen wie Lymphknoten, Leber oder Milz, erfolgt (Cabinian et al., 2016). Einen aktiven Immunschutz liefern diese aufgenommenen, maternalen Immunzellen in der Pathogenbekämpfung durch Phagozytose sowie in der Immunsystem-Modellierung des Kindes (L. A. Hanson, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur durch eine mütterliche Infektion die Anzahl an Leukozyten in der Muttermilch anstieg (Hassiotou et al., 2013), sondern ebenso es zu einem Anstieg der Immunzellzahl kam, wenn das Kind eine Infektion entwickelte (Riskin et al., 2012), was für einen aktiven Austausch sowie Anpassung der Muttermilch auf immunologische Bedürfnisse beider Parteien spricht. Die identifizierten Leukozyten in Muttermilch gleichen den Zellen in Blut, ihre Verteilung zueinander unterscheidet sich jedoch deutlich. 1995 wurde von Xanthou und Kollegen eine Verteilung von etwa 40-50% Makrophagen, 40-50% polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten und 5-10% Lymphozyten veröffentlicht (Xanthou et al., 1995). Trend und Kollegen demonstrierten, dass die Hauptmenge der nachgewiesenen Leukozyten aus 9-20% myeloiden Vorläuferzellen, 12-27% neutrophilen Granulozyten, 8-17% unreife Granulozyten und 6-7% nichtzytotoxische T-Zellen bestand, und im Laufe der Laktation die prozentuale Anzahl der Granulozyten anstieg, während CD16 negative Monozyten, eosinophile Granulozyten sowie B-Zell-Vorläuferzellen abfielen (Trend et al., 2015). Sie konnten ebenfalls zeigen, dass über die Dauer der Laktation die Anzahl von Leukozyten stetig von etwa 146.000 Zellen pro Milliliter Muttermilch in Colostrum bis zum 30. Tag post partum auf etwa 23.500 Zellen pro Milliliter Muttermilch abnimmt (Trend et al., 2015).

Durch Verbesserung und Weiterentwicklung bestehender Nachweisverfahren gelingt eine immer bessere Einsicht und Differenzierung der zellulären Zusammensetzung der Muttermilch. Während Stammzellen sowie Progenitorzellen ein Hauptaugenmerk der momentanen Forschung darstellen, ist die genaue Verteilung und die Verhaltensweise von Leukozyten in Muttermilch sowie ihre Individuums-abhängige Zusammensetzung, wie zum Beispiel bei Müttern im Rahmen der lokalen Reaktivierung mit humanem Cytomegalievirus, noch weitgehend unklar.

| Immunzellen | Funktion |
|---------------------|--|
| Granulozyten | Unspezifische Bekämpfung von Bakterien, Parasiten und Pilzen |

| | |
|--|--|
| NK-Zellen | Elimination virusinfizierter Zellen sowie entartete körpereigene Zellen |
| NKTIlike-Zellen | Regulationsfunktion bei entzündlichen Prozessen mittels Botenstoffen (z.B. Chemokine, Zytokine) |
| Klassische Monozyten (CD14+) | Phagozytosefähig und Präsentation körperfremder Strukturen zur spezifischen Immunantwort |
| Nicht klassische Monozyten (CD14+CD16+) | Steuerung der Immunreaktion |
| T-Zellen | Spezifische Zerstörung infizierter körpereigener Zellen sowie Regulationsfunktion |
| B-Zellen | Bindung und Präsentation körperfremder Stoffe und Immunglobulinproduktion zur spezifischen Immunabwehr |

Tabelle 2: Immunzellen der Muttermilch, welche im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden

1.2.3 Laktation

Bereits vor Geburt beginnt die sich während der Schwangerschaft veränderte Brustdrüse mit der Herstellung eines protein- und Immunglobulin A-reichen Sekrets, des Colostrums, welches dem Säugling in den ersten Lebenstagen neben Nahrung einen temporären Immunschutz bietet.

Etwa 1-2 Tage post partum beginnt die Brustdrüse mit der Produktion von Milchsekret, welche durch den Abfall von Gestagenen und Östrogenen, einer vermehrten Ausschüttung von Prolaktin (aus dem Hypophysenvorderlappen der Mutter) sowie, durch den Saugreiz des Kindes angeregt, Oxytocin (Produktion im Hypothalamus und Ausschüttung über den Hypophysenhinterlappen), angeregt wird. Das Hormon Prolaktin fördert das Brustdrüsenwachstum und Sekretion der Milch, während Oxytocin zur Kontraktion der Myoepithelzellen und damit zur Exkretion der Milch aus der Brust beiträgt (Diedrich, 2007).

1.2.4 Virustransmission von HCMV über das Medium Muttermilch

Die erstmalige Isolierung von humanen Cytomegalieviren gelang 1967 durch Diosi und Kollegen aus einer Muttermilchprobe (Diosi et al., 1968). Erstmals auf humanen Fibroblasten angezüchtet, konnte 1972 aus Muttermilchproben von 63 HCMV-seropositiven Müttern 17 Virusisolate gewonnene werden (Hayes et al., 1972). Bereits 1983 wurde durch Dworsky und Kollegen neben den potentiellen Infektionsquellen Speichel, Urin, Blut und Genitalsekret das hohe Risiko der Cytomegalievirustransmission über Muttermilch beschrieben. Es zeigte sich von insgesamt 39% der HCMV-seropositiven Mütter eine Reaktivierung mit einer 69% postpartalen Transmission des Virus auf die gestillten Kinder. Alle infizierten reifgeborenen

Kinder, welche HCMV im Urin als Nachweis der Infektion ausschieden, zeigten einen asymptomatischen Verlauf, während zwei frühgeborene Kinder symptomatisch erkrankten. Daraus wurde gefolgert, dass Frühgeburtlichkeit und niedriges Geburtsgewicht in Korrelation zu der Schwere einer postpartalen HCMV-Infektion stehen (Dworsky et al., 1983).

Mit der Einführung sensitiverer Nachweisverfahren, unter anderem der DNA-PCR zur Detektion spezifische viraler Nukleinsäuren, konnte 1994 in 92,3% der Muttermilchproben HCMV-seropositiver Mütter nach einem Monat post partum HCMV nachgewiesen werden, während im Kultursystem nur 30% der Virusanzucht gelang (Hotsubo et al., 1994).

Seit 1995 widmet sich die Abteilung Medizinische Virologie der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit der Neonatologie der Universität Tübingen dem Thema der postnatalen Transmission von HCMV durch Muttermilch. In verschiedenen Studien wurden HCMV-seropositive und HCMV-seronegative Mütter während der Laktation einem HCMV-Screening mittels Serologie, Virusisolierung sowie PCR aus Muttermilch unterzogen. Es zeigte sich, dass in 94,3% der HCMV-seropositiven Mütter in einer spezifischen Laktationsphase DNAlaktie und Virolaktie nachweisbar waren und sich der Prozess der Reaktivierung lokal auf die Brustdrüse beschränkte ohne Nachweis einer systemischen Infektion (Hamprecht et al., 1998; Vochem et al., 1998).

Der genaue Ablauf der lokalen Virusreaktivierung ist noch nicht vollständig erforscht. Es wird vermutet, dass bioaktive Substanzen in der laktierenden Brustdrüse das humane Cytomegalievirus in seiner Latenzphase in Monozyten anregen (Meier et al., 2005). Sinclair und Kollegen vermuteten ebenfalls die Persistenz des Virus in Monozyten, welche bei Ausreifung zu Makrophagen das virale Genom reaktivieren und exprimieren (Sinclair & Sissons, 2006).

1.3 Virusinaktivierung in Muttermilch

Über Jahre hinweg wurden verschiedenste Versuche zur Inaktivierung von HCMV und anderen Viren in der Muttermilch als Überträgermedium unternommen. Ziel dabei ist es mit einer ausreichenden Sicherheit das Virus zu eliminieren, ohne dabei die vielzähligen positiven Faktoren der Muttermilch, wie nutritive und immunologische Faktoren, zu zerstören. In Kooperation mit der Neonatologie der Universitätsklinik Tübingen entwickelte die Abteilung Virologie das Verfahren der Kurzzeitpasteurisierung (Hamprecht et al., 2004). Im Gegensatz zur traditionellen Holder-Methode (Holderpasteurisierung) wurde die Dauer der Pasteurisierung drastisch (von 1,5h auf 5 Sekunden) verringert um der Denaturierung von

Muttermilchbestandteilen (unter anderem Lysozym, Wachstumsfaktoren) vorzubeugen (Goelz et al., 2009). Im entwickelten Verfahren wird ein Milchfilm aus 20-50ml nativer Muttermilch über einem rotierenden Rundhalskolben erzeugt und mittels Heißluft für 5 Sekunden auf 62°C erhitzt. Die Muttermilch wird nachfolgend durch den Einstrom von kaltem Wasser auf 30°C abgekühlt. Die Gesamtzeit der Erwärmung über 37°C liegt dadurch bei unter 90 Sekunden (Hamprecht et al., 2004).

1.4 Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Medium Muttermilch als einzigartiges Kompartiment der HCMV-Reaktivierung und Vektor der Virustransmission auf neugeborene Kinder untersucht werden. Das untersuchte Kollektiv setzte sich aus HCMV seropositiven sowie seronegativen Müttern zusammen, deren Kinder auf den neonatologischen Stationen der Kinderklinik der Universität Tübingen betreut wurden. Die Muttermilchproben wurden so frisch wie möglich, im Durchschnitt etwa zwei Stunden nach dem Abpumpen, durch differentielle Zentrifugation in die zelluläre Fraktion und zellfreie Molkefraktion getrennt.

Das Hauptziel dieser Arbeit soll der Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der Muttermilch, dem Nachweis von humanem Cytomegalievirus in dieser sowie dem Einfluss des Virus auf die zelluläre Zusammensetzung der Muttermilch in Abhängigkeit vom maternalen Serostatus gewidmet sein.

Dazu werden nach Fraktionierung der Muttermilch in ein zell- und fettfreies Kompartiment sowie ein zell-assoziiertes Kompartiment eine Kurz- (18h) und Langzeit-Viruskultur (10 Tage) sowie eine PCR-Analyse beider Fraktionen durchgeführt. Die HCMV-spezifische Zielsequenz nutzt Oligonukleotid-spezifische Primer der „Immediate Early 1-Exon 4“-Genregion. Dies soll zeigen ob und in welcher Konzentration virale DNA und infektiöses Virus zum jeweiligen Laktationszeitpunkt ausgeschieden werden. Gegenüber dem Nachweis viraler DNA in der zellulären Fraktion, welche nur einen geringen prädikativen Wert zum Nachweis einer aktiven Virusinfektion mit humanem Cytomegalievirus besitzt, bietet der Nachweis von viraler mRNA einen diagnostischen Marker aktiver Virusreplikation (Meyer-König et al., 1995) in der jeweiligen Zellfraktion der Milchprobe. Dieser RNA-Nachweis ermöglicht eine genauere Zuteilung der Phase der aktiven Virusausscheidung zur zellulären Zusammensetzung der untersuchten Muttermilchproben.

Die isolierten Muttermilchzellen werden teils mit Hilfe von Cytospinpräparation auf Objektträgern fixiert, anschließend gefärbt und darauf mikroskopisch ausgewertet sowie

fotografiert, um die morphologischen Unterschiede der Zellen zu dokumentieren und in Vergleich zu ihrem Äquivalent im Blut zu setzen. Mikroskopische Zellzählung soll dazu beitragen die sich im Laktationsverlauf verändernde spezifische Zellfrequenz, in Hinblick auf den HCMV-Serostatus der Spenderin, zu verfolgen.

Der andere Teil der isolierten Zellen wird per Durchflusszytometrie und ImageStream-Analyse mit Hilfe von Dr. Kilian Wistuba-Hamprecht aus der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen ausgewertet und mittels spezifischer Oberflächenantigene charakterisiert. Dies soll Aufschluss über die Art und Zusammensetzung der Muttermilchzellen geben und in Kombination mit dem Serostatus der jeweiligen Spenderin Einblicke geben auf den möglichen Einfluss, den HCMV auf die zelluläre Zusammensetzung der Muttermilch hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungs-Kohorte

Die untersuchte Kohorte bestand aus Spenderinnen, deren Kinder auf den Stationen der Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen versorgt wurden. Die Spenderinnen stellten mindestens eine Muttermilchprobe zu unterschiedlichen Laktationszeitpunkten zur Verfügung. Eine Aufteilung der Kohorte erfolgte anhand des HCMV-Serostatus, welcher routinemäßig vor Geburt im Universitätsklinikum Tübingen erhoben wird. Seropositive Spenderinnen werden im Folgenden als Subkohorte HCMV-seropositiv oder HCMV + bezeichnet. Die Subkohorte der seronegativen Spenderinnen wird als HCMV-seronegativ oder HCMV - benannt. Die Anzahl an teilnehmenden Spenderinnen sowie die Anzahl an Muttermilchproben und für welches Verfahren sie verwendet wurden zeigt Abbildung 2. Tabelle 2 zeigt die einzelnen Spenderinnen, Gestationsalter (GA; Woche + Tag) und Geburtsgewicht (GG; in Gramm) des Neugeborenen, den HCMV-Serostatus der Spenderin sowie zu welchem Laktationszeitpunkt Proben für welche weitere Untersuchung gewonnen wurden. Bei zwei Spenderinnen (Mutter 20 und Mutter 21) lag kein HCMV-Serostatus vor, ihre Proben wurden in keine der weiteren Analysen miteinbezogen.

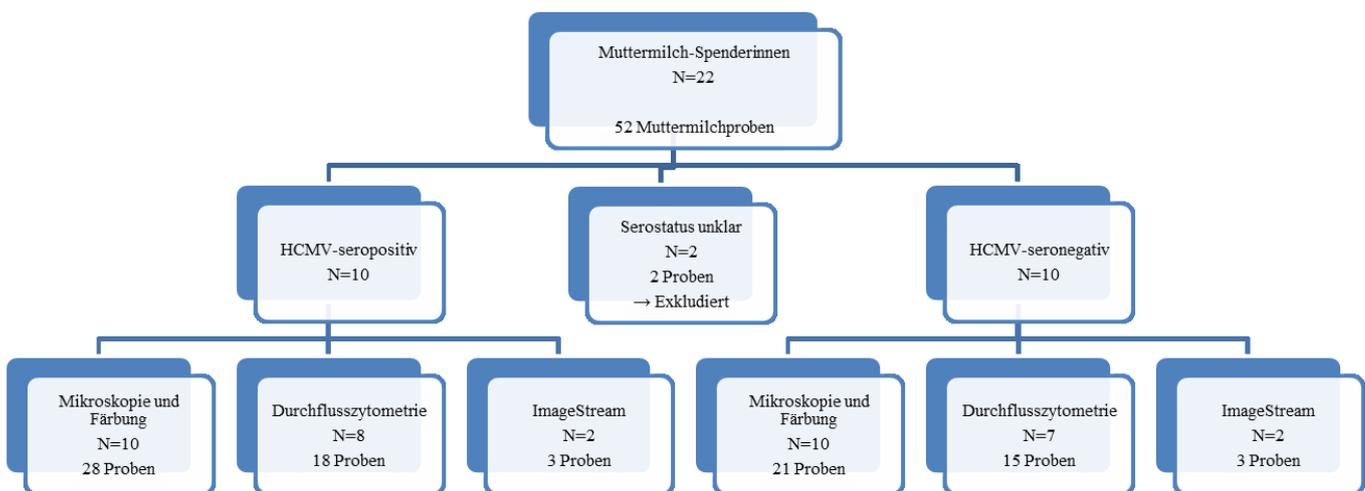


Abbildung 2: Organigramm teilnehmender Spenderinnen, gesammelter Muttermilchproben und verwendeter Verfahren. Anzahl der Spenderinnen im jeweiligen Segment (N). Bei unklarem HCMV-serostatus wurden zwei Proben von zwei Spenderinnen nicht in die weitere Analyse integriert.

Tabelle 2: Spenderin, Gestationsalter (GA; Woche + Tag) und Geburtsgewicht (GG; in Gramm) des Neugeborenen, HCMV-Serostatus und spezifische Weiterverarbeitung je Probe

| Spenderin | GA | GG | HCMV-Serostatus | Tag p.p. Mikroskopie und Färbung | Tag p.p. Durchflusszytometrie | Tag p.p. ImageStream |
|-----------|------|------|-----------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Mutter 1 | - | - | HCMV + | 47 | | |
| Mutter 2 | 30+4 | 1400 | HCMV - | 38, 45 | | |
| Mutter 3 | 33+4 | 2320 | HCMV + | 17, 29 | | |
| Mutter 4 | 24+2 | 590 | HCMV + | 57, 73, 99, 108, 110, 122, 131 | 108, 122, 131 | |
| Mutter 5 | 27+5 | 870 | HCMV - | 32 | | |
| Mutter 6 | 27+3 | 923 | HCMV - | 55, 57, 69 | 55, 57 | |
| Mutter 7 | 37+4 | 2680 | HCMV - | 11, 13 | 11, 13 | |
| Mutter 8 | 22+0 | 480 | HCMV + | 20, 48, 55, 62 | 20, 48, 55, 62 | |
| Mutter 9 | 30+1 | 1630 | HCMV - | 12, 41, 47, 54, 61, 67 | 12, 41, 47, 54, 67 | 61, 67 |
| Mutter 10 | 34+5 | 2515 | HCMV + | 13, 22, 42, 47, 57, 68 | 13, 22, 42, 68 | 68 |
| Mutter 11 | 29+1 | 1145 | HCMV + | 29, 39 | 29, 39 | |
| Mutter 12 | 27+3 | 1150 | HCMV - | 51, 57, 78 | 51, 57, 78 | 78 |
| Mutter 13 | 33+2 | 1985 | HCMV + | 10, 17 | 10, 17 | |
| Mutter 14 | 38+4 | 3230 | HCMV - | 12 | 12 | |
| Mutter 15 | 34+4 | 2650 | HCMV + | 12 | 12 | |
| Mutter 16 | 30+0 | 1520 | HCMV - | 44 | 44 | |
| Mutter 17 | 40+5 | 4100 | HCMV + | 14, 20 | 20 | 14, 20 |
| Mutter 18 | 35+6 | 1195 | HCMV - | 16 | 16 | |
| Mutter 19 | 34+0 | 2200 | HCMV - | 11 | | |
| Mutter 20 | - | - | Keine Daten | (9) | (9) | |
| Mutter 21 | - | - | Keine Daten | (16) | (16) | |
| Mutter 22 | 35+5 | 2250 | HCMV + | 3 | 3 | |
| | | | | 49 Proben | 33 Proben | 6 Proben |

2.1.2 Muttermilch

In Kooperation mit der Neonatologie der Universität Tübingen wurden Frauen mit Neugeborenen um Milchspenden gebeten. Diese Frauen stellten freiwillig und nach Unterzeichnung einer Einverständniserklärung im Durchschnitt etwa 20ml Muttermilch zur Verfügung.

Bei Akquirieren der Milchproben wurde sichergestellt, dass die Milchversorgung des Neugeborenen gewährleistet war und zu Studienzwecken nur im Übermaß vorhandene Milch verwendet wurde.

Die Milch wurde von den Frauen durch auf den Stationen bereitgestellte Milchpumpen manuell in sterile Einmalbehälter abgepumpt und entweder direkt frisch bearbeitet oder für maximal 6 Stunden im Kühlschrank bei 4°C gelagert und nachfolgend bearbeitet.

2.1.3 Molke

Die Molkefraktion wurde durch differentielle Zentrifugation und Sterilfiltration aus der nativen Milch gewonnen und zur Untersuchung auf HCMV folgenden Analysen unterzogen:

- Nested PCR auf HCMV
- Kurzzeit- und Langzeit-Viruskultur

2.1.4 Zellen

2.1.4.1 Muttermilchzellen

Die Gesamtmilchzellfraktion wurde durch differentielle Zentrifugation aus der nativen Milch isoliert und zur Untersuchung der Zellpopulationen und des Zelltropismus von HCMV folgenden Analysen unterzogen:

- PCR auf HCMV
- Kurzzeit- sowie Langzeit-Viruskultur
- Cytospinpräparation und folgend allgemeine sowie spezifische immunhistochemische Färbungen
- FACS-Analyse der Gesamtzellpopulation im Durchflusscytometer
- ImageStream-Analyse der Gesamtzellpopulation

2.1.4.2 HFF (*human foreskin fibroblasts, humane Vorhautfibroblasten*)

In der Routine Diagnostik sowie zu Forschungszwecken werden Humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF, SCRC-1041 TM, ATCC®, Manassas, VA, USA) zur Bestimmung der Infektiosität vom Humanen Cytomegalie Virus in biologischen Materialien wie Urin, Plasma, Liquor oder Muttermilch verwendet. Sie werden aus Biopsiegewebe nach Zirkumzision gewonnen und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fischer Scientific) kultiviert.

Die Fibroblasten wachsen adhärent und als Monolayer in Kulturflaschen oder Mikrotiterplatten und finden Verwendung bei der Virusisolierung und Viruskultur.

Passagezahlen bis 30 erwiesen sich als geeignet.

2.1.5 Reagenzien (Tabelle 3)

| Reagenzien | Katalognummer | Firma |
|---|----------------|--------------------------------|
| 2 N HCl | # 1.09063.1000 | Merck |
| 3-amino-9-Ethylcarbazol (AEC) | # A-5754 | Sigma |
| Aceton zur Analyse (p.a.) | #LC-4916.2 | BioFroxx |
| Bromphenolblau-Xylencyanol Färbelösung (0.5 % Bromphenolblau, 0.5 % Xylencyanol) | # B3269-5ML | Sigma-Aldrich |
| Clean | # 340345 | BD |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | # 20385.01 | Serva |
| dATP [100 mM] | # U120A | Promega |
| dCTP [100 mM] | # U122A | Promega |
| dGTP [100 mM] | # U121A | Promega |
| dTTP [100 mM] | # U123A | Promega |
| Ethanol absolut EMSURE® | # 1.00983.1011 | Merck |
| Eisessigsäure | # 1.00063.2511 | Merck |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | # 11278.02 | Serva |
| Fetales Kälberserum (FCS) | # 10500 | Gibco |
| FicoLite-H | # GTF1511KYK | Linaris-blue |
| Flow | # 342003 | BD |
| Formamid | # A2156,0100 | AppliChem |
| Formaldehyd 37% | # 141328.1211 | AppliChem |
| Giemsa's Azur-Eosin- Methylenblaulösung | # 1.09204.1000 | Merck |
| H₂O₂, 30% | # 1.07209.0250 | Merck |
| Kaisers Glycerin-Gelatine | # 109242 | Merck |
| Mayers Hämalaun | # 1.09249.0500 | Merck |
| May-Grünwald's Eosin-Methylenblau | # 1.01352.0025 | Merck |
| Methanol zur Analyse (p.a.) | # 20847.307 | Prolabo |
| Midorigrün Advance | # MG04 | Nippon Genetics Europe GmbH |
| Mineral-Öl | # M5904 | Sigma |
| Mausserum | # S25-10ML | Merck Millipore |
| N,N-Dimethylformamid (DMF) | # D-4551 | Sigma |
| Penizillin/Streptomycin (pen/strep) | # 15140-122 | Gibco |
| Rinse | # 340346 | BD |
| Natriumchlorid (NaCl) | # 1.06404.1000 | Merck |
| Natriumazid (NaN₃, 10 %) | # 13553.001 | Morphisto |
| Natriumacetat | # 1.06268.0250 | Merck |
| SeaKemLE Agarose | # 50004 | Lonza Group AG |
| Trizma® base | # T-6066 | Sigma |
| Trypanblau | # T-8154 20ML | Sigma |

| | | |
|----------------------------------|----------------|-------|
| TrypLE™ Express (trypsin) | # 12604-013 | Gibco |
| Tween®20 | # 8.22184.0500 | Merck |

2.1.6 Lösungen und Puffer (Tabelle 4)

| Lösungen und Puffer | Zusammensetzung / Firma |
|--|--|
| AEC Stammlösung | 0.4 % AEC in DMF |
| AEC Arbeitslösung | 5 % AEC Stammlösung Verdünnt in Natriumacetat Puffer 0.1 % H ₂ O ₂ |
| CutSmart® Puffer (pH 7.9) | NEB (# B7204S) |
| Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7 | SIGMA (# D8537) /GIBCO (# 14190-169) |
| Durchflusszytometrie Färbepuffer (PFEA) | PBS with: 2 % FCS 2 mM EDTA 0.01 % Natriumazid |
| Hank's balancierte Salzlösung mit Natriumbikarbonat (HBSS) | Sigma Aldrich (# H6648) |
| Lade-Farbstoff Gelelektrophorese | 20 % Bromphenolblau- Xylencyanol Färbelösung verdünnt in Formamid |
| Natriumazetat Puffer | Stammlösung 10x: 1 M Natriumazetat 2.9 % Eisessigsäure verdünnt in ddH ₂ O pH 4.9 (mit HCl angepasst) |
| Tris/borat/EDTA Puffer 10x (TBE, pH 8.3) | Roth (# 3061.1) |
| Tris-gepufferte Kochsalzlösung 10x (TBS) | Stammlösung 10x: 0.5 M Trizma® base 1.5 M Natriumchlorid verdünnt in ddH ₂ O pH 7.6 (mit HCl angepasst) |
| TBS Waschpuffer | 1x TBS + 0.2 % Tween®20 |
| Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM), hoher Glukosegehalt, ohne Natriumpyruvat oder HEPES | Gibco (# 42430-085) + 5/10 % FCS + 100 U/ml Penicillin/streptomycin |
| “Roswell Park Memorial Institute“-Medium (RPMI-1640) | Sigma Aldrich (# R8758) |
| Luria Broth (LB) Bouillon | Carl Roth (# X968.2) 5 g LB-bouillon + 250 ml destilliertes H ₂ O autoklaviert |

2.1.7 Kits (Tabelle 5)

| Kit | Katalognummer | Firma |
|--|------------------|---------------|
| α-Naphthyl acetate esterase | # 91A-1KT | Sigma-Aldrich |
| QIAamp Blood mini | # 51106 | Qiagen |
| Taq DNA polymerase | # 11 418 432 001 | Roche |

2.1.8 Primer (Tabelle 6)

| Primer | Nukleotid-Position | Sequenz (5' zu 3') |
|--------------------------|--------------------|-------------------------------|
| IEP4 C (Äußerer) | 1729 - 1748 | TGA GGA TAA GCG GGA GAT GT |
| IEP4 D (Äußerer) | 1951 - 1970 | ACT GAG GCA AGT TCT GCA GT |
| IEP4 D* (Äußerer) | 1951 - 1970 | ATT GAG GCA AGT TCT GTA AC |
| IEP4 A (Innerer) | 1767 - 1786 | AGC TGC ATG ATG TGA GCA AG |
| IEP4 A* (Innerer) | 1767 - 1786 | AAC TCT ATA ATG TGA CCA AG |
| IEP4 B (Innerer) | 1970 - 1951 | GAA GGC TGA GTT CTT GGT AA |

* = IE1-Ex4-Mutationsspezifische primer

2.1.9 Antikörper (Tabelle 7)

| Antikörper | Konjugat | Firma |
|--|------------------------------|----------------|
| GAMUNEX-C 10 % (Standard-Immunglobulinpräparat: Ig-unterklassen: 62.8 % IgG1, 29.7 % IgG2, 4.8 % IgG3, 2.7 % IgG4, IgA<84mg/ml) | - | Grifols |
| Polyklonaler Kaninchen Anti-Maus Antikörpers | Meerrettich-Peroxidase (HRP) | DakoCytomation |

2.1.10 Antikörper Durchflusszytometrie/ImageStream (Tabelle 8)

| Antikörper | Fluoreszenzfarbstoff | Klon und Firma | Expression auf: |
|--------------|----------------------|------------------------|---|
| CD45 | BV510 | HI30, BD Biosciences | Leukozyten (leucozyte common antigen LCA) |
| CD14 | PE-Cy7 | 63D3, Biolegend | Monozyten/Makrophagen (LPS-Rezeptor GPI-linked) |
| CD3 | APC | UCHT1, Biolegend | T-Zellen (CD3-Komplex) |
| CD19 | BV605 | SJ25C1, BD Biosciences | B-Zellen und B-Zell-Vorläufer (SIg -Familie) |
| CD56 | APC/Fire™ 750 | 5.1H11, Biolegend | NK-Zell Marker (NCAM) |
| CD66b | FITC | G10F5, Biolegend | Granulozyten (CEA gene member 6) |

| | | | |
|---------------|--------------------------|----------------------------------|--|
| | | | („CGM6“) GPI-linked) |
| CD16 | Pacific blue | 3G8, Biolegend | Nicht-Klassische Monozyten und Subpopulation von NK-Zellen (Fc-gamma Rezeptor) |
| HLA-DR | PerCPCy5.5 | G46-6, Biolegend, BD Biosciences | MHC II - Antigen-präsentierenden Zellen |
| CD326 | PE | 9C4, Biolegend | Epithelzellmarker (EPCAM) |
| EMA | Ethidium Monoazid Bromid | Biotium | Vitalitätsmarker |

2.1.11 Arbeitsgeräte (Tabelle 9)

| Gerät | Firma |
|---|---------------------------|
| Amnis ImageStreamX Mark II | Luminex Corporation |
| Brutschrank, 37°C, 5% CO2 - „Inkubator C200“ | Labotect |
| Brutschrank, 37°C, 5% CO2 - „Inkubator BBD 6220“ | Heraeus |
| Elektrophoresekammer - „Mini-SUB Cell GT“ | BioRad |
| Durchflusszytometer – BD LSR II | BD Biosciences |
| Gefrierschrank (-20°C) | Liebherr |
| Gefrierschrank (-80°C) HeraFreezer“ | Heraeus |
| Geldokumentationsgerät – „GelDoc XR | BioRad |
| Kühlschrank – „ThermoCryotechnics“ | Thermo Life Science Ltd. |
| Kühlraum (+4°C) – „4061 TRR08“ | Stiel |
| Laminar-Flow Sterilbank – „HeraSafe“ | Heraeus |
| Laminar-Flow Sterilbank | BDK |
| Magnetrührgerät – „MR 3001 K“ | Heidolph |
| Mikroskop – „Olympus BX51 TF“ | Olympus |
| Mikroskopkameraaufsatz – „Olympus DP71“ | Olympus |
| Mikroskop – „Axiolab“ – 66238C | Zeiss |
| Mikrowellenherd – „Micromat“ | AEG |
| Netzgerät für Gelelektrophorese - „PowerPac 300 | BioRad |
| Peltier Thermal Cycler – „PTC-200“ | MJ Research |
| pH-meter - MultiCal | WTW |
| Pipetten, elektronisch – „Easypet“ | Eppendorf |
| Pipetten - „Reference“ 0,5-10µl + 10-100µl + 50-200µl + 100-1000µl | Eppendorf |
| Pipetten - „Research“ 30-300µl | Eppendorf |
| Pipetten - „Research pro“ 50-1200µl | Eppendorf |
| QIAcube | QIAGEN |
| Vortex – „REAX Top“ | Heidolph |
| Waage – „GJ“ | Kern |
| Zellkulturplatten – 96-well Advanced TC | Greiner Bio-One |
| Zellkulturflasche - CELLSTAR 50 ml 25 cm ² | Greiner Bio-One |
| Zellkulturflasche - CELLSTAR® 250 ml 75 cm ² | Greiner Bio-One |
| Zentrifuge – „Biofuge Stratos“ | Thermo Fischer Scientific |

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Zentrifuge - Heraeus Multifuge X3 FR | Thermo Fischer Scientific |
| Zentrifuge – „Eppendorf 5810R“ | Eppendorf |
| Zentrifuge – „Eppendorf 5415D“ | Eppendorf |
| Zentrifuge – „Eppendorf 5804R“ | Eppendorf |
| Zentrifuge - „Shandon Cytospin 3“ | Shandon |
| Zentrifuge - Centra GP8R Unity lab | International Equipment Company (IEC) |
| Zentrifuge - Universal 32R | Hettich Zentrifugen |

2.1.12 Software (Tabelle 10)

| Software | Firma |
|--------------------------------|------------------------|
| BD FACSDiva™ | BD Biosciences |
| FlowJo | BD Biosciences |
| IDEAS® image analysis software | Luminex Corporation |
| GraphPad Prism | GraphPad Software Inc. |
| Microsoft Office 2010 | Microsoft |
| JMP | SAS Institute GmbH |

2.1.13 Ethikvotum

Diese Arbeit wurde durch die Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen am 25.02.2016 geprüft und keine Bedenken ausgesprochen.

Aktenzeichen 804/2015BO2

2.2 Methoden

2.2.1 Aufarbeitung der Muttermilch

Die frische oder maximal 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrte Muttermilch, die durch Mütter, deren Kinder auf den neonatologischen Stationen der Universitätsklinik Tübingen untergebracht sind, bereitgestellt wird, wird nach selbst erarbeitetem Schema, welches sich am Protokoll zur Milchaufarbeitung der Arbeitsgruppe Hamprecht orientiert (Hamprecht et al., 1998), durch differentielle Zentrifugation und Sterilfiltration in zwei Fraktionen getrennt, die der zellfreien Molke und die der Zellen.

Jeweils 10-15 ml der nativen, kühl gelagerten Muttermilch wird nach folgendem Schema aufgearbeitet:

1. Native Muttermilch in 15ml Falcontubes wird für 10 Minuten bei 4°C mit 400g zentrifugiert.
2. Die Rahmschicht wird abgesaugt und verworfen, der Überstand bis 500µl über dem Zellpellet wird mit einer Pipette in ein neues 15ml-Falcontube überführt.
3. Dem Falcon mit enthaltenem Pellet werden 2,5ml PBS hinzugefügt, die Zellen werden resuspendiert und das Falcon für 5 Minuten bei 4°C mit 280g zentrifugiert.
4. Danach wird der Überstand bis 500µl über dem Pellet vorsichtig abgesaugt und verworfen und das Pellet mit weiteren 2,5ml zugegebenem PBS suspendiert.
5. Erneute Zentrifugation des Röhrchens für zweimal 5 Minuten bei 4°C mit 280g.
6. Erneutes Absaugen des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in 1ml PBS. Abschließende Filtrierung durch einen 40µm Cell-Strainer zur Gesamtmilchzellfraktion.
7. Der bei Schritt 2 überführte Überstand wird für 10 Minuten bei 4°C mit 3.200g zentrifugiert.
8. Anschließend wird mit einer Pasteurpipette die Rahmschicht durchstoßen, die darunterliegende Molke abgesaugt und in ein neues Falcontube überführt.
9. Die Molke wird durch einen 0,22µm-Filter in ein weiteres Falcon steril filtriert um die zellfreie Molke-Fraktion zu erhalten.

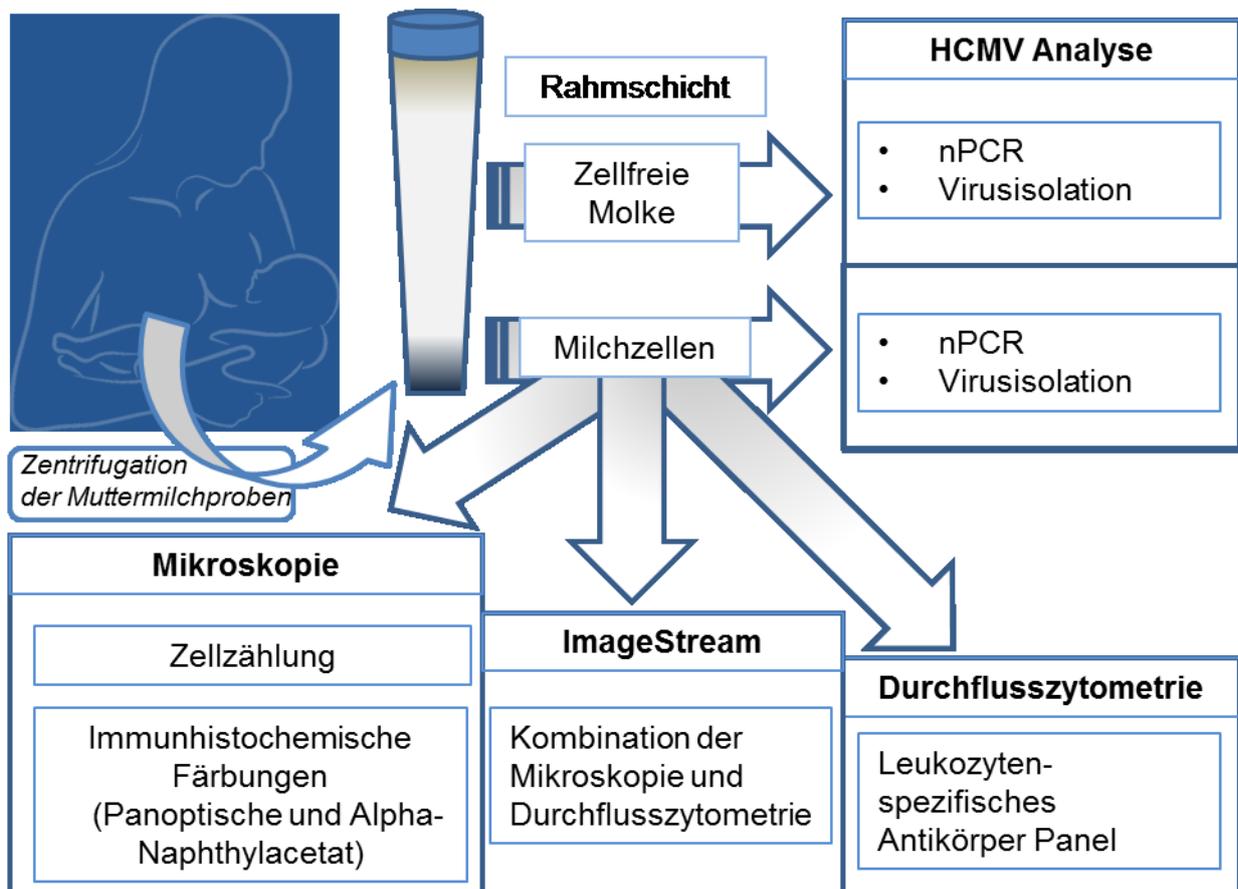


Abbildung 3: Flussdiagramm der Verarbeitung und Verwendung der aufbereiteten Muttermilchproben. Nach Zentrifugation wurde die zellfreie Molke sowie Teile der gewonnenen Milchzellen zum HCMV Nachweis durch Virusisolation und Polymerasekettenreaktions Analyse verwendet. Der weitere Teil der Milchzellen wurde einerseits zur mikroskopischen Analyse und Färbung verwendet, zur ImageStream-Analyse sowie zur Durchflusszytometrie.

2.2.2 Aufteilung der Molke-Fraktion

Die steril filtrierte Molke wird für weitere Analysen nach folgendem Schema aufgeteilt:

- 1 ml Molke für die Kurzzeit-Viruskultur
- 1 ml Molke für die Langzeit-Viruskultur
- 200µl Molke für die DNA-Extraktion im QiaCube zur PCR-Analyse (nPCR)

2.2.3 Aufteilung der Gesamtmilchzellfraktion

2.2.3.1 Zellzählung

10µl der Zellsuspension werden mit 10µl Trypan-Blau vermischt. Von diesem Gemisch werden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Anzahl der Zellen in den vier großen 16er Quadraten wird ausgezählt, der Mittelwert errechnet und der Wert mit 10^4 multipliziert für die Zellanzahl pro ml Ausgangsmaterial. Das Ergebnis wird mit 2 multipliziert um den Verdünnungsfaktor durch die 1:1-Mischung mit Trypan-Blau einzuberechnen.

Das Ergebnis gibt die Zellanzahl im vorhandenen Milliliter konzentrierter Milchzellen an und wird zur weiteren Bearbeitung benötigt.

Die Vitalität der Zellen wird mittels des Trypan-Blau bei der Zellzählung in der Neubauer--Zählkammer identifiziert. Vitale Zellen nehmen den Blauton nicht auf, während defekte und tote Zellen unter dem Mikroskop sich blau gefärbt darstellen. Die Vitalität wird dann in blaue, nicht-vitale Zellen gegenüber ungefärbten, vitalen Zellen angegeben.

Die Zellanzahl im Endvolumen geteilt durch das eingesetzte Anfangsvolumen nativer Muttermilch gibt die tatsächliche Zellzahl pro Milliliter nativer Muttermilch an.

2.2.3.2 *Einstellung der Zellzahl*

Bei einer gezählten Zellmenge von über 1,5 Millionen Zellen pro Milliliter wurde die Zellsuspension im Verhältnis mit PBS verdünnt um eine konstante Zellmenge von 1,5 Millionen pro Milliliter zu erhalten.

Sollte die Zellmenge unter 1,5 Millionen pro Milliliter liegen, wurde die vorhandene Suspension unverdünnt weiter verwendet.

2.2.3.3 *Aufteilung der Zellsuspension*

Die auf 1,5 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellte Zellsuspension wird für weitere Analysen nach folgendem Schema aufgeteilt:

- 1 ml Zellsuspension für die FACS-Analyse
- 200µl Zellsuspension für die DNA-Extraktion im QiaCube zur PCR-Analyse
- 100 – 300µl Zellsuspension für die Kurzzeit-Viruskultur
- 100 – 300µl Zellsuspension für die Langzeit-Viruskultur
- 400 – 800µl Zellsuspension zur Cytospinpräparation und Färbung der Zellen

2.2.4 *Cytospinpräparation*

Zur Vorbereitung wurden Objektträger beschriftet mit Name der Spenderin, Datum und nachfolgender Färbemethode. Diese Objektträger wurden in die für den Cytospin passenden Metall-Clips gelegt und mit einem Einmal-Filter bedeckt. Darauf wurden die Zytologie-

Trichter/ Zytofunnel geschoben und mit dem Haltebügel der Metall-Clips fixiert. Zur Überprüfung der genauen Lage aller Komponenten müssen im angebrachten Kontrollfenster des Clips alle Komponenten in einer Reihe liegen.

Die Gestelle wurden nachfolgend im Rotor des Shandon Cytospin 3 gleichmäßig positioniert und je 100µl der isolierten und auf 1,5 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellten Brustmilchzellsuspension in die Zytologie-Trichter/ Zytofunnel gefüllt.

Die Rotorabdeckung wurde geschlossen und das Gerät auf 28g (550 Umdrehungen pro Minute) für 5 Minuten bei Raumtemperatur eingestellt. Eine sanfte Be- und Entschleunigung zu Beginn und am Ende der Zentrifugation wurde gewählt, um die Zellen möglichst schonend auf die Objektträger zu verlagern.

Nach Ablauf des Programms wurden die Gestelle vorsichtig entfernt und die Objektträger bei Raumtemperatur an der Luft für mindestens 1h getrocknet.

2.2.5 Färbung der Zellen

2.2.5.1 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die Giemsa-Stammlösung sowie die May-Grünwald-Lösung wurden vor der Färbung mittels Rotilabo-Faltenfilter (Typ 113P, Fa. Carl Roth) filtriert.

Die Cytospots der Objektträger wurden vorsichtig mit einem Fettstift (Super PAP Pen Liquid Blocker, Science Services) umkreist und anschließend für 3 Minuten mit je 200µl May-Grünwald-Lösung überschichtet.

Nach Ablauf der 3 Minuten wurde die gleiche Menge Aqua dest. pro Objektträger hinzugegeben und für eine weitere Minute belassen.

Daraufhin wurden die Objektträger vorsichtig mit Aqua dest. abgespült und falls nötig die Fettstiftumrandung erneuert.

Nachfolgend wurden je 300µl verdünnte Giemsa-Lösung (0,3 ml Giemsa-Stammlösung in 10ml Aqua dest.) auf die Cytospots gegeben und für durchschnittlich 17 Minuten bei Raumtemperatur belassen (mindestens 15 Minuten bis maximal 20 Minuten).

Anschließend wurden die Objektträger mit Aqua dest. abgespült und bei Raumtemperatur an Luft getrocknet.

Die Objektträger wurden mikroskopiert (Olympus BX51 TF), fotografiert (Olympus DP71) und bei Bedarf mit einem Tropfen Kaisers Glycerin-Gelatine und Deckglas eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5.2 Alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung

Zur spezifischen Färbung der Monozyten und damit zur qualitativen und quantitativen Erfassung von monozytären Zellen und Abgrenzung gegenüber anderen Lymphocyten oder Epithelzellen, dient das Verfahren der Alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung. Hierzu wurde ein vorgefertigtes Kit von SIGMA-Aldrich verwendet (91A-1KT) und das Verfahren orientierend an den Herstellerangaben wie folgt durchgeführt:

1. Vor Beginn wurden die benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt. 40ml Aqua dest. wurden vor Verwendung auf 37°C vorgewärmt.
2. 1ml Natriumnitrit-Lösung (0,1 mol/l; Sigma Aldrich) wurde zu 1ml Fast Blue BB Standardlösung (15mg/ml, in 0,4 mol/l Salzsäure; Sigma-Aldrich) in einem Falcon-Röhrchen hinzugegeben und durch Inversion gemischt. Das Gemisch wurde anschließend für mindestens 2 Minuten stehen gelassen. Dabei veränderte sich die Farbe der Lösung von schmutzig braun zu einem dunklen Gelb.
3. Die Lösung aus Schritt 2 wurde zu 40ml erwärmtem, entionisierten Wasser hinzugefügt.
4. Dazu wurden noch 5ml TRIZMAL 7,6 Pufferkonzentrat (1 mol/l, pH 7,6 +/- 0,15; Sigma Aldrich) sowie 1ml alpha-Naphthyl-Azetat-Lösung (12,5 mg/ml in Methanol-Lösung; Sigma-Aldrich) hinzugegeben, wobei sich die Farbe grünlich färbt. Die Lösung wurde gut gemischt und in eine Küvette gefüllt.
5. Zur Fixierung der Objektträger wurde eine Zitrat-Azeton-Formaldehyd-Lösung aus 25ml Zitrat-Lösung (Zitronensäure 18mmol/l, Natriumzitrat 9mmol/l, Natriumchlorid 12mmol/l und Surfactant, pH 3,6 +/- 0,1; Sigma Aldrich), 65ml Azeton (BioFroxx) und 8ml 37% Formaldehyd (AppliChem) erstellt.
6. Die Fixierlösung wurde in eine Küvette gegeben und die getrockneten Cytospin-Objektträger wurden für 30 Sekunden hineingetaucht, wobei sie während der letzten 5 Sekunden heftig bewegt wurden.
7. Die Fixierlösung wurde für weitere Durchführungen aufbewahrt und die Objektträger wurden unter fließendem entionisierten Wasser ungefähr eine Minute gründlich gespült.

8. Ohne die Objektträger trocknen zu lassen wurden sie in die Lösung aus Schritt 4 gestellt und bei 37°C Licht geschützt für 30 Minuten inkubiert (Herstellerangaben 15 Minuten).
9. Nach diesen 30 Minuten wurden die Objektträger entfernt und 2 Minuten gründlich in entionisiertem Wasser gespült. Die Lösung wurde verworfen.
10. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger für 2 Minuten in zuvor durch einen 0,45µm Steril-Filter filtrierten Hämatoxylin-Lösung (Gill Nr.3, Hämatoxylin 6,0g/l, Natriumiodat 0,6g/l und Aluminiumsulfat 52,8g/l; Sigma-Aldrich) gegeben.
11. Das Hämatoxylin wurde für weitere Färbungen aufbewahrt und die Objektträger unter Leitungswasser gut abgespült und danach bei Raumtemperatur an Luft getrocknet.
12. Die Objektträger wurden mikroskopiert (Olympus BX51 TF), fotografiert (Olympus DP71) und bei Bedarf mit einem Tropfen Kaisers Glycerin-Gelatine und Deckglas eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.6 Viraler DNA-Nachweis

2.2.6.1 DNA-Extraktion mittels QIAcube

Die virale DNA-Extraktion aus zellfreier Molke wurde nach Herstellerangaben mittels QIAamp Blut Mini Kit und dem Qiacube DNA Extraktor (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Das erzeugte Endvolumen betrug 100 µl.

2.2.6.2 Amplifikation der viralen DNA mittels Thermocycler – nested PCR (nPCR)

Für die nested PCR (nPCR) wurden zwei Mastermix erstellt, deren Zusammensetzung in Tabelle 11 und 12 dargestellt sind. Mastermix 1 wurde jeweils mehrfach mit IEP4 D und IEP4 D* angelegt. Ebenso Maternix 2 mit IEP4 A und IEP4 A* .

Tabelle 11: Mastermix 1 zur Durchführung der nested PCR, erster Durchgang.

| | Konzentration | Menge [µl] pro Mastermix 1 |
|--|---------------|----------------------------|
| IEP4 C [100 pmol/µl] | 0.1 µM | 0.05 |
| IEP4 D / D* [100 pmol/µl] | 0.1 µM | 0.05 |
| Tween20 | 1 % | 0.5 |
| PCR-Puffer [10x, 100 mM Tris-CL pH 9.6, 500 mM KCL] | 1x | 5 |

| | | |
|---------------------------|--------|------|
| MgCl ₂ [25 mM] | 2.5 mM | 5 |
| dNTP [25 mM each] | 100 µM | 0.2 |
| H ₂ O | | 29.2 |

Tabelle 12: Mastermix 2 zur Durchführung der nested PCR, zweiter Durchgang.

| | Konzentration | Menge [µl] pro Mastermix 2 |
|---|---------------|----------------------------|
| IEP4 A / A* [100 pmol/µl] | 0.4 µM | 0.2 |
| IEP4 B [100 pmol/µl] | 0.4 µM | 0.2 |
| 10x PCR buffer [100 mM Tris-CL pH 9.6, 500 mM KCL] | 1x | 5 |
| MgCl ₂ [25 mM] | 2.5 mM | 5 |
| dNTP [25 mM, each] | 200 µM | 0.4 |
| H ₂ O | | 28.2 |

Im ersten Durchgang wurden 45µl von Mastermix 1, 1,3µl Taq-Polymerase sowie 5µl der extrahierten HCMV-DNA aus 2.2.6.1 in einem 500µl Reaktionsgefäß gemischt und die Polymerasekettenreaktion (PCR) nach in Tabelle 13 dargestelltem Schema durchgeführt. Ebenso wurde für den modifizierten Mastermix 1* (IEP4 D*) verfahren. Der angeschlossene zweite Durchgang folgte mit einer Mischung aus 44µl Mastermix 2/2*, 1,3µl Taq-Polymerase sowie 5µl der am Ende von Durchgang 1 gewonnenen Lösung. Zum Nachweis amplifizierter HCMV-DNA erfolgte die Gelelektrophorese.

Tabelle 13: Ablauf der Polymerasekettenreaktion (PCR).

| Ablauf | Temperatur | Zeit | Durchgang 1 | Durchgang 2 |
|----------------------------|------------|--------|-------------|-------------|
| Initiale Denaturierung | 93°C | 5 min | | ----- |
| Denaturierung | 91°C | 30 sek | 20x | 30x |
| Primerhybridisierung | 56°C | 1 min | 20x | 30x |
| Elongation | 72°C | 1 min | 20x | 30x |
| Abschließende Verlängerung | 72°C | 10 min | | |

2.2.6.3 Agarosegelelektrophorese zum viralen DNA-Nachweis

Die Agarosegelelektrophorese wurde zum Nachweis von der in 2.2.6.2 amplifizierten HCMV-DNA verwendet. Mittels 1,5g SeaKemLE Agarose (Lonza Group AG, Basel, Switzerland), welche in 50ml TBE-Puffer (10fach, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) unter Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst wurde, wurde ein 3% Agarosegel hergestellt. Dem Gel wurden 1,5µl Midorigrün Advance DNA Färbelösung hinzugegeben und das Gemisch in eine acht oder 15 Spalten Gelkammer gefüllt. Nach mindestens 30minütiger Kühlung bei

Raumtemperatur wurde es in eine horizontale Gelelektrophoresekammer (Mini-SUB Cell GT, BioRad) gestellt. 10ml der amplifizierten DNA wurden mit 2µl Ladefarblösung gemischt und je einer Spalte zugegeben. Zur Fragmentgrößenabschätzung wurde ein 123 Basenpaar-langes Kontroll-DNA Segment („Basenpaarleiter“, Sigma Aldrich) vierfach verdünnt und 10µl mit 2µl Ladefarblösung vermischt und zu jeder Messung in einer Spur mituntersucht. Dem Gel wurden für 45 Minuten 400mA sowie 100 Volt Strom angelegt. Die Dokumentation erfolgte durch ChemiDoc XRS+ (BioRad) und wurde mit der dazugehörigen Bildsoftware ausgewertet (Image Lab software, BioRad).

2.2.6.4 Viruskultur und Virusisolierung

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden in 75cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂-Anteil kultiviert. Bei konfluenter Bewachsung des Flaschenbodens mit 80-90% Zelldichte wurden neue Flaschen im Verhältnis 1 zu 2 beimpft. Hierzu erfolgten die Aspiration des überstehenden Mediums und ein einmaliger Waschgang der Zellen mit PBS-Lösung, welcher 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung hinzugegeben wurde (Pen/Strep, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Zur Lösung des adhärenen Zellrasens wurden 3ml Trypsin der Flasche hinzugefügt und die Flasche bei 37°C und 5% CO₂-Anteil für 5-8 Minuten inkubiert, um eine Lösung der Zellen vom Untergrund sowie voneinander zu erzielen. Anschließend wurden die Zellen in 9 ml Medium (DMEM gemischt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung) resuspendiert und gleichmäßig auf zwei neue 75cm² Zellkulturflaschen verteilt. Diese wurden abschließend bis zu einem Gesamtvolumen von 12ml mit Medium oben genannter Mischung aufgefüllt. Ein Medium-Wechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Zur Virusisolierung wurden zwei 96-well-Mikrotiterplatten mit je 2×10^4 humanen Vorhautfibroblasten (HFF) in einem Volumen von 100µl pro Well übertragen. Nach einem Tag wurde der Überstand abgesaugt und die Platten beimpft.

Dazu wurden je 1ml der steril filtrierte Molke (siehe 2.2.1) bei 50.000g für eine Stunde bei 4°C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Der Überstand wurde abgossen und das entstandene Pellet in 400µl DMEM mit 5% FCS-Anteil resuspendiert. Davon wurden je 100µl zur Beimpfung eines Wells der Mikrotiterplatte übertragen. Die Mikrotiterplatten wurden für 30 Minuten bei 200g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend für weitere 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-

Anteil inkubiert. Nach Zusatz von 100µl DMEM mit 5% FCS-Anteil pro Well wurden beide Mikrotiterplatte im Brutschrank aufbewahrt.

2.2.6.5 Kurzzeitkultur

36 Stunden nach Beimpfen der Mikrotiterplatte im Brutschrank erfolgte die HCMV-spezifische Färbung zum Nachweis von immediate-early-Antigenen (IEA) in den Fibroblastenkernen (HFF) nach dem Färbeprotokoll der AG Hamprecht des Instituts für medizinische Virologie und Mikrobiologie Tübingen. Dazu wurden jedem Well 100µl eines Gemisches aus 50µl Ethanol und 50µl Aceton hinzugefügt und die Zellen damit für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 200µl TBS Waschpuffer (TBS mit 0,2% Tween20) gewaschen und für 20 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 100µl pro Well der HCMV IE1 Antikörper-Lösung (500fache Verdünnung des HCMV IE1 Antikörpers (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) in PBS mit 0,5% FCS) hinzugefügt und für eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschgang der Zellen mit je 200µl TBS Waschpuffer. Anschließend wurde jedem Well 100µl einer Anti-Maus Kaninchenantikörpers-Lösung (500fache Verdünnung des Polyklonalen Kaninchen Anti-Maus IgG-Antikörpers HRP (P026002, DakoCytomation) in PBS mit 0,5% FCS) hinzugefügt und für eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Es erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschgang mit PBS Waschpuffer. Eine AEC-Lösung wurde mittels 0,4% AEC-Stammlösung in DMF und 20facher Verdünnung in Natriumacetat-Puffer und 0,1% H₂O₂-Lösung hergestellt. 100µl dieser Lösung wurden jedem Well hinzugefügt und für 20 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Abschließend erfolgte ein waschen der Zellen mit 200µl TBS gefolgt von einem Waschgang mit 200ml PBS.

Die Mikrotiterplatten wurden daraufhin mikroskopisch untersucht. Eine bräunliche Verfärbung von meist bohnenförmigen Zellkernen der Fibroblasten (HFF) wurde als Nachweis von IE1 exprimierenden, infizierten Zellen gewertet.

2.2.6.6 Langzeitkultur

Die Mikrotiterplatte zur Langzeitkultur wurde alle 2 Tage mikroskopisch auf HCMV-spezifische Zellveränderungen überprüft. Das Medium wurde nach einer Woche einmalig gewechselt. Bei Nachweis eines HCMV-spezifischen zytopathischen Effekts galt die Probe als positiv, da es das Ergebnis der Kurzzeitkultur und PCR bestätigt.

2.2.6.7 Testungen

Die ersten Testungen zum Virusnachweis wurden selbstständig durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt, die fortlaufenden Testungen erfolgten im Rahmen der Routine-Diagnostik der AG Hamprecht des Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen.

2.2.7 Durchflusszytometrische-Analyse (FACS)

2.2.7.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie stellt zur Analyse hoher Zellzahlen mittels Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität eine validierte und häufig verwendete Methode dar. Dabei werden Zellen in Suspension anhand ihrer physikalischen Eigenschaften wie Zellgröße und Granularität sowie ihrer Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe tragende Antikörper detektiert. Die Zellgröße wird mittels den von den Zellen in Vorwärtsrichtung gestreutem Licht (FSC; forward light scatter) und die Zelldichte und Granularität mittels im rechten Winkel gestreutem Licht (SSC; side scatter) unterschieden. Die Lichtquellen des Durchflusszytometers regen die verwendeten Antikörper-konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe an und führen zur Detektion der Fluoreszenzintensität in proportionaler Abhängigkeit zur Anzahl der gebundenen Antigene.

Wir verwendeten, in Zusammenarbeit mit und unter Anleitung von Dr. Kilian Wistuba-Hamprecht aus der Arbeitsgruppe Graham Pawelec der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen, das Durchflusszytometer LSRII (Firma BD Biosciences).

2.2.7.2 Auswahl des Antikörper-Panels

Zur Untersuchung der Hauptleukozytenpopulationen mittels CD45 wurden weitere Antikörper zur Detektion von Monozyten/Makrophagen (CD14), T- (CD3) sowie B-Zellen (CD19), Granulozyten (CD66b) und NK-Zellen (CD56) gewählt. In Kombination untereinander, zum Beispiel durch CD3 und CD56 für NK-like Zellen, oder mit CD16 konnten Koexpressionen dargestellt werden. HLA-DR sollte die Antigenexpression einzelner Leukozytensubpopulationen aufzeigen.

Mit CD326, als einziger Marker für eine nicht-immunologische Zellpopulation, sollten Epithelzellen/Laktozyten identifiziert werden.

Alle gewählten Antikörper wurden mittels mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) initial titriert. Dazu wurden die Antikörperkonzentration laut Hersteller sowie vier Verdünnungsschritte (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) auf PBMCs gemessen und die Konzentration mit der

besten Trennung von positiver und negativer Population in der durchflusszytometrischen Untersuchung verwendet.

Tabelle 14: Antikörper-Panel, Fluoreszenzfarbstoffe und eingesetzte Menge pro Probe

| Antikörper | Fluoreszenzfarbstoff | µl/Probe |
|---------------|----------------------|------------|
| CD45 | BV510 | 1 |
| CD14 | PE-Cy7 | 2,5 |
| CD3 | APC | 2,5 |
| CD19 | BV605 | 0,5 |
| CD56 | APC/Fire™ 750 | 2 |
| CD66b | FITC | 3 |
| CD16 | Pacific blue | 0,5 |
| HLA-DR | PerCPy5.5 | 10 |
| CD326 | PE | 5 |
| EMA | | 1 |

Um zur späteren Analyse klare positive sowie negative Populationen festzulegen wurde im ausgewählten Panel Fluoreszenzkontrollen durchgeführt, in welcher je eine der oben genannten Fluoreszenzen exkludiert wurde (Fluorescent minus one (FMO)).

2.2.7.3 Färbung der Proben

Nach umpuffern der gewonnenen Zellen aus 2.2.3.3 in FACS-Puffer (PFEA) wurde die jeweilige Muttermilchprobe zu 80% auf eine zu färbende Probe (S) und zu 20% eine Probe, welche nicht gefärbt wurde (N), in FACS-Röhrchen (BD Falcon 5ml, BD Bioscience) aufgeteilt. Beide wurden mit PFEA-Lösung auf 1ml Gesamtmenge aufgefüllt und anschließend bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und bei beiden Proben 49µl 1% Gammunex (10% Gammunex, humane IgGs, verdünnt in PFEA) zur Blockade freier IgG-Bindungsstellen der Zellen dazugegeben. Der zu färbenden Probe (S) wurde weiterhin 1µl 1% EMA-Lösung (EthidiumMonoazidBromid, Biotium, verdünnt in PFEA) als Vitalitätsmarker dazugegeben und die Zellen resuspendiert. Nach 20 minütiger Bestrahlung unter UV-Licht bei Raumtemperatur, wodurch EMA sich kovalent an DNA von Zellen mit Membrandefekt bindet, wurde den Proben 1ml PFEA-Lösung hinzugegeben und es erfolgte eine erneute Zentrifugation nach obigen Angaben und ein anschließendes Abgießen des Überstandes. Der zu färbenden Probe (S) wurden nun der Mastermix aus oben genannten Antikörpern, welche zuvor auf Blutzellen angepasst titriert wurden (siehe 2.2.7.2), zugegeben und im Dunkeln für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Mittels 1ml PFEA-Lösung wurden die Proben gewaschen und erneut nach obigem Schema

zentrifugiert und der Überstand abgegossen und zuletzt in 150µl PFEA-Lösung resuspendiert und analysiert.

Einzel gefärbte Kompensationskontrollen wurden zu jedem Analyse-Tag gefärbt und zur Anpassung der Kompensation gemessen. Dazu wurden Kompensations-Beads und Negativkontroll-Beads (BD™ CompBeads Anti-Maus Ig, κ / Negativkontroll-Kompensationspartikel Set, BD Biosciences) mit je einem Fluoreszenz-gekoppeltem Antikörper für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 300g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach abgießen des Überstandes wurde jede Kompensationskontrolle in 100µl PFEA resuspendiert und analysiert.

2.2.7.4 *Biologische Kontrolle mit mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)*

Äquivalent zur 2.2.7.3. wurde mit den Proben von PBMCs des zu Beginn der Studie festgelegten Kontrollspenders verfahren. Die Zellen wurden initial mittels Leukapherese oder über Leukozytenfilm (buffy coat) mittels Ficoll-Gradienten Zentrifugation (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) gewonnen. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 40% fetalem Kälberserum resuspendiert. Je 500µl der Zellsuspension wurden mit 250µl RPMI-Medium mit einem 20%igen Anteil von Dimethylsulfoxid (DMSO) gemischt und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Erneut wurden 250µl einer Mischung aus RPMI-Medium und 20% DMSO hinzugefügt und die Suspension bei -80°C gefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben in einen Flüssigstickstoff-Behälter überführt und bis zum Gebrauch gelagert.

An jedem Tag einer durchflusszytometrischen Messung von isolierten Muttermilchzellen wurde eine Probe der PBMCs des gleichen Spenders in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Auffüllen der Proben mit RPMI-Medium bis 1ml Gesamtmenge wurden die Proben bei 300g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 10ml RPMI-Medium resuspendiert. Daraus wurde eine Zellzählung in der Neubauerzählkammer durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 300g für 5 Minuten wurde RPMI-Medium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml hinzugefügt und analysiert.

2.2.7.5 *Analyse der FACS-Daten*

Tabelle 15: Laser und Filter Einstellungen des verwendeten Durchflußzytometers LSRII (Firma BD Biosciences)

| Fluorochrome | Laser | Detektor | Interferenzfilter | Bandbreitenfilter |
|--------------|--------------|----------|-------------------|-------------------|
| PE-Cy7 | Blauer Laser | A | 735 | 780/60 |
| PerCP-Cy5.5 | | B | 685 | 695/40 |

| | | | | |
|------------------------|--------------------------|---|-----|--------|
| EMA | (488 nm) | D | 600 | 610/20 |
| PE | | E | 550 | 575/25 |
| FITC | | F | 505 | 530/30 |
| SSC | | G | - | 488/10 |
| BV421 | Violetter Laser (405 nm) | E | - | 450/50 |
| BV510 | | D | 545 | 561/14 |
| PO | | | | |
| BV605 | | C | 600 | 610/20 |
| BV711 | | A | 685 | 700/13 |
| APC-H7 | Roter Laser (633 nm) | A | 735 | 780/60 |
| Alexa Fluor 700 | | B | 710 | 730/45 |
| APC | | C | - | 660/20 |

Die Durchflussrate betrug um die 5000 Ereignisse pro Sekunde. Die Kompensation der spektralen Abdeckung jedes Kanals wurde an jedem Messtag mittels BD FACSDivaTM durchgeführt. Dabei wurde sichergestellt, dass die Kompensation zwischen einzelnen Kanälen nicht über 20% lag.

Die Analyse der ermittelten Rohdaten erfolgte mittels der FlowJo-Analysesoftware (Version 10.6.1).

Zur Minimierung von Schwankungen in der Analyse der Zellen durch tagesabhängige Schwankungen des Durchflusszytometers oder der Färbung der Zellen wurden an jedem Messtag die biologische Kontrolle (2.2.7.4) nach der gleichen Gating-Strategie wie die isolierten Brustmilchzellen analysiert und die Begrenzung der Subpopulationen entsprechend angepasst.

2.2.7.6 T-SNE-Analyse

Zur Visualisierung der durchflusszytometrischen Daten im Hinblick auf Ähnlichkeiten und Unterschiede der Expression der detektierten Antikörper auf Muttermilchzellen wurde die t-SNE-Analyse (t-distributed stochastic neighbor embedding) verwendet. Diese Analyse trägt dazu bei komplexe Daten mittels eines Algorithmus zweidimensional vereinfacht darzustellen und so visuell die Größe von Leukozytensubpopulationen und ihre Nähe, beziehungsweise Entfernung, zueinander anhand ihrer Antikörperexpression in unterschiedlichen Muttermilchproben vergleichen zu können.

Um bei der Analyse einen gleichmäßigen Anteil der Proben zueinander zu gewährleisten, wurden vor der tSNE-Analyse die einzelnen Proben mittels FlowJo-Analysesoftware auf 3500 Zellen pro Probe im gleichen Verhältnis zueinander reduziert (down-sampling).

2.2.8 ImageStream-Analyse

2.2.8.1 Allgemein

Das ImageStream-Verfahren ermöglichte die Kombination aus der mikroskopischen Darstellung und morphologischen Unterscheidung der zu untersuchenden Milchzellen mit der auf Fluoreszenzintensität basierenden Analyse hoher Zellzahlen der Durchflusszytometrie. Dies ermöglichte nach Auswertung eine objektive sowie statistische Methode zur Charakterisierung der humanen Milchleukozyten.

Die Durchführung erfolgte unter initialer Anleitung von Simone Pöschel in der „Imaging Flow Cytometry Core Facility“ der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Leitung von PD Dr. Stella Autenrieth. Das verwendete Gerät war das Amnis ImageStream®^X Mark II. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der IDEAS® image analysis software. (Beides von der Luminex Corporation, Austin Texas, Vereinigte Staaten von Amerika)

2.2.8.2 Färbung der Proben

Die Probenfärbung erfolgte analog zur Färbung für die Durchflusszytometrische-Analyse beschrieben in 2.2.7.3.

2.2.9 Datenauswertung

Zur Auswertung aller erhobenen Daten sowie deren Darstellung wurden Programme aus Microsoft Office Version 10 sowie JMP (SAS Institute GmbH) und GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) verwendet. Unterschiede in Proben HCMV-seropositiver und -negativer Spenderinnen wurde mittels Mann-Whitney U Test analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Signifikanz der Werte bei einem p-Wert unter 0,05 angenommen ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Fraktionierung der Muttermilch und Virusnachweis mittels real-time PCR und Viruskultur

In Anlehnung an die Aufarbeitungsprotokolle früherer Studien der HCMV-Arbeitsgruppe des Instituts für medizinische Virologie der Universität Tübingen wurde ein Protokoll zur optimalen Aufarbeitung der zu untersuchenden Muttermilchzellen etabliert. Dabei führten wir mehrere Testreihen durch, in welchen das Zellsuspensions-Mischverhältnis, die Zentrifugationsdauer sowie die Umdrehungszahl pro Minute der Zentrifugation variiert wurden. Endpunkte stellten jeweils die Vitalität der verbleibenden Zellen sowie die Zellzahl pro Milliliter dar, welche wie in 2.2.3.1 beschrieben, festgelegt wurde. Die durchschnittliche Vitalität lag bei 98% vitaler Zellen pro Probe, wobei Proben mit einer Vitalität unter 95% nicht weiterverarbeitet wurden. Nach erfolgreichen Testungen wurde das Protokoll, wie in 2.1 beschrieben, als Grundlage für alle weiteren Bearbeitungen sowie statistischen Auswertungen der Milchzellen festgelegt.

Jede Probe wurde durch zwei unterschiedliche Verfahren auf das Vorliegen von humanem Cytomegalievirus getestet. Durch Nachweis von virusspezifischer DNA und dem Nachweis von infektiösem Virus selbst. Der Nachweis von Virus-DNA erfolgte mit Hilfe der nested PCR und quantitativer real-time PCR. Nach Aufbereitung der Proben wurde die virale DNA extrahiert, mittels nPCR amplifiziert und per Gelelektrophorese nachgewiesen, beziehungsweise im real-time PCR-Verfahren quantifiziert.

Durch Testung jeder Probe konnten wir zeigen, dass in 24 der 28 Muttermilchproben von 10 HCMV seropositiven Spenderinnen Virus-DNA mittels PCR und infektiöses Virus mittels Kultur von Molke nachweisbar war. In insgesamt 4 Proben bei 3 HCMV-seropositiven Spenderinnen am 6., 12., 13. und 22. Tag post partum konnte keine virale DNA in Molke oder Zellen sowie in Kultur nachgewiesen werden. Damit zeigte jede Muttermilchprobe im zweiten Laktationszeitraum (ab 30. Tag post partum) einen positiven HCMV-DNA Nachweis (Tabelle 16). Hingegen konnte in keiner von 21 Muttermilchproben der 10 HCMV-seronegativen Spenderinnen Virus-DNA nachgewiesen werden.

Während in Muttermilchproben mancher HCMV-seropositiver Spenderinnen schon am 10. Tag post partum (Mutter 13), am 14. Tag post partum (Mutter 17) oder am 17. Tag post partum (Mutter 3) HCMV-DNA mittels PCR nachweisbar war und auch in nachfolgenden Proben der gleichen Spenderin weiterhin detektiert werden konnte, zeigte eine HCMV-seropositive Spenderin (Mutter 10) in Proben vom 13. und 22. Tag post partum kein HCMV

Nachweis und erst in der Probe vom 42. Tag post partum und folgend eine positive PCR auf HCMV-DNA in Molke. Der späteste HCMV-Nachweis gelang bei einer Spenderin (Mutter 4) bis zum 131. Tag post partum.

Zum Nachweis HCMV infizierter Zellen wurde eine Zellkultur mit humanen Vorhautfibroblasten jeder Muttermilchzell-Probe, nach Aufarbeitung wie in 2.2.1 beschrieben, angelegt. Diese wurde in regelmäßigen Abständen bis 14 Tage, nach Inokulation von isolierten Muttermilchzellen, mikroskopisch auf HCMV-spezifische Zellveränderungen überprüft. Die dabei festgelegten Kriterien waren Vergrößerung der Kulturzellen, Veränderung des Zellkerns sowie Verformung entgegen des restlichen Zellrasens. Keine der 21 Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen lieferte einen positiven Nachweis. In 5 Proben von 3 HCMV-seropositiven Spenderinnen konnte nach Beimpfung von Kulturplatten mit isolierten Muttermilchzellen dieser Spenderinnen HCMV-spezifische Zellveränderungen beobachtet werden. Dies gelang bei einer Spenderin konsekutiv am 57., 73. und 131. Tag post partum, bei den anderen Spenderinnen am 29. sowie am 48. Tag post partum (Tabelle 16).

Tabelle 16: HCMV-PCR und -Kultur Ergebnisse der Muttermilchproben.

| Laktationszeitraum | Anzahl Proben | HCMV-nPCR (Molke) | HCMV –Kultur (Molke/Zellen) |
|--|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Zeitraum 1 (1.-29. Tag p.p.) | 6 Proben - HCMV-seronegativ | 0 | 0/0 |
| | 12 Proben - HCMV-seropositiv | 8 | 8/1 |
| Zeitraum 2 (30.-131. Tag p.p.) | 15 Proben - HCMV-seronegativ | 0 | 0/0 |
| | 16 Proben - HCMV-seropositiv | 16 | 16/4 |

3.2 Mikroskopische Darstellung und Charakterisierung der Muttermilchzellen

Zum besseren Verständnis des zellulären Kompartiments der Muttermilch betrachteten wir im Folgenden die mikroskopische Zusammensetzung aller 49 Muttermilchproben nach Zellzählung durch zwei Färbemethoden.

Die Panoptische Färbung nach Pappenheim half verschiedene Leukozyten-Subpopulationen anhand der Zellmorphologie und Färbecharakteristika zu identifizieren. Begleitend dazu ermöglichte die alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung spezifisch die Analyse von Monozyten und Makrophagen. Beide Färbemethoden wurden separat von jeder Probe angelegt. Die Zellzählung soll Aufschlüsse über die Zellmenge und ihre Veränderung im Laufe der Laktation, auch im Hinblick auf den HCMV-serostatus der Spenderin, geben.

3.2.1 Zellzahlkinetik abhängig vom Serostatus der Spenderin

Jeder Probe wurde nach Aufarbeitung 100µl entnommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die extrahierte Zellzahl pro Probe variierte zwischen $9,3 \times 10^3$ und $4,6 \times 10^5$ pro Milliliter nativer Muttermilch. Dabei zeigten sich nicht nur interindividuelle Schwankungen sondern auch starke Fluktuationen intraindividuell abhängig vom Laktationszeitpunkt post partum. Unabhängig vom Laktationszeitpunkt zeigte sich diese Varianz sowohl bei HCMV seropositiven wie -negativen Spenderinnen.

Im Durchschnitt aller 33 Proben, welche auch im Verlauf zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet wurden, lag die Gesamtzellzahl von 17 Proben der HCMV-seropositiven Spenderinnen jedoch deutlich über der Zellzahl der 15 Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen. Eine Probe einer HCMV-seropositiven Mutter am 131. Tag post partum wurde mit einer Zellzahl von $4,6 \times 10^5$ aus den folgenden Abbildung auf Grund der Übersicht entfernt. Abbildung 4 zeigt die Gegenüberstellung der Zellzahl pro ml nativer Muttermilch pro Probe von HCMV-seropositiven (rot) und HCMV-seronegativen (blau) Spenderinnen in 32 Muttermilchproben.

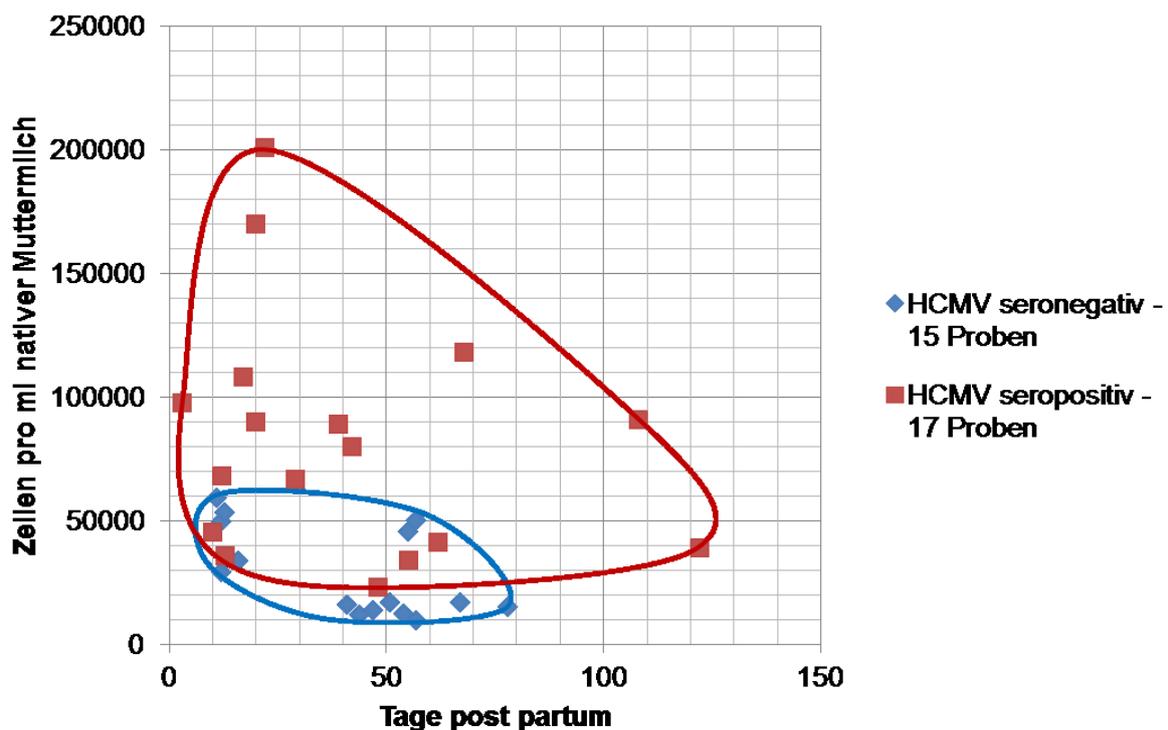


Abbildung 4: Verteilung der Muttermilchzellzahl pro Milliliter nativer Muttermilch von 32 Proben über die Dauer der Laktation. Die Abbildung zeigt mit Blau markiert alle 15 Proben von HCMV seronegativen Spenderinnen sowie mit Rot markiert alle 17 Proben der HCMV seropositiven Spenderinnen, welche ebenso zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet wurden. Die Umrandung grenzt in gleicher Farbgebung den Bereich der Werte aller Proben des jeweiligen HCMV-Serostatuses ein.

Es zeigte sich, dass die durchschnittliche Zellzahl von $7,9 \times 10^4$ Zellen pro Milliliter nativer Muttermilch im ersten Zeitraum auf $4,0 \times 10^4$ im zweiten Zeitraum abnahm. Mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests ergibt sich im Verhältnis der Zellzahl vom ersten gegenüber dem zweiten Zeitraum ein signifikanter p-Wert von 0,0025. In Bezug auf den HCMV-Serostatus der Spenderin zeigten HCMV-seropositive Spenderinnen eine durchschnittlich höhere Zellzahl im ersten Zeitraum mit $9,8 \times 10^4$ im Vergleich zu den HCMV-seronegativen Spenderinnen mit einer durchschnittlichen Zellzahl von $4,4 \times 10^4$. Im zweiten Zeitraum lag die durchschnittliche Zellzahl der HCMV-seropositiven Spenderinnen mit $6,4 \times 10^4$ anhalten über der Zellzahl der HCMV-seronegativen Spenderinnen mit $2,1 \times 10^4$ (Abbildung 5). Mittels Mann-Whitney U Test ergab sich für den ersten Zeitraum im Vergleich der Zellzahl in Proben HCMV-seropositiver und -negativer Spenderinnen auf Grund kleinerer Datenmenge ein p-Wert von 0,071 bei Überschreitung des kritischen U-wertes. Im zweiten Zeitraum ein signifikanter p-Wert von 0,005.

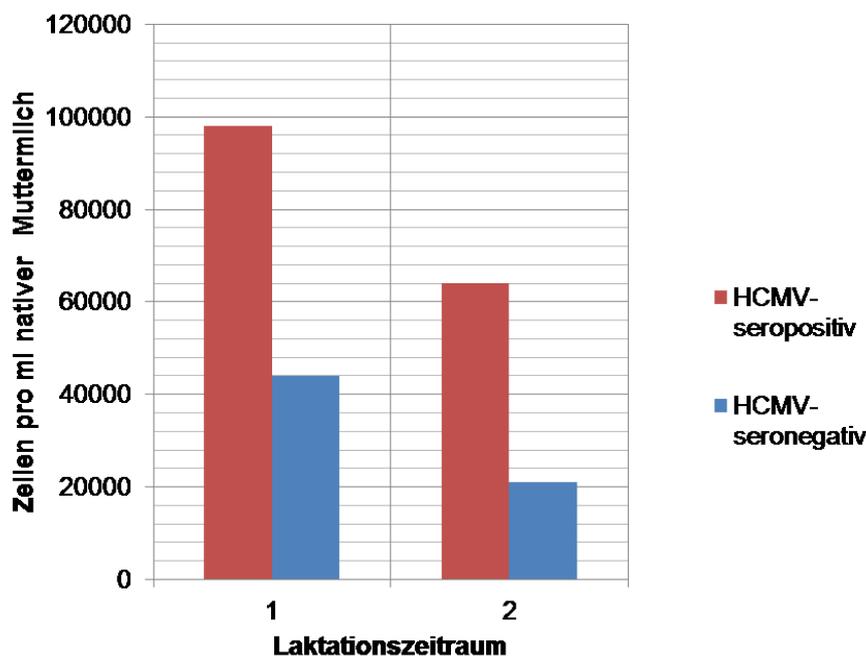


Abbildung 5: Durchschnittliche Muttermilchzellzahl pro Milliliter nativer Muttermilch in Proben HCMV-seropositiver und -negativer Spenderinnen getrennt nach Laktationszeitraum (Zeitraum 1 (1.-29. Tag post partum); Zeitraum 2 (30.-131. Tag p.p.)). Bei abnehmender Tendenz der Gesamtzellzahl während der Laktation findet sich in Muttermilchproben HCMV-seropositiver Spenderinnen eine deutlich höhere Zellzahl sowohl im ersten wie auch zweiten Zeitraum im Vergleich zu Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen.

Zur Veranschaulichung möglicher Zellzahlkinetik während der Laktation wurden zwei Spenderinnen unterschiedlichen Serostatus mit mehreren Proben gegenübergestellt (Abbildung 6). Über die Dauer der Laktation zeigen sich dabei deutliche Unterschiede im Vergleich von HCMV-seropositiven und -negativen Spenderinnen. Während in den ersten Tagen post partum die durchschnittliche Proben-Zellzahl der HCMV-seropositiven (Mutter 10) wie -negativen Spenderin (Mutter 9) auf gleich niedrigem Niveau lag, stieg die Zellzahl in den Proben der HCMV-seropositiven Mutter stark an und erreichte das Maximum um den 22.Tag post partum bei über 200.000 Zellen pro ml nativer Muttermilch. Anschließend sanken die Werte, um sich gegen den 58.Tag post partum der Zellzahl der HCMV negativen Spenderin erneut anzunähern. Die letzte erhobene Probe der HCMV seropositiven Spenderin zeigte einen starken Anstieg der Zellzahl auf etwa 120.000 Zellen pro ml nativer Muttermilch. Dieser Anstieg konnte in anderen Proben dieses Zeitraums post partum nicht gezeigt werden. Die HCMV-seropositive Spenderin (Mutter 10) zeigte zu diesem Zeitpunkt Symptome eines oberen Luftwegsinfekts.

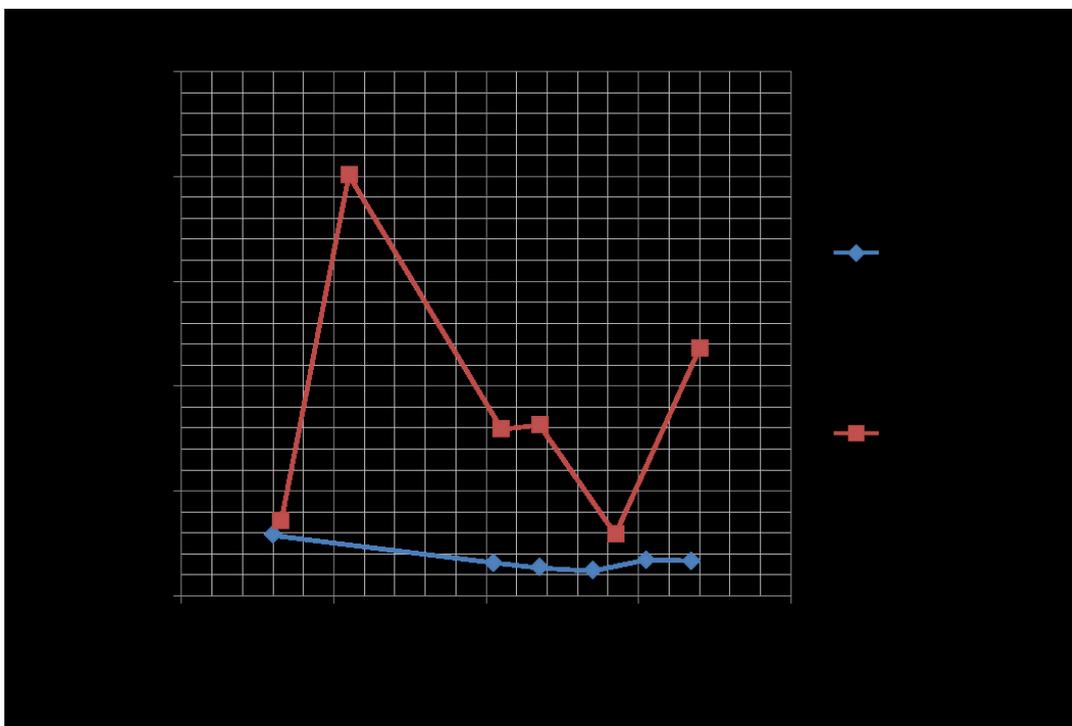


Abbildung 6: Muttermilchzellzahl pro Milliliter nativer Muttermilch von 2 Spenderinnen über die Dauer der Laktation (Tage post partum). In rot die Werte einer HCMV-seropositiven Spenderin, in blau die Werte einer HCMV-seronegativen Spenderin. Während die Zellzahl in Proben der HCMV-seronegativen Spenderin auf niedrigem Niveau tendenziell im Verlauf der Laktation abnehmen zeigen die Proben der HCMV-seropositiven Spenderin starke Schwankungen. Ähnlich der postulierten HCMV-Nachweis Kinetik in Muttermilch (Maschmann et al, 2015) zeigt die Analyse der Zellzahl einen ähnlichen Verlauf mit maximaler Zellzahl um den 22. Tag post partum, an dem auch eine maximale Virusausscheidung (DNAlaktie) gezeigt wurde.

Die Zellzahl in Proben der HCMV-seronegativen Spenderin (Mutter 9) blieben über Dauer der Laktation auf einem niedrigem Niveau und sanken von initial $2,9 \times 10^4$ Zellen pro ml nativer Muttermilch am 12. Tag post partum mit leichten Schwankungen im Verlauf auf $1,7 \times 10^4$ Zellen pro ml nativer Muttermilch am 67. Tag post partum ab.

3.2.2 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Durch die Kombination der klassischen Färbungsmethoden nach May-Grünwald und der Giemsa-Färbung erscheinen in der kombinierten Technik die Zellkerne als rötlich-lila, das Cytoplasma in einem hellen Blauton und die Granula je nach Neutrophilen-Typ. Neutrophile Granula stellen sich dabei blau-rosa, eosinophile Granula orange-braun und basophile Granula violett dar. Für jede Muttermilchprobe wurde nach Zytospinpräparation eine panoptische Färbung nach Pappenheim, wie vorhergehend beschrieben, durchgeführt. Dabei ließen sich orientierend die Verteilung der Milchzellen in Monozyten, Lymphozyten sowie Granulozyten unterteilen.

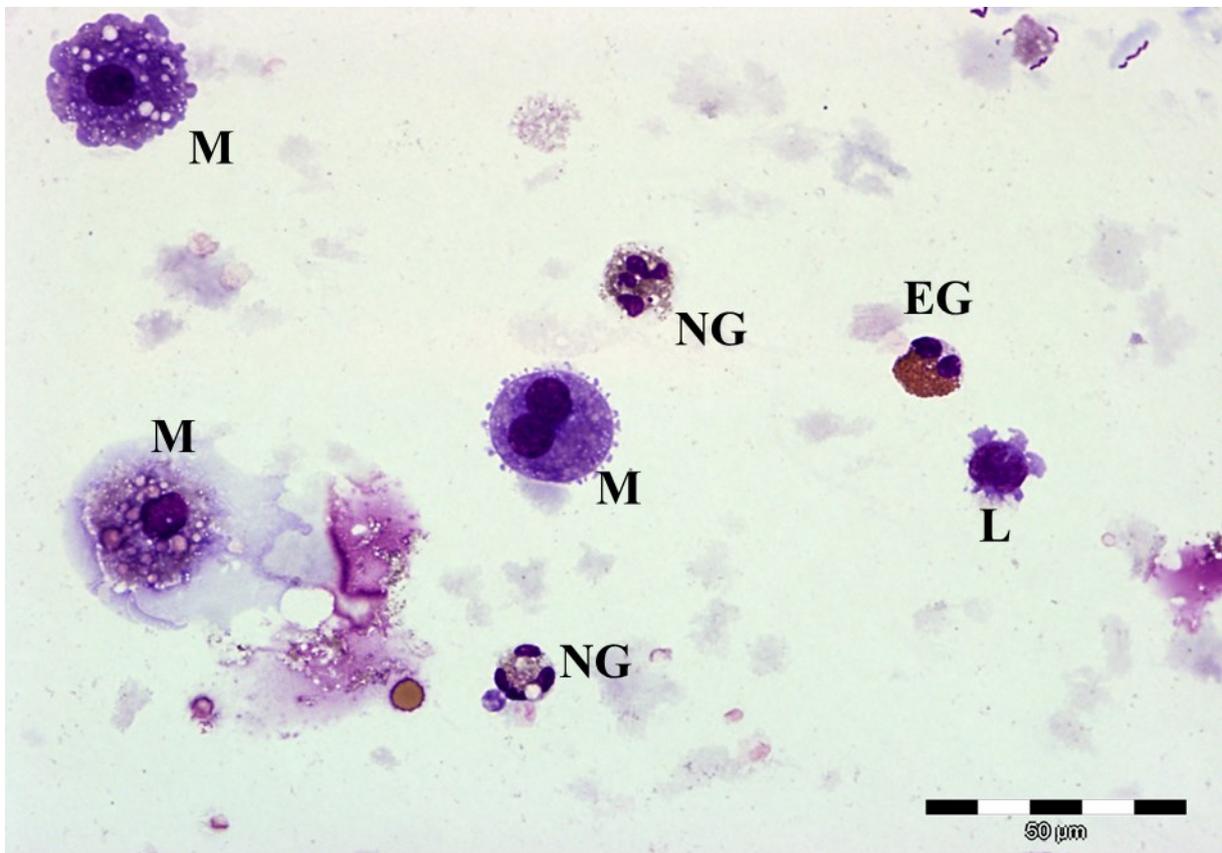


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahme von Zellen nach panoptischer Färbung nach Pappenheim einer Muttermilchprobe einer HCMV seropositiven Spenderinnen am 73. Tag post partum. 600fache Vergrößerung.

M = Monozyten/Makrophagen; NG = Neutrophile Granulozyten; EG = Eosinophile Granulozyten; L = Lymphozyten.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die detektierten Milchleukozyten in der Muttermilchprobe einer HCMV-seropositiven Spenderin am 73. Tag post partum. Die Zellzählung ergab für diese Probe 51.875 Zellen pro Milliliter nativer Muttermilch. Es konnte sowohl mittels PCR als auch durch Viruskultur in Zellen dieser Probe HCMV nachgewiesen werden.

Die konsequente Visualisierung aller 49 Proben zeigte eine rege Dynamik der Zellgruppen sowie des sie umgebenden Milieus. Bei gleichbleibender Aufbereitung schwankte der Lipidgehalt, zu erkennen an den zell-adhärenenten Lipidtropfen, deutlich (Abbildung 8, F). Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Blutzellen zeigten sich die Muttermilchzellen in Form und Aufbau verändert. Lipidhaltige Vakuolen zeigten sich in probenabhängigem Ausmaß in neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und vereinzelt in Lymphozyten (Abbildung 8). Diese waren in Anzahl und Größe HCMV-Serostatus-unabhängig variabel. Im Verlauf der Laktation zeigte sich eine deutliche Zunahme der Anzahl an lipidhaltigen Vakuolen in Muttermilchzellen, wie im Vergleich der Muttermilchzellen einer Probe vom 47. Tag post partum (Abbildung 8) und einer Probe vom 131. Tag post partum (Abbildung 9) ersichtlich.

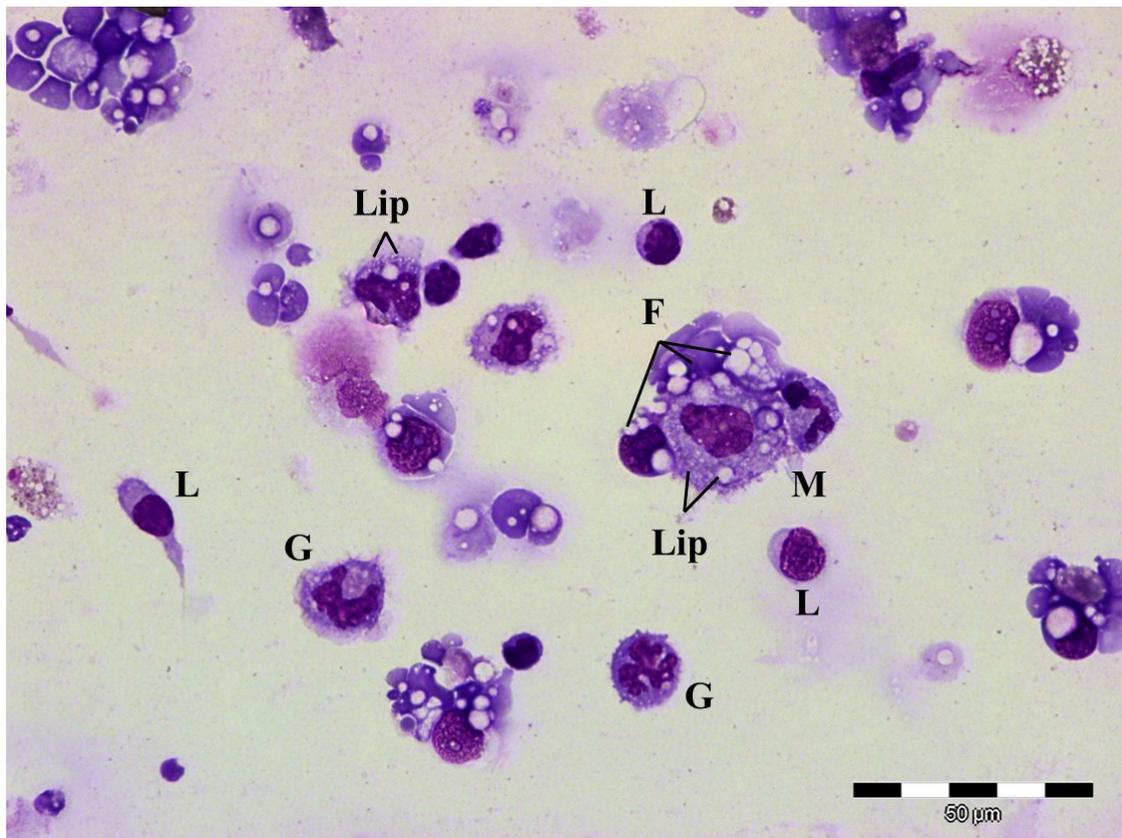


Abbildung 8: Muttermilchzellen nach panoptischer Färbung nach Pappenheim einer Muttermilchprobe am 47. Tag post partum (Spenderin HCMV-seropositiv). Das umgebende Milieu zeigt zelladhärenente Lipidtropfen (F). Das Zytoplasma der dargestellten Milchzellen enthält in unterschiedlichem Ausmaß Lipidvakuolen.

M = Monozyten/Makrophagen; G = Granulozyten; L = Lymphozyten; Lip = Lipidvakuolen.

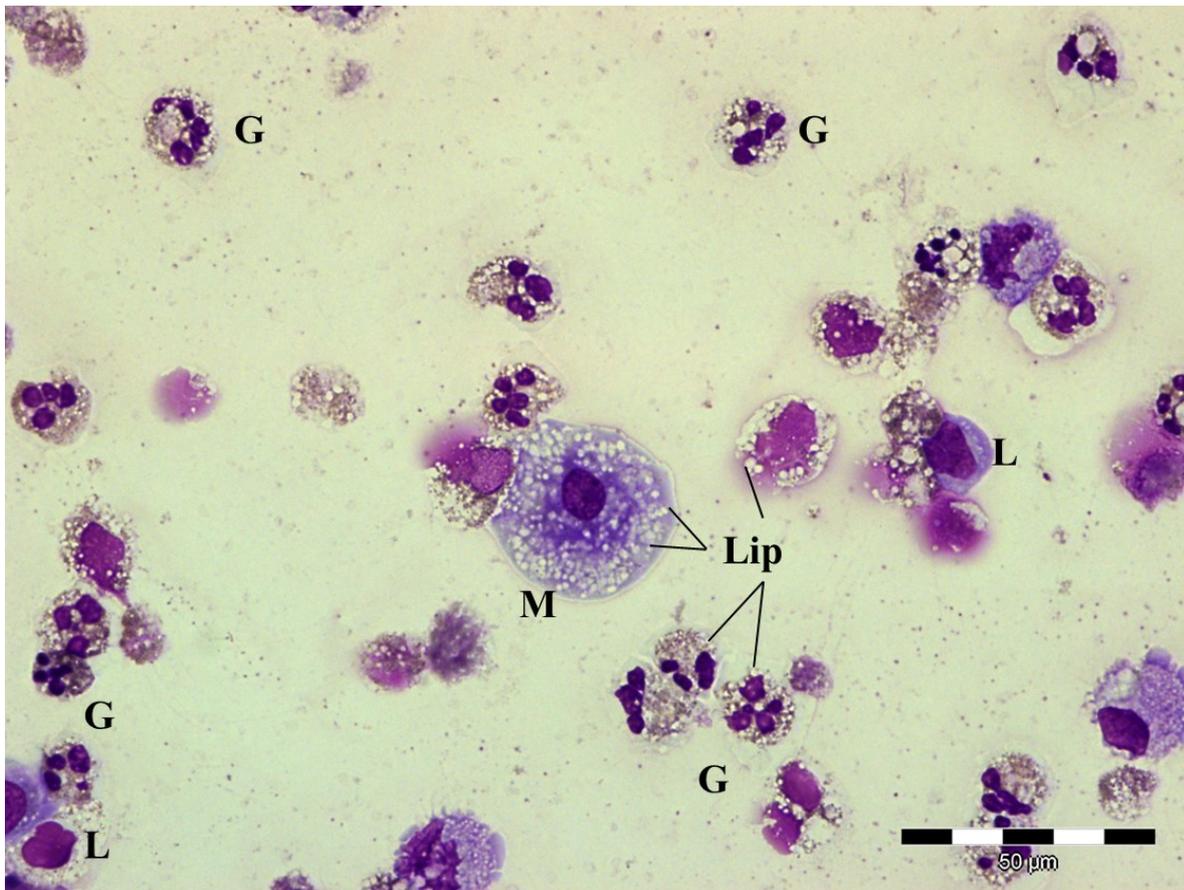


Abbildung 9: Muttermilchzellen nach panoptischer Färbung nach Pappenheim einer Muttermilchprobe am 131. Tag post partum (Spenderin HCMV-seropositiv). Das Zytoplasma der dargestellten Milchzellen enthält in unterschiedlichem Ausmaß Fettvakuolen. M = Monozyten/Makrophagen; G = Granulozyten; L = Lymphozyten; Lip = Lipidvakuolen.

Die Morphologie der Leukozytensubpopulationen zeigte starke Schwankungen.

Monozyten/Makrophagen zeigten einen variablen Zelldurchmesser zwischen 20 und 40 µm (Abbildungen 6-8). Granulozyten sowie Lymphozyten zeigten ähnliche Größen, Zell- sowie Kernmorphologien in Muttermilchproben wie die vergleichbaren Subpopulationen in Blutproben.

3.2.3 Alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung

Zur Identifizierung von Monozyten und Makrophagen wurde ergänzend eine alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung, auch als unspezifische Esterasefärbung bezeichnet, durchgeführt. An den plasmamembranständigen Esterasen von Monozyten und Makrophagen wird das alpha-Naphthylacetat enzymatisch hydrolysiert und Naphtol freigesetzt, welches mit einem Diazoniumsalz verbunden zur Ablagerung schwarzer Granula in den zu beobachtenden Zellen führt. Das als Kernfärbung beigelegte Hämatoxylin führt zur blau-violetten Färbung der Zellkerne zur klaren Abgrenzung der Monozyten von Granulozyten und Lymphozyten, welche in diesem Verfahren nicht weiter angefärbt werden.

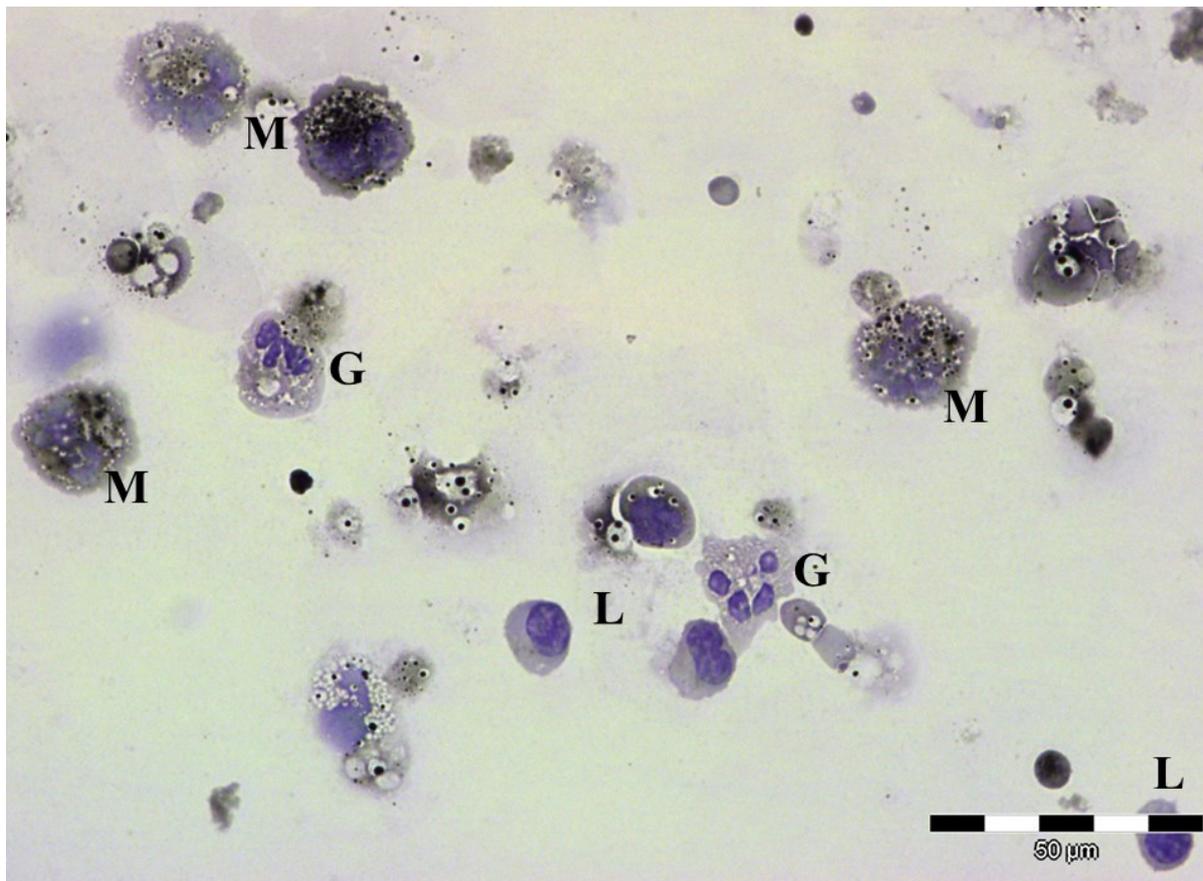


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme von Zellen nach alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung einer Muttermilchprobe einer HCMV-seropositiven Spenderinnen am 47. Tag post partum. 600fache Vergrößerung.

M = Monozyten/Makrophagen; G = Granulozyten; L = Lymphozyten.

Ebenso wie die panoptische Färbung nach Pappenheim wurde jede der insgesamt 49 Proben mit dem Verfahren der alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung angefärbt. Abbildung 10 zeigt das mikroskopische Bild einer HCMV-seropositiven Spenderin am 47. Tag post partum. In dieser Probe konnte via PCR und Zellkultur HCMV aus zellfreier Molke, jedoch nicht aus Muttermilchzellen, nachgewiesen werden. Wie in der panoptischen Färbung nach Pappenheim zeigten die Zellen aus Muttermilch Lipidvakuolen unterschiedlicher Größe und Anzahl. Dabei präsentieren sich die mit der alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung typischen, mit schwarzer Feingranulierung angefärbten, Monozyten/Makrophagen unter Aussparung der intrazellulären Lipidvakuolen.

In Abhängigkeit vom Laktationszeitpunkt veränderte sich die prozentuale Zellzusammensetzung der granulierten Monozyten/Makrophagen zu den übrigen Zellpopulationen. In der oben gezeigten Abbildung 10 zeigen sich die granulierten Monozyten/Makrophagen am 47. Tag post partum als prominenteste Subpopulation. Abbildung 11 zeigt das mikroskopische Bild nach alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung

einer Muttermilchprobe am 131. Tag post partum einer HCMV-seropositiven Spenderin, in welcher sowohl mittels PCR und Viruskultur aus zellfreier Molke, als auch mittels Viruskultur aus Muttermilchzellen HCMV nachgewiesen werden konnte.

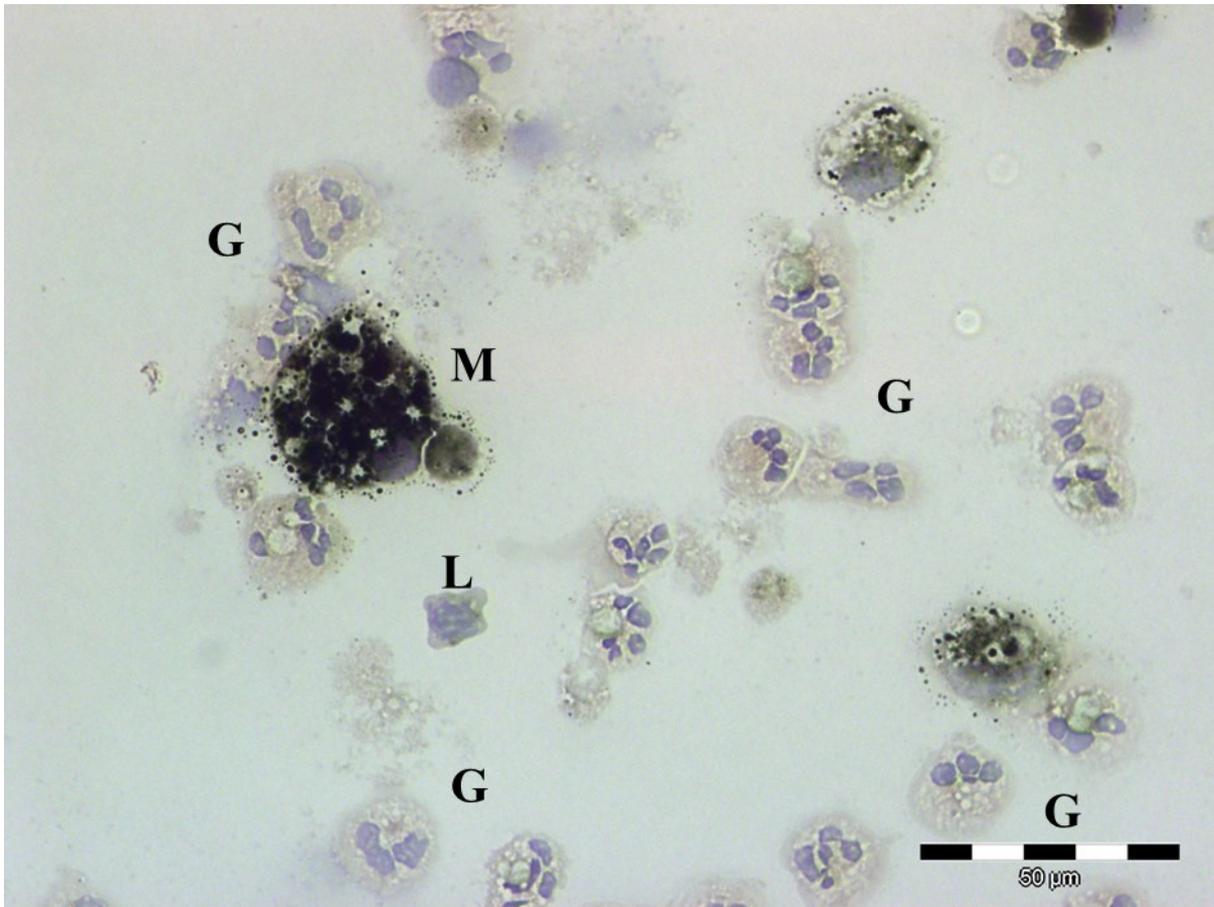


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahme von Zellen nach alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung einer Muttermilchprobe einer HCMV-seropositiven Spenderinnen am 131. Tag post partum. 600fache Vergrößerung.

M = Monozyten/Makrophagen; G = Granulozyten; L = Lymphozyten.

Es zeigt sich ein deutliches Überwiegen der Granulozyten im Verhältnis zu den gefärbten Monozyten/Makrophagen. Mit fortschreitender Laktationsdauer veränderte sich das mikroskopische Bild zu Gunsten nicht granulierter Zellen in Proben bei HCMV-seropositiven Müttern. Durchschnittlich konnten in den Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen im ersten Zeitraum 51,5% der Muttermilchzellen als Monozyten/Makrophagen identifiziert werden und 8,6% als Granulozyten. Im zweiten Zeitraum fiel die durchschnittliche Zahl der Monozyten/Makrophagen in den Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen auf 45% ab, während die Zahl der Granulozyten auf 23,1% anstieg. In Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen zeigten sich auch innerhalb der Zeiträume starke Schwankungen, weshalb hier keine abschließende Aussage getroffen werden konnte.

3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Gesamtmilchzellpopulation und Image-Stream

Nach der mikroskopischen Analyse erfolgte die durchflusszytometrische Analyse zur Detektion von weiteren Leukozytensubpopulationen sowie deren Verteilung und Änderungen im Verlauf der Laktation. Auf Grund veränderter Morphologie und Expressionscharakteristika von humanen Muttermilchzellen gegenüber den bereits in der durchflusszytometrischen Analyse etablierten Blutzellen musste zunächst ein Panel zur weiteren Untersuchung angelegt werden. Orientierend an Untersuchungen an PBMC und mit ausgewählten Oberflächenmarkern (siehe 2.5) wurden Leukozytensubpopulationen, an Hand einer den zu erwartenden Zellen angepasster Gating-Strategie, in der Muttermilch identifiziert (Abbildung 12). Neben der Gesamtleukozytenfraktion wurden folgende Leukozytensubpopulationen mit Antikörpern markiert und in die Analyse übernommen: T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, NKTlike-Zellen, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen sowie die erweiterte Analyse von Antigenexpression auf Zellen mittels HLADR. Ergänzend wurden Epithelzellen/Laktozyten innerhalb der nicht-leukozytären Fraktion detektiert.

Zur Verifizierung der durchflusszytometrischen Daten, in denen mit Größe und Antikörperexpression auf das Vorliegen von spezifischen Zellen rückgeschlossen werden kann, führten wir ergänzend einzelne Untersuchungen mittels des ImageStream-Verfahrens durch, welches zu den Antikörperexpressionen ein Auflichtbild jedes gemessenen Ereignisses lieferte.

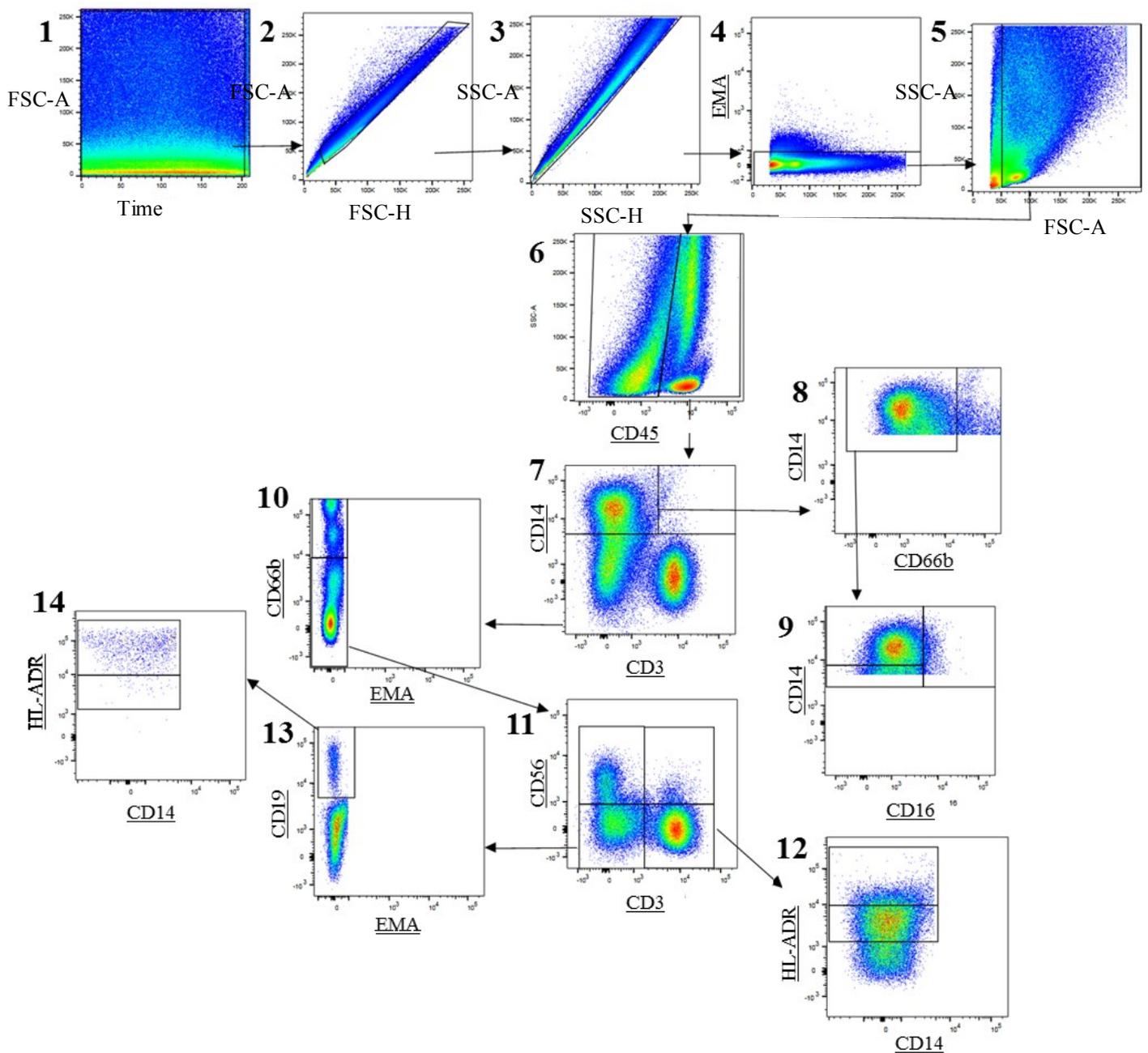


Abbildung 12: Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse am Beispiel einer Muttermilchprobe einer HCMV-seropositiven Spenderin am 39. Tag post partum. Die oberste Zeile (Bild 1-5) zeigt die Exkludierung von Verunreinigungen mittels Größe und Granulation (FSC = Forward Scatter/Vorwärtsstreulicht und SSC = Side Scatter/Seitwärtsstreulicht) sowie nicht-vitaler Zellen (EMA positiv; Bild 4). Nach Festsetzen der Leukozyten mittels CD45 (Bild 6, rechter Abschnitt) wurden die Leukozyten-Subpopulationen mittels den Oberflächenmarkern CD14, CD3, CD66b, CD56, CD16, CD19 und HLA-DR aufgetrennt. Wie in den Abbildungen ersichtlich, zeigt sich bei Muttermilchzellen eine starke Variabilität der Antikörperexpression und -intensität. Deshalb wurden zu jedem Messtag nicht gefärbte Zellen sowie die mononukleäre Zellprobe (PBMC) des Kontrollspenders gemessen und die Subpopulationsbegrenzungen (Trennungen pro Abbildungen 1-14) dementsprechend angepasst. Die x- und y-Achse zeigt jeweils die Intensität der jeweiligen Antikörperexpression in logarithmischer Darstellung.

3.3.1 Etablierung von erweiterter mehrfarbiger durchflusszytometrischer Analyse von Proben humaner Milchzellen

Nach erfolgreicher Etablierung des Protokolls zur Isolation von humanen Muttermilchzellen, der lichtmikroskopisch-morphologischen Identifikation von definierten Leukozytensubpopulationen, sowie unter Berücksichtigung des HCMV-Serostatuses der Spenderinnen, führten wir zusätzlich eine erweiterte mehrfarbige Durchflusszytometrie zur Identifizierung spezifischer Muttermilch Immunzellsignaturen durch.

33 Proben wurden zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt und untersucht. Darunter 18 Proben von 8 HCMV-seropositiven sowie 15 Proben von 7 HCMV-seronegativen Müttern. An jedem Untersuchungstags wurden mindestens eine und maximal 6 Muttermilchzellproben nacheinander im Durchflusszytometer analysiert. Dabei erfolgte pro Untersuchungstag die gleichzeitige Analyse von kryokonservierten PBMC eines zu Beginn der Studie festgelegten Kontrollspenders. Diese Zellen dienten zur Gerätekalibrierung und zur genauen Parameterfestlegung bei fluktuierender Milchzellzusammensetzung und Antikörperexpression der Milchzellen.

Nachdem die isolierten Muttermilchzellen zum einen Teil gefärbt und zum anderen ohne Antikörperfärbung weiterverarbeitet wurden, erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Rohdaten aller untersuchten Proben wurden gesammelt und per FlowJo-Analysesoftware ausgewertet. Eine übergeordnete Gatingstrategie wurde nach mehreren Versuchen ausgewählt, welche tagesspezifisch bei fluktuierender Expression und starken Unterschieden der Proben leicht mittels der nicht gefärbten Kontrollproben angepasst wurde. Diese ist in Abbildung 12 beispielhaft für die Probe einer HCMV-seropositiven Spenderin am 39. Tag postpartum dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt konnte HCMV mittels PCR in der Molke sowie infektiöses Virus mittels Virusisolierung aus der Molke, jedoch nicht aus den Zellen nachgewiesen werden.

Zur Detektion aller Leukozyten wurde der Marker CD45 gewählt (Abbildung 12, Bild 6). Die Monozytenpopulation wurde mittels den Oberflächenmarker CD14 und CD16 (Abbildung 12, Bild 8+9) sowie zusätzlich zur Ermittlung der Antigenexpression mit HLA-DR gekennzeichnet (nicht dargestellt in Abbildung 12). CD14 negative Zellen wurden mit Hilfe von CD66b in Granulozyten (Abbildung 12, Bild 10) und weiter mit CD56 in NK-Zellen, mittels CD3 in T-Zellen (beide Abbildung 12, Bild 11) und mittels CD19 in B-Zellen (Abbildung 12, Bild 13) unterteilt. Durch die Koexpression von CD56 und CD3 wurden NKTlike-Zellen detektiert (Abbildung 12, Bild 11). Ergänzende Expressionen von HLA-DR

auf T-Zellen (Abbildung 12, Bild 12) sowie B-Zellen (Abbildung 12, Bild 14) wurden ebenso wie die Expression von CD16 auf NK-Zellen erfasst (nicht dargestellt in Abbildung 12). Mittels der Expression des verwendeten Oberflächenmarkers CD326 wurden in der Fraktion der nicht-leukozytären Muttermilchzellen (CD45 negativ; Abbildung 12, Bild 6) Epithelzellen/Laktozyten detektiert.

Im Allgemeinen war festzustellen, dass Muttermilchzellen, entgegen den bereits etablierten Blutzellen, eine Herausforderung in der durchflusszytometrischen Analyse darstellen. Die variable Zellgröße, das umgebende lipidreiche Milieu sowie die schwankenden Antigenexpressionen verlangten eine detaillierte Aufarbeitung jeder einzelnen Probe, um sie zu einem gesamten auswertbaren Datensatz zu vereinigen.

3.3.2 Ergänzende Untersuchungen mittels ImageStream-Verfahren

Die Kombination von durchflusszytometrischer Analyse CD-spezifischer Antigenexpressionen und morphologisch-mikroskopischer Darstellung nach histochemischer Färbung der jeweilig zu untersuchenden Leukozytensubpopulation wurde durch das ImageStream-Verfahren ermöglicht. In diesem Verfahren wurden 6 ausgewählte Proben verwendet, welche gleichzeitig der konventionellen durchflusszytometrischen Analyse zugeführt wurden. Dies gewährleistete einen Abgleich der Werte im bereits etablierten Verfahren. Äquivalent zur durchflusszytometrischen Analyse zuvor wurde ein Teil der selektierten Zellen angefärbt, der andere ohne Anfärbung zur Festlegung der Grenzwerte (Cut-Off) untersucht. Die Rohdaten wurden per IDEAS® image analysis software ausgewertet. Die Gatingstrategie der FACS-Analyse musste für das ImageStream-Verfahren angepasst werden. Auf Grund der unterschiedlichen Kanal-Verteilung des ImageStream im Vergleich zur etablierten Gating-Strategie des FACS-Gerätes, wurde auf den SSC-Kanal zu Gunsten des Auflichtbildes (BrightField) verzichtet.

Ethidium Monoazid Bromid (EMA), welches sich bei Zelltod und beschädigter Zellmembran im Zellplasma und Kern einlagert, diente wie bei der durchflusszytometrischen Analyse zur Exkludierung von nicht-vitalen Zellen. Abbildung 13 zeigt Auflichtbilder des ImageStream von Muttermilchzellen, welche EMA im Inneren der Zelle anreichern und zur weiteren Analyse ausgeschlossen wurden.

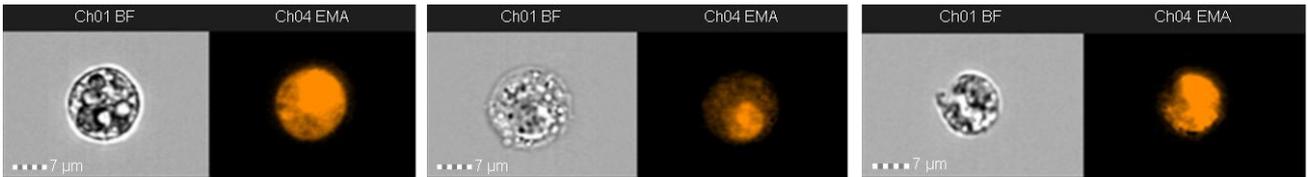


Abbildung 13: Darstellung von nicht-vitalen Muttermilchzellen mittels ImageStream. Auflichtbild (Ch01 BF) und Expression von Ethidium Monoazid Bromid (EMA) im Zellkern und -plasma als Hinweis einer defekten Zellmembran nach Zelltod.

Nachfolgend wurde eine an das ImageStream angepasste, modifizierte Gatingstrategie, wie in Abbildung 14 dargestellt, festgelegt. Hierbei wurde auf eine möglichst hohe Übereinstimmung zur bereits zuvor festgelegten Gatingstrategie beim FACS-Gerät geachtet.

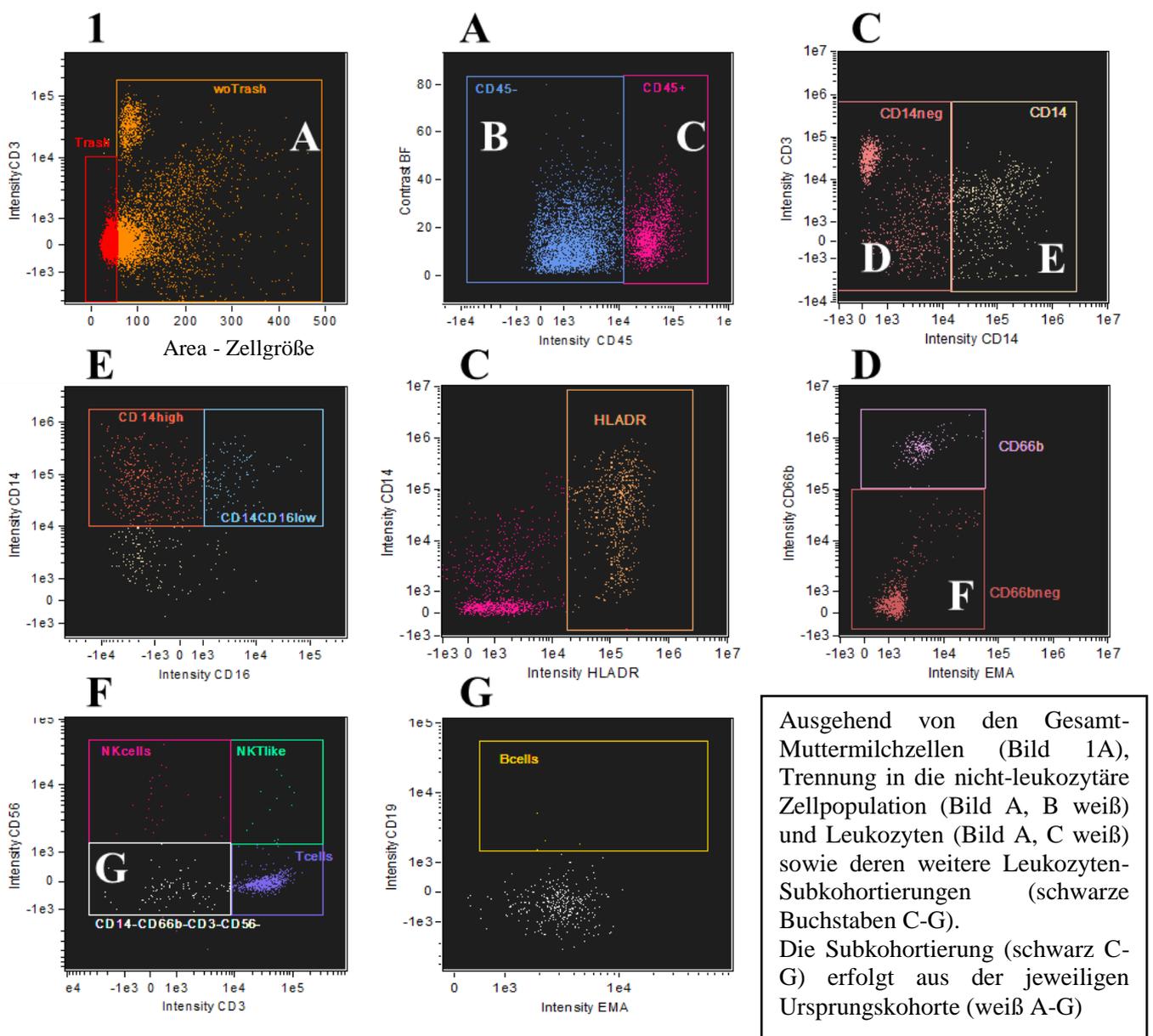
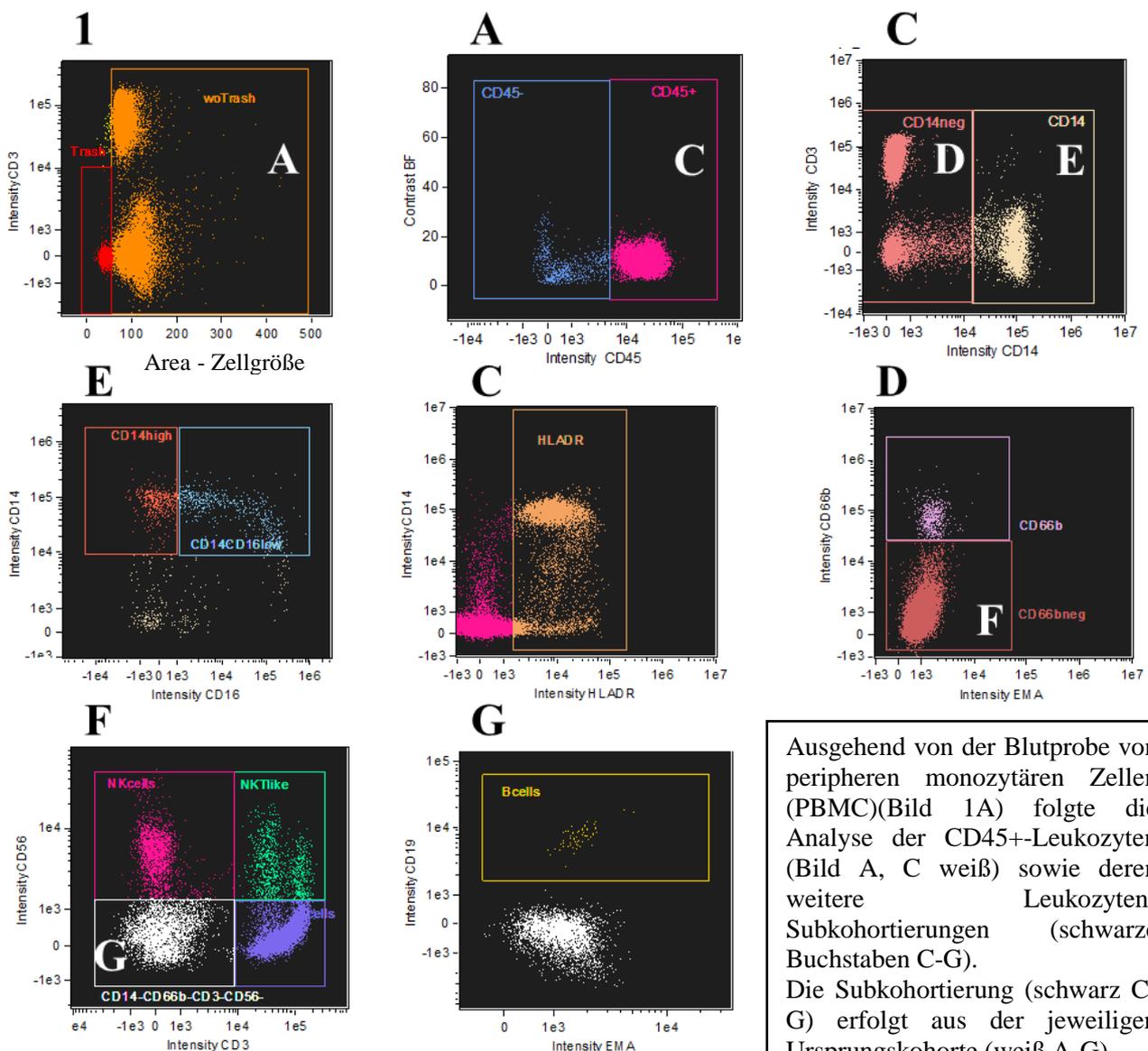


Abbildung 14: ImageStream Gating-Strategie einer Muttermilchprobe einer HCMV-seropositiven Mutter am 57. Tag post partum. Die Gating-Strategie basiert auf dem zuvor angewendeten Gating der Durchflusszytometrie (Abbildung 12). Die x- und y-Achse zeigen jeweils die Intensität der eingesetzten Antikörper in logarithmischer Darstellung, in Bild 1 gibt die x-Achse die relative Zellgröße an.

Ebenso wie zur durchflusszytometrischen Analyse im FACS-Gerät erfolgte die gleichzeitige Analyse von PBMC des Kontrollspenders, an welcher sich die Subpopulationentrennung der Muttermilchleukozyten orientierte (Abbildung 15). Es zeigte sich, dass Muttermilchzellen im Vergleich zu den Blutzellen eine deutlich höhere Kontrastierung aufwiesen (y-Achse von Abbildung 14 und Abbildung 15, je schwarzes A). Des Weiteren zeigte sich eine deutlich variabelere Expression von Oberflächenmarkern der Muttermilchzellen, beispielhaft der CD14 positiven Monozyten/Makrophagen (Abbildung 14, drittes Bild oberste Reihe und erstes Bild zweite Reihe) im Vergleich zu Blutmonozyten (Abbildung 15).



Ausgehend von der Blutprobe von peripheren monozytären Zellen (PBMC)(Bild 1A) folgte die Analyse der CD45+-Leukozyten (Bild A, C weiß) sowie deren weitere Leukozyten-Subkohortierungen (schwarze Buchstaben C-G). Die Subkohortierung (schwarz C-G) erfolgt aus der jeweiligen Ursprungskohorte (weiß A-G)

Abbildung 15: ImageStream Gating-Strategie der Blutprobe von peripheren monozytären Zellen (PBMC) des Kontrollspenders. Die Analyse der peripheren monozytären Zellen diente der Festlegung der Subpopulationentrennung für die Analyse der Muttermilchleukozyten (Abbildung 14). Die x- und y-Achse zeigen jeweils die Intensität der eingesetzten Antikörper in logarithmischer Darstellung, in Bild 1 gibt die x-Achse die relative Zellgröße an.

Nicht nur wurden im ImageStream-Verfahren mikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht, sondern auch Aufnahmen der Intensität und Verteilung der an der Oberfläche haftenden Antikörper. Durch den visuellen Abgleich konnte die Analyse der Zelluntergruppen detailliert angepasst werden (Abbildung 16, mittlere Säule). Die Expression jedes verwendeten Oberflächenmarkers wurde mittels unterschiedlicher Farbgebung dargestellt. Eine kräftigere Farbgebung weist auf eine höhere Expression des markierten Oberflächenmoleküls hin. Beispielhaft zeigt Abbildung 16 in der mittleren Spalte drei monozytäre Zellen, identifiziert durch die Expression von CD45 und CD14. Zur Ergänzung zeigt die mittlere Zelle eine Expression von HLA-DR, welches für die Fähigkeit der Antigenpräsentation der Zelle spricht. Die unterste Reihe der als Monozyten/Makrophagen dargestellten Zellpopulation zeigt sowohl eine Expression von HLA-DR sowie eine Ko-Expression von CD16, was für die sogenannten nicht-klassischen Monozyten charakteristisch ist. Die im Vergleich deutlich höhere Farbdichte in der Spalte von HLA-DR spricht für eine stärkere Expression des Oberflächenmoleküls auf dem dargestellten nicht-klassischen Monozyt im Vergleich zum klassischen Monozyt darüber (Abbildung 16, mittlere Säule, oberer Abschnitt). Äquivalent zeigten NK-Zellen (Expression von CD45 und CD56) eine Ko-Expression von CD16 zur weiteren Differenzierung. T- (Expression von CD45 und CD3) und B-Zellen (Expression von CD45 und CD19; nicht abgebildet) konnten ebenfalls mit und ohne Expression von HLA-DR, und damit mit oder ohne der Fähigkeit der Antigenpräsentation, dargestellt werden.

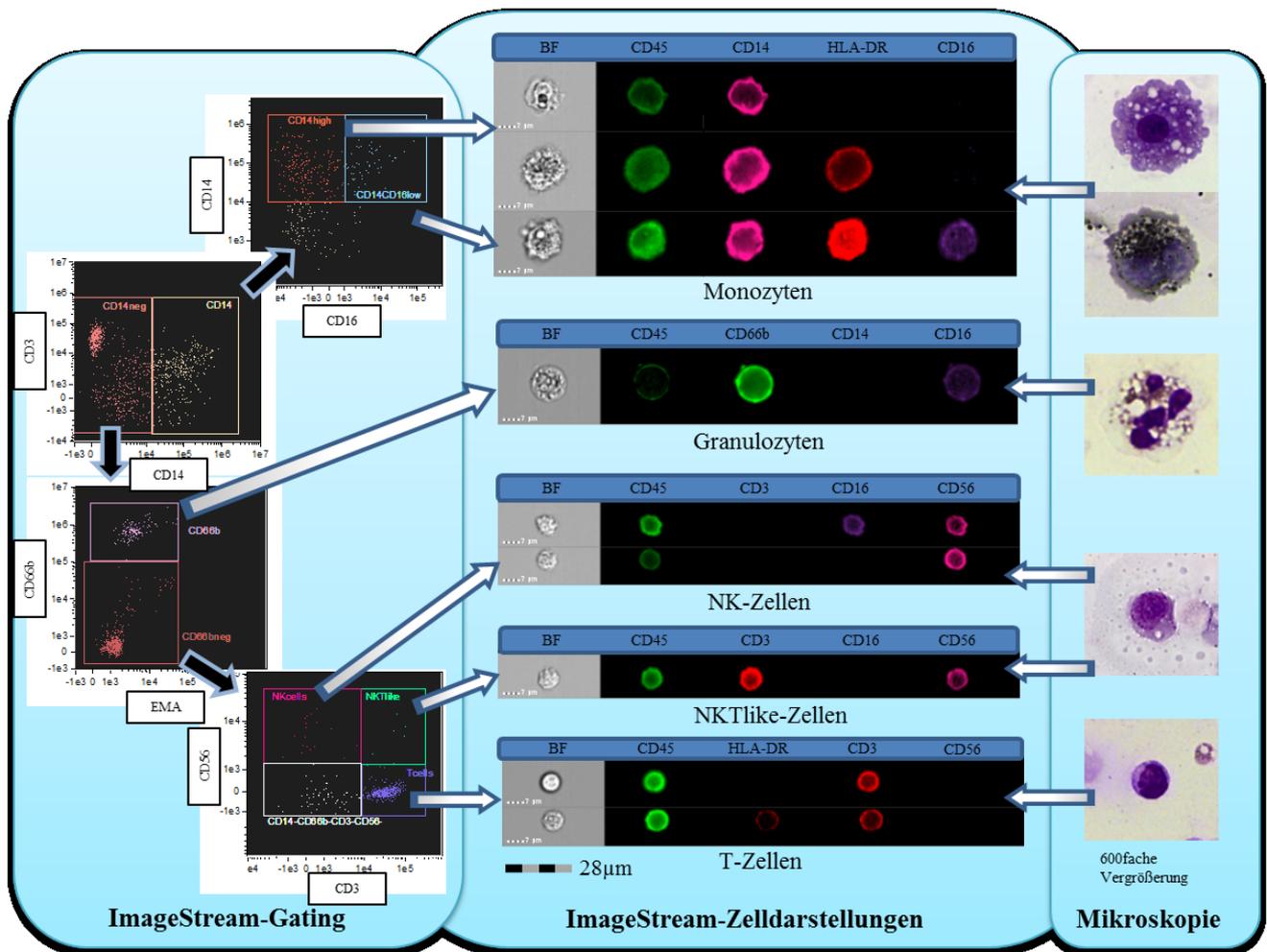


Abbildung 16: Durch die Kombination verschiedener Techniken wie der Durchflusszytometrie und dem ImageStream-Verfahren (Auszüge der Gating-Strategie in der linken Säule; vergleiche Abbildung 14) sowie der mikroskopischen Darstellung gefärbter Zellen (rechte Säule) ließen sich die Muttermilchzellsubpopulationen klar voneinander trennen und darstellen. Die Zeldarstellungen des ImageStreams (mittlere Säule) zeigen einerseits die lichtmikroskopischen Aufnahmen (BF), andererseits die Expression der gebundenen Antikörper (CD45: Gesamt-Leukozyten; CD14 + CD16: Monozyten/Makrophagen; CD66b: Granulozyten; CD56: NK-Zellen; CD16: Subgruppenanalyse von NK-Zellen und Granulozyten; CD3: T-Zellen; HLA-DR: Antigenpräsentierende Zellen).

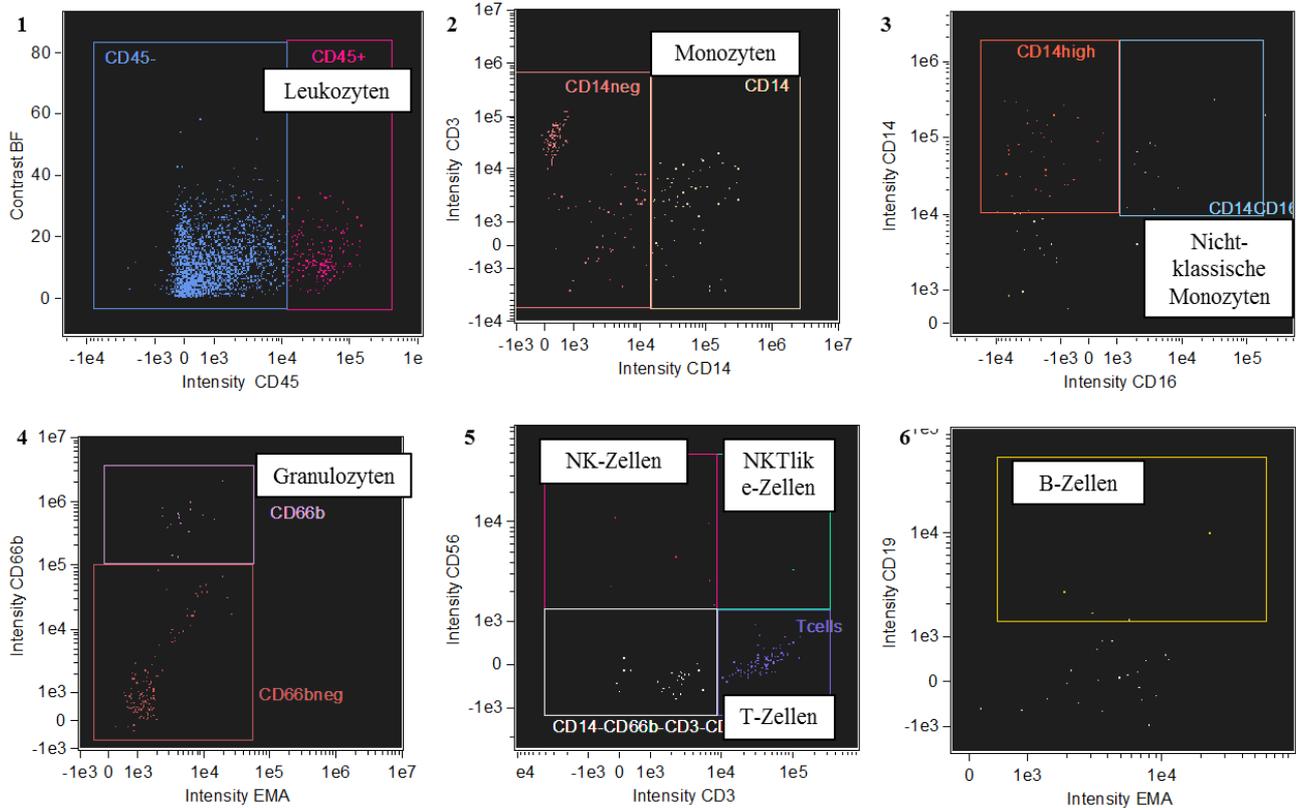
Zellen mit nur punktuellen Mehranreicherungen, zum Beispiel durch Verklebung an begleitenden Lipidtropfen, wurden zur Analyse exkludiert. Ebenso Zellfragmente ohne erkennbare Zellform oder erhaltenen Zellkern. Im Auflichtbild des exkludierten Materials zeigten sich neben Zellfragmenten und –abschnürungen von Epithelzellen (Abbildung 17; E), Lipidtropfen (Abbildung 17; L) sowie Bakterien, welche, wie in 1.2.2 beschrieben, zur natürlichen Komposition der Muttermilch gehören (Abbildung 17, B). Neben aneinander gelagerten Stäbchenbakterien ließen sich ebenso Kokkenbakterien identifizieren.



Abbildung 17: ImageStream Auflichtbilder (CH01 BF) der während des Gatings aussortierten nicht-zellulären Bestandteile (Abbildung 14/15; „Trash“) sowie die vereinzelte Expression des Oberflächenmarkers CD326 (Ch03 CD326). Die detektierten Ereignisse zeigen unter anderem neben Lipidtropfen (L) und Bakterien (B) auch Zellabschnürungen durch apokrine Sekretion von Epithelzellen/Laktozyten (E; Expression von CD326).

Die Analyse der ImageStream-Daten zeigten vergleichbare Werte zu den FACS-Daten der korrespondierenden Muttermilchproben. Dabei konnte durch die visuelle Komponente gesichert werden, dass die Detektion von Antikörperintensitäten der Markierung echter Zellen und damit auch in Größe und Aussehen dem zu erwartenden Leukozytenzellsubtyp entspricht.

Abbildung 18 zeigt die Auswertung von Muttermilchzellen einer HCMV-seropositiven Spenderin am 68. Tag post partum sowohl per ImageStream als auch der ermittelten Zellfrequenzen der konventionellen durchflusszytometrischen Untersuchung mittels FACS. Es zeigt sich ein vergleichbares Verhältnis der Leukozyten subpopulationen. Die größte Abweichung zeigt sich bei den CD14 positiven Monozyten/Makrophagen, was der Tatsache bedingt ist, dass in der ImageStream-Analyse die Populationsbegrenzung zu restriktiv gesetzt wurde.



| Muttermilchzellen 68. Tag post partum | Leukozyten CD45 | Monozyten CD14 | Nicht-klassische Monozyten CD14 + CD16 | | |
|--|-----------------------|-------------------|---|-------------------------------|------------------|
| % aller Zellen (Leukozyten) bzw. % aller Leukozyten | 38,4 | 56,9 | 3,4 | | |
| | Granulozyten CD66b | T-Zellen CD3 | NK-Zellen CD56 | NKT-like Zellen CD56 + CD3 | B-Zellen CD19 |
| % aller Leukozyten | 3 | 17,9 | 1,3 | 0,4 | 0,1 |

Abbildung 18: Auswertung von Muttermilchzellen einer HCMV-seropositiven Spenderin am 68. Tag post partum sowohl per ImageStream (Bild 1-6) als auch der ermittelten Zellfrequenzen der konventionellen durchflusszytometrischen Untersuchung mittels FACS (Tabellen). Die x- und y-Achse zeigen jeweils die Intensität der eingesetzten Antikörper in logarithmischer Darstellung.

In den Proben von HCMV-seropositiven Spenderinnen fanden sich deutlich mehr Leukozyten (CD45 positive Zellen) als in den Proben der HCMV-seronegativen Spenderinnen (Abbildung 19). Abbildung 19 zeigt ebenso die Abnahme der Leukozytenpopulation im Verhältnis zur Gesamtzellpopulation im Laufe der Laktation. Auf Grund der geringen Anzahl an ImageStream Proben und unterschiedlichen Laktationszeitpunkten der Proben von HCMV-seropositiven gegenüber –seronegativen Spenderinnen wurden die visuellen Unterschiede nicht weiter statistisch verglichen.

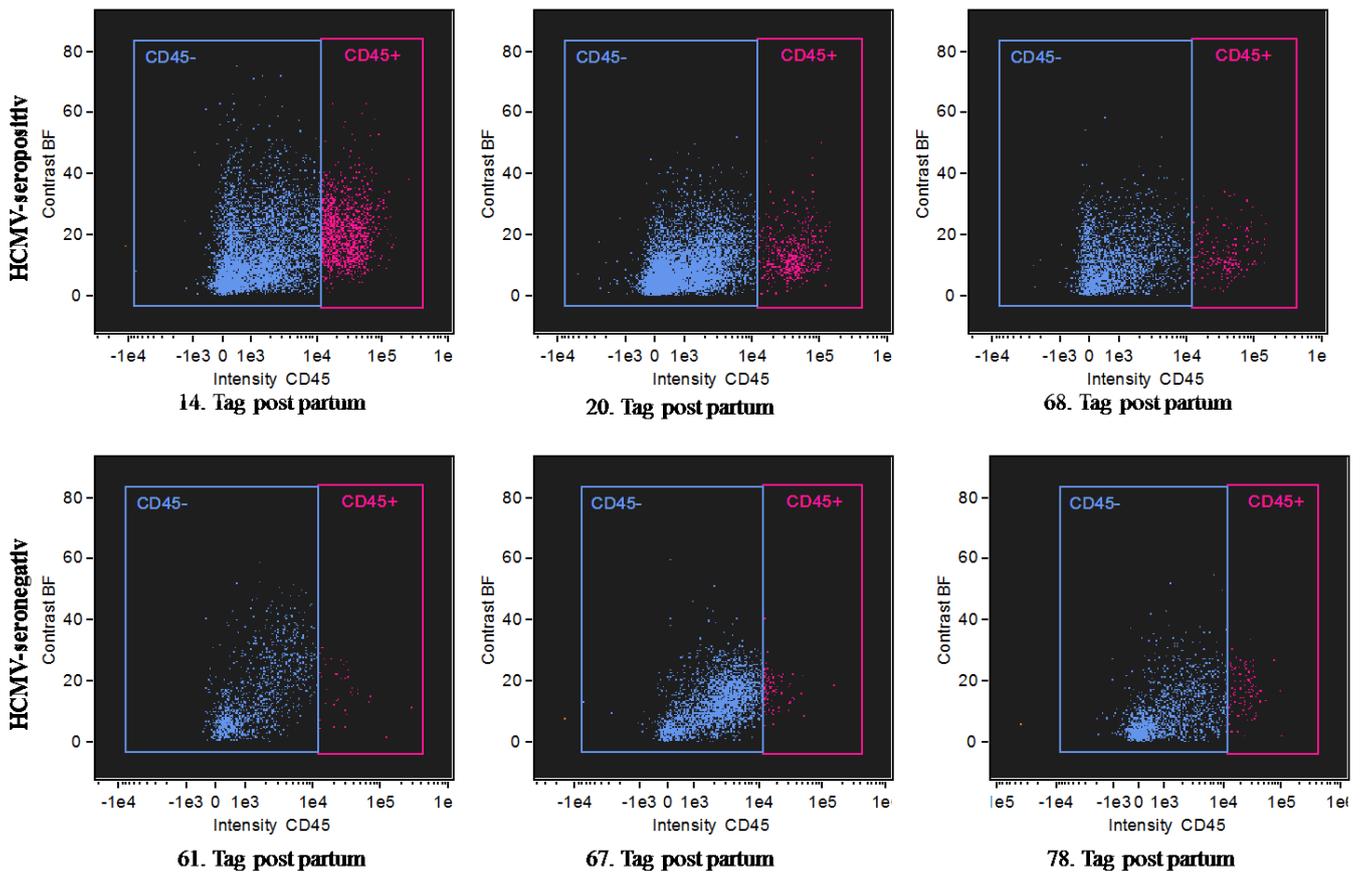


Abbildung 19: ImageStream Darstellungen von Muttermilchzellen HCMV-seropositiver (obere Reihe) und HCMV-seronegativer Spenderinnen (untere Reihe) getrennt an Hand der Expression des Oberflächenmarkers CD45. CD45 positive Zellen als Gesamtleukozytenpopulation mit rosaner Umrandung, nicht leukozytäre Zellen mit blauer Umrandung. Die x-Achse zeigt jeweils die Intensität von CD45 in logarithmischer Darstellung. Die y-Achse gibt die Stärke des Kontrastes der Zellen im Auflichtbild an.

In der Gruppe der Zellen ohne Expression von CD45 fanden sich einige Zellen, welche keine der verwendeten Marker exprimierten. In diese Gruppe fallen die in Material unter 1.2.2 beschriebenen nicht-leukozytären Zellen, unter anderen Stamm- und Progenitorzellen, welche momentan Gegenstand intensiver Forschungen sind. Eine Auswahl dieser Zellen stellt Abbildung 20 da. Im Auflichtbild (BF) sind Zellen mit Zellstrukturen zu erkennen ohne jegliche Expression von den verwendeten Oberflächenmarkern in den anderen Kanälen. Als einziger Oberflächenmarker zur Identifizierung von Zellen der nicht-leukozytären Fraktion wurde CD326 als potentieller Oberflächenmarker von Epithelzellen/Laktozyten verwendet. Wie in Abbildung 17 gezeigt wurde, konnte CD326 auf möglichen Zellabschnürungen von Laktozyten dargestellt werden, welche natürlicherweise durch apokrine Sekretion Bestandteile in die Muttermilch abgeben. Es konnten darüber hinaus in der Gruppe der nicht-leukozytären Muttermilchzellen (Abbildung 14, weißes B) mittels des Oberflächenmarker CD326 Epithelzellen/Laktozyten in der Muttermilch gezeigt werden. Dazu wurde nicht nur die Expression von CD326 als Populationsbegrenzung gewählt, da auch wie oben ausgeführt

Zellfragmente erhöhte Expression aufwiesen, sondern auch die Größe der zu erwartenden Zellen mittels der Fläche (Area) des detektierten Ereignisses (Abbildung 21).

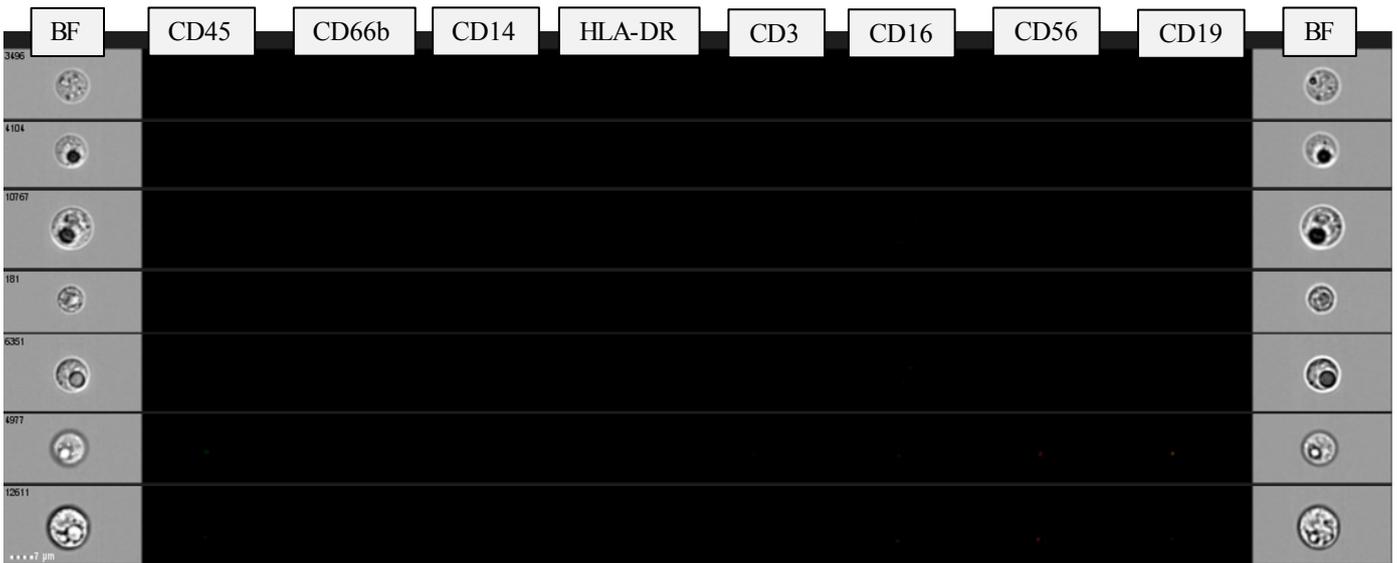


Abbildung 20: Auszüge aus der ImageStream-Analyse von Muttermilchzellen einer HCMV-seronegativen Spenderin am 61. Tag post partum. Während im Auflichtbild (BF) Zellen erkennbar sind, zeigt sich auf diesen keine Expression der eingesetzten Oberflächenantikörper. Diese Zellen gehören demnach zur nicht-leukozytären Population von Muttermilchzellen.

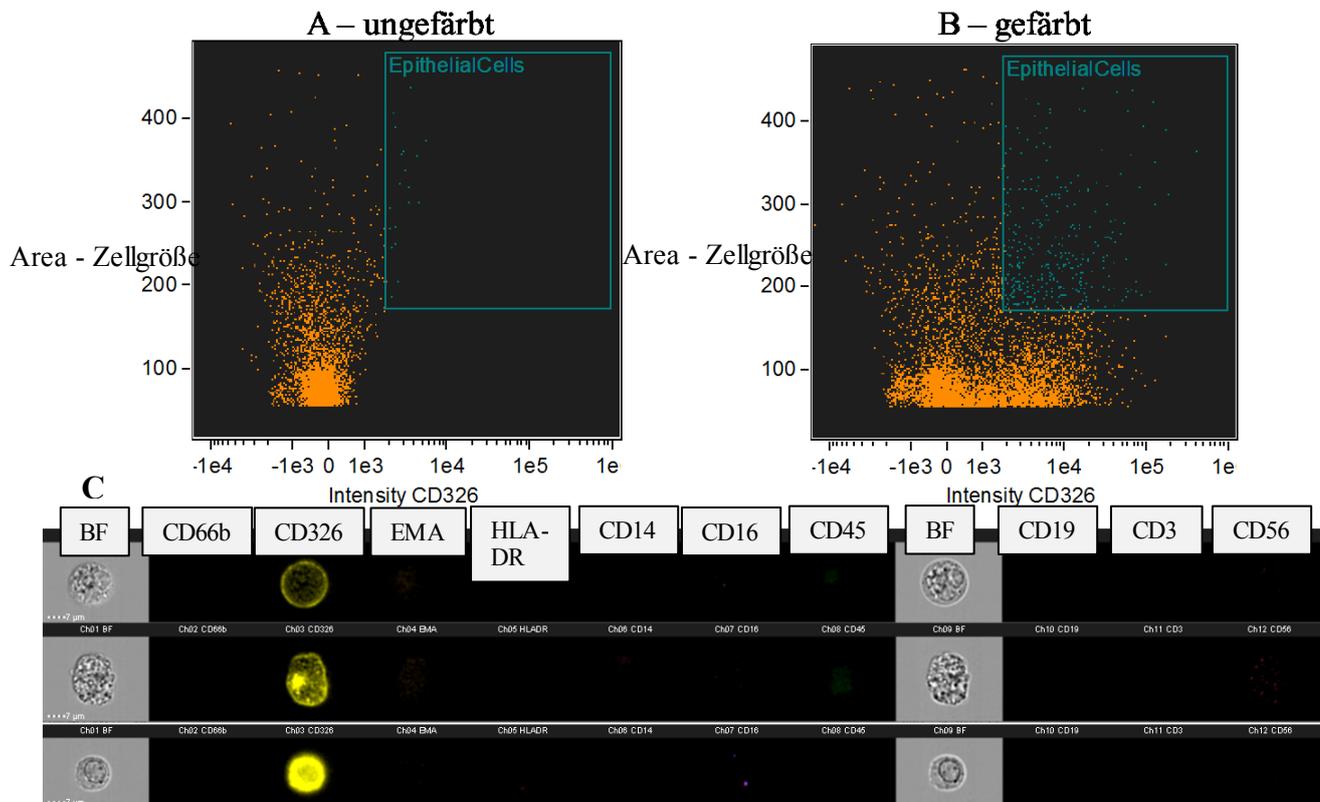


Abbildung 21: Darstellung von CD326 positiven Epithelzellen/Laktozyten via ImageStream in einer Muttermilchprobe einer HCMV-seropositiven Mutter am 57. Tag post partum. Die Gating-Fenster zeigen die Größe des detektierten Teilchens (y-Achse) im Verhältnis zur Intensität des gemessenen Oberflächenmarkers CD326 (x-Achse) im Vergleich einer ungefärbten (A – nicht gefärbt) zu einer gefärbten Probe (B – gefärbt). Darunter (C) werden die Bilder der einzelnen Kanäle dargestellt. Man sieht die Auflichtbilder sowie die deutliche Expression von CD326 auf der Zelloberfläche ohne valide Expression anderer Oberflächenmarker.

3.4 Verteilung der humanen Muttermilchzellen im Vergleich von Proben HCMV-seropositiver und –negativer Spenderinnen

Nach erfolgreicher Etablierung des durchflusszytometrischen Analyseprotokolls wurde eine Kohorte von 7 HCMV-seronegativen sowie 8 HCMV-seropositiven Spenderinnen zusammengestellt. Diese wurden zur besseren Vergleichbarkeit in vier Sub-Gruppen unterteilt. Anhand ihres Serostatuses in die Gruppe der HCMV-seropositiven und HCMV-seronegativen Spenderinnen, welche weiter unterteilt wurde in zwei Zeiträume post partum. Angelehnt an die in vorigen Studien festgelegte Unterteilung in Übergangs-Muttermilch (transitional milk) und reife Muttermilch (mature milk) (Srivastava et al., 1996) wurde ein erster Zeitraum der Probenanalyse vom 1. bis zum 29. Tag post partum und ein zweiter Zeitraum vom 30. bis zum 108. Tag post partum festgelegt.

In den 33 Muttermilchproben, welche mittels Durchflusszytometrie untersucht wurden, zeigte sich eine große Variabilität der Leukozyten (CD45 positive Muttermilchzellen) zwischen minimal 1.381 und maximal 404.905 Leukozyten pro ml nativer Muttermilch. Aufgetrennt nach HCMV-serostatus und Laktationszeitraum zeigte sich eine durchschnittliche Leukozytenzahl von 17.050 Zellen pro Milliliter nativer Muttermilch in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen im ersten Zeitraum, welche zum zweiten Zeitraum auf 7.127 Leukozyten abfiel. Eine deutlich höhere Anzahl an Zellen fand sich in den Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen mit 40.421 Leukozyten pro Milliliter nativer Muttermilch im ersten und 70.717 Leukozyten im zweiten Zeitraum. Der Anteil von Leukozyten an der Gesamtzellzahl pro Milliliter nativer Muttermilch zeigte sich vom HCMV-Serostatus unabhängig vom ersten zum zweiten Zeitraum ansteigend, wobei in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen der durchschnittliche Anteil an Leukozyten von 34,66% auf 43,78% anstieg und in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen der durchschnittliche Anteil von 39,92% auf 52,33% anstieg (Tabelle 17).

Tabelle 17: Leukozyten-Zellzahl und ihr Anteil an der Gesamtzellzahl pro Milliliter nativer Muttermilch nach durchflusszytometrischer Analyse in Proben HCMV-seronegativer und –seropositiver Spenderinnen getrennt nach Laktationszeitraum (Zeitraum 1: 1.-29. Tag post partum; Zeitraum 2: 30.-108. Tag post partum)

| HCMV-Serostatus | Zeitraum post partum | Anzahl Proben | Durchschnittliche Zellzahl an Leukozyten pro ml nativer Muttermilch | Durchschnittlicher Anteil an Leukozyten pro ml nativer Muttermilch [% von der Gesamtzellzahl] |
|-----------------|----------------------|---------------|---|---|
| Negativ | 1 | 5 | 17050 | 34,66 |
| Negativ | 2 | 10 | 7127 | 43,78 |
| Positiv | 1 | 9 | 40421 | 39,92 |
| Positiv | 2 | 9 | 70717 | 52,33 |

Um eine Vergleichbarkeit in den folgenden Analysen zu gewährleisten, wurde von jeder Spenderin im jeweiligen Zeitraum nur eine Probe verwendet. Bei mehreren Proben im gleichen Zeitraum einer Spenderin wurde diejenige gewählt, deren Abnahme näher am Mittelwert aller Proben des korrespondierenden Zeitraums post partum lag. Beispielfhaft lagen von einer Spenderin Milchproben vom 41., 47., 54. und 67. Tag post partum vor. Der Mittelwert aller Proben des zweiten Zeitraums lag bei 57 Tagen post partum. Zur Auswertung wurde dem entsprechend die Probe des 54. Tages post partum dieser Spenderin ausgewählt. So ergaben sich zur Analyse HCMV-spezifischer Unterschiede aus den per Durchflusszytometrie erhobenen 33 Proben für den ersten Zeitraum 4 Proben HCMV-seronegativer und 7 Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen und je 4 Proben für HCMV-seropositiver und –negativer Spenderinnen für den zweiten Zeitraum.

Die Untergruppenanalyse der Leukozyten erfolgte an Hand prozentualer Auswertung der Zelluntergruppe zur Gesamtleukozytenzahl der Probe. Ausgewertet wurden Granulozyten, T-zellen, B-Zellen, NK- und NKTlike-Zellen sowie Monozyten. Mit dem Oberflächenmarker CD326 wurden in der Gruppe der nicht-leukozytären Zellen Epithelzellen/Laktozyten identifiziert.

3.4.1 Visuelle Analyse mittels Heatmap

Durch die Analyse der gesammelten durchflusszytometrischen Daten ergab sich für jede Probe eine individualisierte Immunsignatur einer Spenderin, welche zur besseren Visualisierung in einer Heatmap in Abbildung 22 dargestellt wurde. Dabei wurde die vorhandene Zellanzahl einer Leukozytenuntergruppe ins Verhältnis zur Anzahl der Zellen in der gleichen Untergruppe aller Proben gesetzt. Eine rote Färbung zeigt eine hohe Zellanzahl der Leukozytenuntergruppe in der jeweiligen Probe im Vergleich zu den anderen Proben an, während eine blaue Färbung keine, beziehungsweise eine geringe Anzahl an Zellen anzeigt. Im visuellen Vergleich der zuvor festgelegten verschiedenen Gruppierungen nach HCMV-Serostatus und Laktationszeitpunkt zeigen sich vor allem im Vergleich der Proben des zweiten Zeitraums zwischen HCMV-seronegativen und –seropositiven Spenderinnen deutliche Unterschiede (Abbildung 22, blaue Umrandungen).

Die Gruppe der Granulozyten (CD66b exprimierende Leukozyten) zeigte in allen Proben eine variable Verteilung unabhängig des HCMV-Serostatus oder des Zeitraums der Laktation (Abbildung 22, Spalte 1).

Im Hinblick auf die Verteilung lymphozytärer Zellen zeigten sich im ersten Zeitraum keine prominenten Unterschiede in Proben HCMV-seropositiver oder HCMV-seronegativer Spenderinnen bezüglich B- und NK-Zellen (Abbildung 22, Spalte 2 und 3). Bei weiterer Differenzierung der NK-Zellen jedoch zeigten sich in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen eine deutlich erhöhte Expression von CD16, welche in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen nicht gefunden werden konnte (Abbildung 22, Spalte 3a und 3b). Die visuelle Analyse lässt darauf schließen, dass im ersten Zeitraum die Anzahl NKT-like Zellen (Abbildung 22, Spalte 4) sowie die T-Zellen (Abbildung 22, Spalte 5) in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen denen von HCMV-seronegativen Spenderinnen überwiegen. Die Expression von HLA-DR auf T-Zellen zeigte im Vergleich der Zeiträume und des Serostatus keine Auffälligkeiten (Abbildung 22, 5+ und 5-).

Im zweiten Zeitraum zeigten die Proben der HCMV-seronegativen Spenderinnen, mit Ausnahme der Probe einer Spenderin im Vergleich zu allen Proben eine überwiegend geringe Anzahl sowohl von B- und T-Zellen sowie von NK- und NKTlike-Zellen (Abbildung 22, zweiter Absatz Spalte 2, 3, 4 und 5). Im Gegensatz dazu zeigte die Rotfärbung der Proben der lymphozytären Zellpopulationen bei HCMV-seropositiven Spenderinnen eine Häufung aller

untersuchten lymphozytären Subpopulationen im zweiten Zeitraum an (Abbildung 22, blaue Umrandung Spalten 2-5).

Die kummulative Rotfärbung der CD14-positiven Monozyten/Makrophagen in der Gruppe der HCMV-seronegativen Spenderinnen sowohl im ersten wie im zweiten Zeitraum indiziert eine prominentere Anzahl an Monozyten im Vergleich zu der zunächst im ersten Zeitraum vergleichbaren, jedoch im zweiten Zeitraum deutlich geringeren Anzahl an Monozyten/Makrophagen und damit einhergehender Blaufärbung der Proben HCMV seropositiver Spenderinnen (Abbildung 22, blaue Umrandung Spalte 6).

Die weitere Differenzierung der CD14 positiven Monozyten/Makrophagen erfolgte an Hand der Intensität der CD14 Expression sowie mit Hilfe der Oberflächenmarker CD16 und HLA-DR. Dabei zeigte sich, dass Proben im ersten Zeitraum unabhängig vom HCMV-Serostatus größtenteils eine geringere CD14 Expression aufweisen (Abbildung 22, Spalte 7). Im zweiten Zeitraum zeigten zwei Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen die höchste CD14-Expression, während die anderen Proben eher unterdurchschnittliche Expression boten. Im zweiten Zeitraum HCMV-seropositiver Spenderinnen zeigten sich durchschnittliche Werte der CD14-Expression im Verhältnis zu den weiteren Proben mit Ausnahme einer Probe mit überdurchschnittlichen Expressionswerten. Abbildung 22, Spalten 7+ und 7- stellen die HLA-DR-Expression auf CD14 positiven Zellen als Hinweis auf antigenpräsentierende Monozyten/Makrophagen dar. Es zeigte sich im ersten Zeitraum bei Proben HCMV-seronegativen Spenderinnen ein ausgewogenes Verhältnis von antigenpräsentierenden und nicht-antigenpräsentierenden Zellen (Abbildung 22, erster Absatz Spalte 7+ und 7-). Im gleichen Zeitraum zeigten die Proben der HCMV-seropositiven Spenderinnen eine überdurchschnittliche Anzahl antigenpräsentierender Zellen (Abbildung 22, dritter Absatz Spalte 7+ und 7-). Während die antigenpräsentierenden Monozyten/Makrophagen in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen zum zweiten Zeitraum anhaltend deutlich den nicht-antigenpräsentierenden Monozyten/Makrophagen überwogen, zeigte sich eine Verschiebung der Antigenpräsentation im zweiten Zeitraum der Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen zu Gunsten der nicht-antigenpräsentierenden Monozyten/Makrophagen (Abbildung 22, zweiter Absatz Spalte 7+ und 7-). Insbesondere die zwei Proben mit der höchsten CD14-Expression (beide Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen im zweiten Zeitraum) zeigten kaum Antigenpräsentation (hoher Anteil HLA-DR negativ).

Monozyten/Makrophagen mit Co-Expression von den Oberflächenmarkern CD14 und CD16 waren eher überdurchschnittlich in beiden Zeiträumen in Proben HCMV-seronegativen

Spenderinnen vertreten, während in Proben HCMV-seropositiven Spenderinnen eher eine unterdurchschnittliche Zellanzahl dieser Leukozytensubpopulation detektiert wurde (Abbildung 22, Spalte 8). Eine Ausnahme stellte eine Probe im zweiten Zeitraum einer HCMV-seropositiven Spenderin dar, welche aus allen Proben die höchste Anzahl an koexprimierenden Monozyten/Makrophagen aufwies. Als letztes Differenzierungsmerkmal der Monozyten/Makrophagen wurde die Antigenpräsentation auf den koexprimierenden Zellen mittels HLA-DR-Expression untersucht (Abbildung 22, Spalte 8+ und 8-). Es zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung im ersten Zeitraum in Proben von HCMV-seronegativen und -postiven Spenderinnen (Abbildung 22, erster und dritter Absatz Spalte 8+ und 8-). Auffällig zeigte sich äquivalent zu den Ergebnissen der Antigenpräsentation auf nur CD14-exprimierenden Monozyten/Makrophagen (Abbildung 22, Spalte 7+ und 7-) eine überdurchschnittliche HLA-DR-Expression CD14 und CD16 positiver Monozyten/Makrophagen auf Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen im zweiten Zeitraum (Abbildung 22, vierter Absatz Spalte 8+) und ein überdurchschnittliches Fehlen von HLA-DR-Expression und damit einhergehend Antigenpräsentation auf koexprimierenden Monozyten/Makrophagen HCMV-seronegativer Spenderinnen im zweiten Untersuchungszeitraum (Abbildung 22, zweiter Absatz Spalte 8-).

Die visuellen Eindrücke wurden zur genaueren Analyse statistisch aufgearbeitet (Siehe 3.4.2).

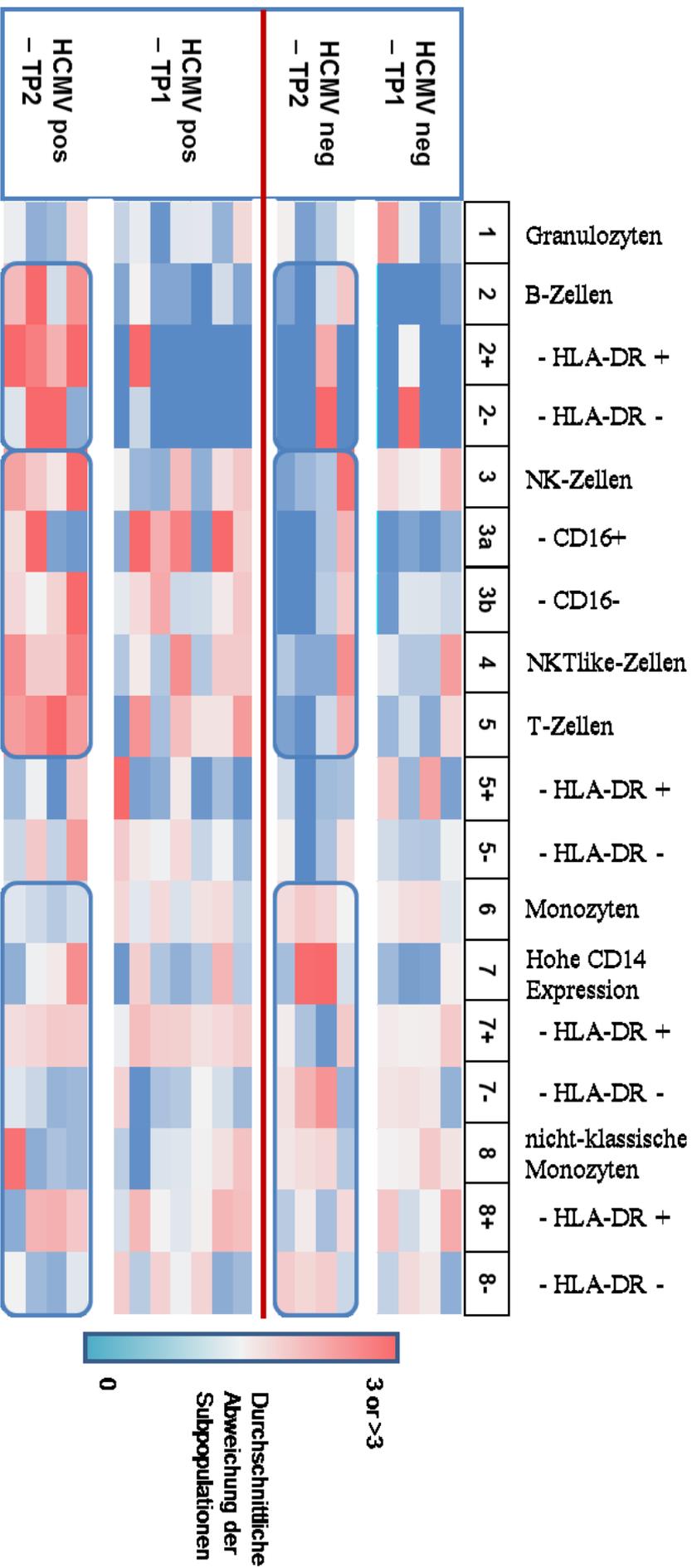


Abbildung 22: Visueller Vergleich der Leukozyten Subpopulationen getrennt nach HCMV Serostatus der Spenderinnen (HCMV neg – negativer Serostatus; HCMV pos – positiv Serostatus) und Laktationszeitpunkt (TP). Laktationszeitpunkt 1 (TP1) wurde auf die Zeitspanne zwischen dem ersten Tag nach Geburt bis zum 30. Tag nach Geburt festgelegt, Laktationszeitpunkt 2 (TP2) zwischen Tag 31 und Tag 108 nach Geburt. Die Daten der Heatmap sind normalisiert und geben farblich codiert für jede Leukozyten Subpopulation an, wie viele Zellen einer Subpopulation im Vergleich zu allen weiteren Proben der gleichen Subpopulation detektiert wurden. Eine Rotfärbung deutet auf eine hohe Zellanzahl der Subpopulation im Vergleich zu den anderen Proben hin, während eine Blaufärbung keine oder wenige Zellen anzeigt. Analytierte Zellpopulationen: (1) Granulozyten, (2) B-Zellen, HLA-DR Expression ((+) positiv, (-) negativ), (3) NK-Zellen, Koexpression CD16 ((a) positiv, (b) negativ), (4) NKTIlike-Zellen, (5) T-Zellen, (6) Klassische Monozyten/Makrophagen, (7) Monozyten mit hoher CD14-Expression, (8) Nicht-klassische Monozyten (Koexpression CD14+CD16.)

3.4.2 Statistische Analyse der Leukozytenuntergruppen an Hand des HCMV-Serostatus der Spenderin

Der statistischen Analyse wurde, wie in 3.4 ausgeführt, nur eine reduzierte Anzahl an durchflusszytometrisch ausgewerteten Proben zugeführt. Nach Reduktion anhand oben genannter Kriterien ergaben sich für den ersten Zeitraum 4 Proben HCMV-seronegativer und 7 Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen und je 4 Proben HCMV-seropositiver und – negativer Spenderinnen für den zweiten Zeitraum.

In der statistischen Auswertung fiel, wie in der bereits in 3.2.1 und 3.4 beschrieben, eine tendenzielle Zunahme der Gesamtzellzahl sowie der Leukozyten in den Proben von HCMV-seropositiven Müttern im Zeitraum 1 nach 2 auf, während die Gesamtzellzahl im HCMV-seronegativen Müttern im Verlauf der Laktation absank. Die durchschnittliche Leukozytenzahl der Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen im zweiten Zeitraum zeigte sich in den 10 durchflusszytometrisch aufgezeichneten Proben leicht ansteigend (Tabelle 17, 3.4), in den nach oben beschrieben reduzierten Proben der Analyse jedoch zeigte sich bei großer Varianz eine durchschnittlich geringere Leukozytenzahl (Abbildung 23, A).

Die Anzahl an Granulozyten zeigte sich nicht nur Zeitpunkt, sondern auch HCMV-Serostatus, unabhängig konstant bei durchschnittlich etwa 5% aller untersuchten Zellen innerhalb der CD45 positiven Leukozyten (Abbildung 23, B).

Die am geringsten detektierte Untergruppe stellten die B-Zellen dar, welche mit dem CD19-Antikörper angefärbt wurden. Im ersten Zeitraum erfolgte in Proben von HCMV-seronegativen Spenderinnen kein sicherer Nachweis, beziehungsweise ein sehr geringer Nachweis von B-Zellen. Im zweiten Zeitraum ließen sich in fast allen Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen B-Zellen nachweisen. Die Anzahl der detektierten B-Zellen lag dabei unter 1% aller Leukozyten. Im ersten Zeitraum ließen sich in 6 von 7 der Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen B-Zellen nachweisen, deren Gesamtzahl unter 0,5% aller Leukozyten der jeweiligen Probe lag. Die Anzahl der B-Zellen im zweiten Zeitraum in Proben von HCMV-seropositiven Spenderinnen lag durchschnittlich um 1%, wobei eine von vier Proben einen hohen Anteil B-Zellen mit 8,1% an allen Leukozyten zeigte.

Auffällig zeigte sich jedoch die weitere Analyse der B-Zellen in Ergänzung mit dem Oberflächenmarker HLA-DR zur Differenzierung von antigenpräsentierenden und nichtantigenpräsentierenden B-Zellen. In den Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen, in

denen B-Zellen nachgewiesen wurden zeigte sich bis auf eine Ausnahme keine Expression vom Oberflächenmarker HLA-DR. In einer Probe im Zeitraum 2 wurden 33,2% der detektierten B-Zellen als HLA-DR-tragend nachgewiesen. Vergleichbar zeigten die detektierten B-Zellen im ersten Zeitraum der HCMV –seropositiven Spenderinnen keinen Nachweis von HLA-DR. Eine Ausnahme stellte die Probe von Mutter 10 am 22. Tag post partum dar, welche 89,8% HLA-DR-exprimierender B-Zellen aufwies. Im zweiten Proben-Zeitraum HCMV-seropositiver Spenderinnen enthielten alle Proben einen Anteil von antigenpräsentierenden B-Zellen, welcher von 31,8 bis 95,2% aller B-Zellen reichte. Nach Auswertung mittels Mann-Whitney U Test ergab sich ein p-Wert von 0,0545 im Vergleich von HLA-DR tragenden B-Zellen des zweiten Zeitraums von Proben HCMV-seronegativer und –positiver Spenderinnen.

Mit dem Oberflächenmarker CD56 wurden NK-Zellen detektiert. Diese machten im ersten Zeitraum in Proben HCMV-seronegativer durchschnittlich 2,025% aller Leukozyten aus. In Proben HCMV–seropositiver Spenderinnen durchschnittlich 1,514% aller Leukozyten. In zweiten Zeitraum erniedrigte sich die Anzahl dieser in 3 von 4 Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen auf unter 1%. Die Anzahl der NK-Zellen in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen im zweiten Zeitraum stellten zwischen 1,8 und 6,3% aller Leukozyten der jeweiligen Probe. Im Mittel lag der Anteil der NK-Zellen des zweiten Zeitraums von HCMV-seropositiven Spenderinnen bei 3,575%.

Durch Kombination der Oberflächenmarker CD56 und CD3 wurden NKTlike-Zellen detektiert. Proben übergreifend stellte diese Leukozytenuntergruppe einen kleinen Anteil mit maximal 1,1% aller Leukozyten dar. Äquivalent zu den NK-Zellen zeigte sich bei Proben von HCMV-seronegativen Spenderinnen eine leichte Erniedrigung der durchschnittlichen Zellzahl vom ersten Zeitraum (durchschnittlicher Anteil von 0,4% aller Leukozyten) zum zweiten Zeitraum (durchschnittlicher Anteil von 0,35% aller Leukozyten). Eine Ausnahme stellten die Probe von Spenderin 16 dar, welche mit 1% deutlich über den Werten der anderen 3 Proben der HCMV-seronegativen Spenderinnen lag. Im ersten Zeitraum lag die durchschnittliche NKTlike-Zellanzahl in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen bei 0,457%. Im zweiten Zeitraum stieg diese auf 0,825% an. Im Vergleich von Proben HCMV-seropositiver und –seronegativer Spenderinnen im zweiten Zeitraum ergab der Mann-Whitney U Test einen p-Wert von 0,1441.

T-Zellen, detektiert durch den Oberflächenmarker CD3, stellten eine variable Leukozytenuntergruppe, mit einem Anteil von 0,6% bis 46,8% aller Leukozyten einer Probe,

dar. Während im ersten Zeitraum die CD3-positiven T-Zellen in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen durchschnittlich 8,7% mit einem Höchstwert von 17,5% aller Leukozyten ausmachten, zeigten im gleichen Zeitraum T-Zellen in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen im Mittel einen Anteil von 17,54% mit einem Höchstwert von 32,2%. Zum zweiten Zeitraum veränderte sich der durchschnittliche Anteil der Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen mit 9,38% kaum. In den Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen jedoch zeigte sich eine deutliche Steigerung des T-Zellenanteils der Muttermilchproben. Mit einem durchschnittlichen Anteil von 35,33% und Höchstwert von 46,8% waren T-Zellen die prominenteste Untergruppe aller Leukozyten. Im Vergleich zu den Werten der HCMV-seronegativen Spenderinnen im gleichen Zeitraum ergab sich mittels Mann-Whitney U Test ein signifikanter p-Wert von 0,0286. Die HLA-DR Expression auf T-Zellen zeigte sich im ersten Zeitraum in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen bei 29,3% und im zweiten Zeitraum bei 37,2%. Eine HCMV-seronegative Spenderin zeigte in zwei Proben im zweiten Zeitraum Werte von 98,1% und 98,5% HLA-DR-Expression auf T-Zellen. In allen anderen Proben lagen die Werte hierfür unter 36%. In Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen lag die HLA-DR-Expression auf T-Zellen im ersten Zeitraum bei 36,4% und im zweiten Zeitraum bei 39,4%.

Die letzte analysierte Leukozytensubpopulation waren die, mittels des Oberflächenmarkers CD14 detektierten, Monozyten. Diese Gruppe stellte bereits in den vorherigen mikroskopischen Analysen eine prominente Fraktion der Muttermilchleukozyten dar. Im ersten Zeitraum zeigten sich sowohl bei Proben HCMV-seropositiver wie auch –seronegativer Spenderinnen ein vergleichbarer prozentualer Anteil der Monozyten von durchschnittlich 58,3% bei HCMV-seronegativen und 56,81% bei HCMV-seropositiven Spenderinnen. Bei den Proben der HCMV-seronegativen Spenderinnen stieg der durchschnittliche Anteil der Monozyten an der Gesamtleukozytenpopulation zum zweiten Zeitpunkt auf 70,8%, mit einem Höchstwert von 86,2% an Monozyten in einer Probe, an. Der prozentuelle Anteil an Monozyten fiel dagegen in den Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen auf durchschnittlich 36,25% ab. Im Vergleich aller Proben des zweiten Zeitraums ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen Proben der HCMV-seronegativen und –seropositiven Spenderinnen. Die Testung durch den Mann-Whitney U Test lieferte einen signifikanten p-Wert von 0,0286.

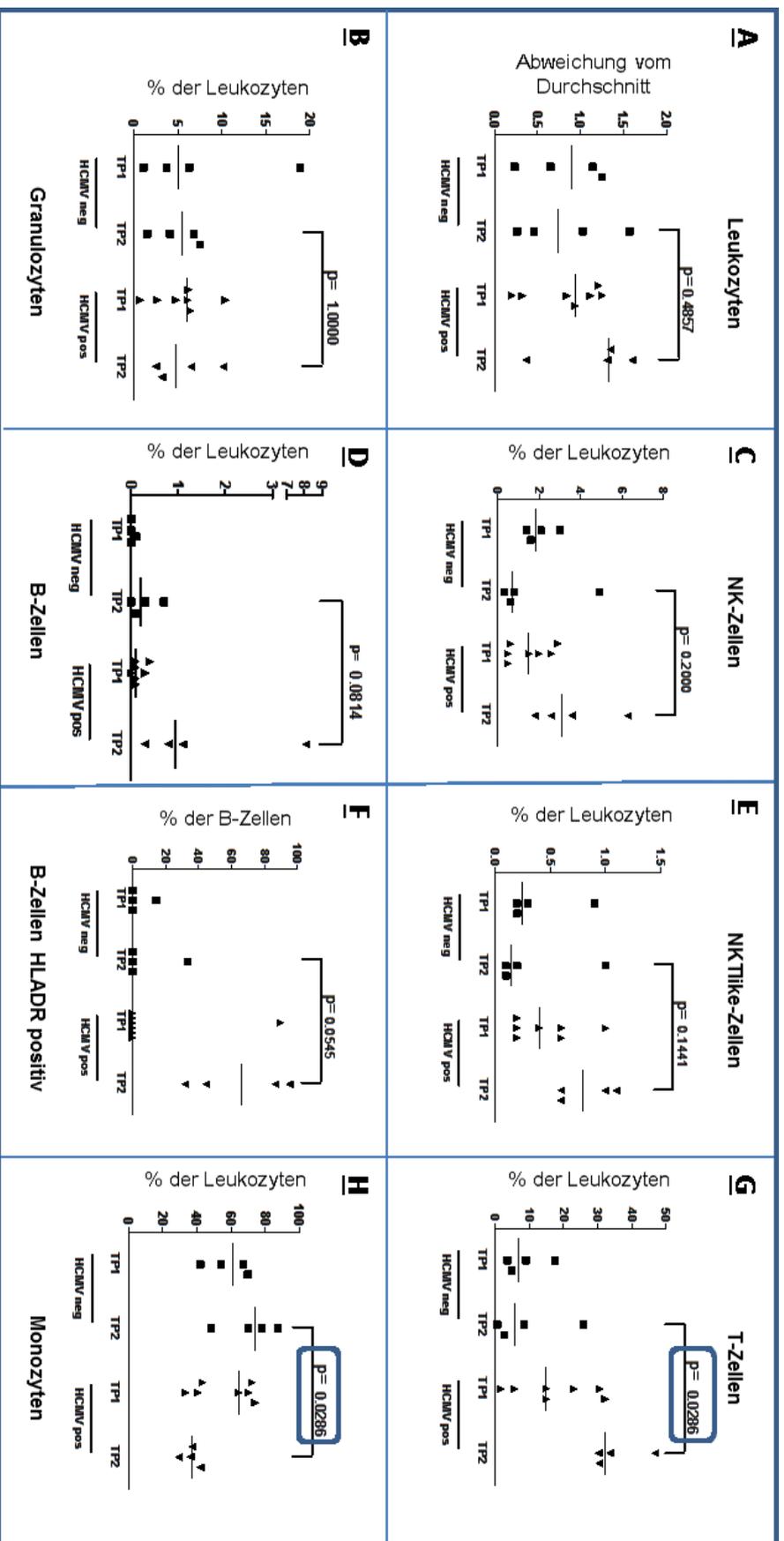


Abbildung 23: Statistische Analyse von Milchleukozyten (A) und Leukozyten Subpopulationen (B-H) getrennt nach HCMV Serostatus der Spenderin (HCMV neg – negativer Serostatus; HCMV pos – positiver Serostatus) und Laktationszeitpunkt unterteilt in zwei Zeiträume (TP). Zeitraum 1 (TP 1) zwischen Tag 1 und Tag 30 nach Geburt; Zeitraum 2 (TP2) zwischen Tag 31 und Tag 108 nach Geburt. Weiterhin wurde ein statistischer Vergleich der zweiten Zeiträume von Proben der HCMV seropositiven und seronegativen Spenderinnen mittels Mann-Whitney U Test durchgeführt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei Betrachtung der T-Zellen (G) sowie der CD14 positiven Monozyten (H).

Abbildung 24 zeigt das Verhältnis der untersuchten Leukozyten Subpopulationen in Muttermilchproben der zwei Spenderinnen aus 3.2.1, eine HCMV-seronegativ, die andere HCMV-seropositiv. Äquivalent zur Abbildung 5, in der die Gesamtzellzahlen der Muttermilchproben der zwei Spenderinnen während der Laktation dargestellt sind, zeigt Abbildung 24 die Veränderung des prozentualen Anteils der untersuchten Leukozyten subpopulationen an vergleichbaren Zeitpunkten der zwei Spenderinnen während der Laktation. Zur besseren visuellen Vergleichbarkeit wurden bei zusätzlichen Daten am 22. Tag post partum bei der HCMV-seropositiven Spenderin sowie am 54. Tag post partum bei der HCMV-seronegativen Spenderin der äquivalente Zeitpunkt im dargestellten Diagramm freigelassen. Wie in der Vergleichsanalyse der Leukozyten Subpopulationen im vorherigen Abschnitt zeigt sich ein deutlicher Unterschied während dem Fortschreiten der Laktation.

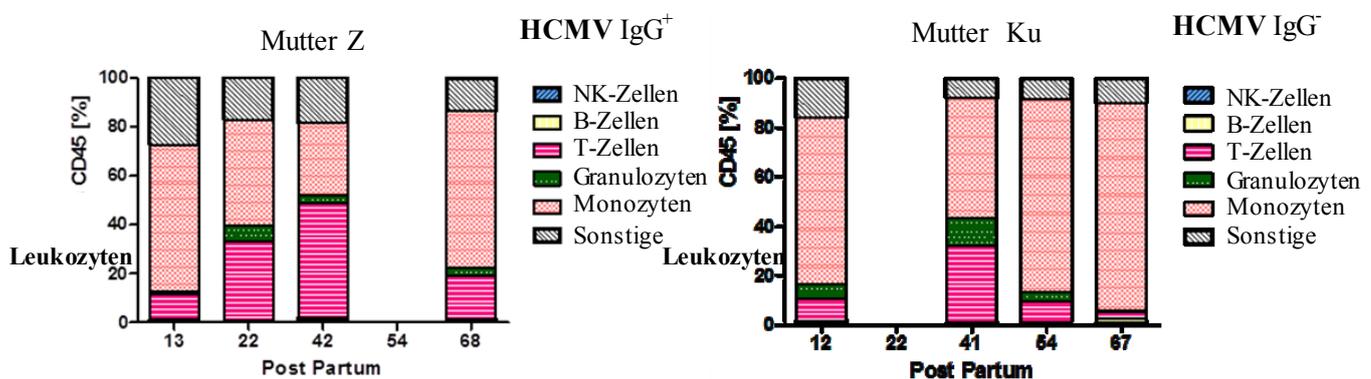


Abbildung 24: Vergleich der untersuchten Leukozyten subpopulationen (NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Monozyten) im Verlauf der Laktation einer HCMV seropositiven (Mutter Z) und HCMV seronegativen Spenderin (Mutter Ku). Markiert als andere Zellen (Sonstige) sind CD45 positive Zellen, welche nicht durch Kombination der eingesetzten Marker identifiziert werden konnten. Auf der x-Achse dargestellt sind fünf Zeitpunkte post partum. Drei vergleichbare Zeitpunkte beider Spenderinnen (Tag 12/13, Tag 41/42, Tag 67/68) sowie eine weitere Probe jeder Mutter ohne zeitliches Äquivalent zur anderen. Zur besseren Veranschaulichung wurde der Zeitpunkt der vorhandenen Probe einer Spenderin auf der x-Achse der anderen Spenderin ergänzt und bei fehlenden Werten freigelassen.

Dabei zeigten CD14 positive Monozyten/Makrophagen und T-Zellen eine gegenläufige Dynamik. CD14 positive Monozyten/Makrophagen (Abbildung 24, rosa gepunktete Balken) stellten zu Beginn der Laktation mit 67,2% in der Probe der HCMV-seronegativen Spenderin an Tag 12 post partum und 59,7% in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin an Tag 13 bei beiden Spenderinnen die Hauptpopulation der Leukozyten. T-Zellen (Abbildung 24, magenta gestreifte Balken) hingegen stellten mit 9% in der Probe der HCMV-seronegativen und 10,6% in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin eine deutlich kleinere Gruppe

dar. Im Verlauf der Laktation zeigte sich eine Verschiebung der Subpopulationsanteile bei beiden Spenderinnen zu Gunsten der T-Zellen. Während in der Probe der HCMV-seronegativen Spenderin am Tag 41 post partum, bei nun 30,9% T-Zellen, die CD14 positiven Monozyten/Makrophagen anhaltend mit 48,4% die Hauptpopulation der Leukozyten darstellten, überwiegen in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin die Population der T-Zellen mit 46,8% gegenüber der CD 14 positiven Monozyten/Makrophagen mit 29,4%. Bei fortschreitender Laktation näherten sich die Populationsverteilungen den Werten zu Beginn der Laktation an. In der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin am Tag 68 zeigten sich weiterhin eine prominente Anzahl von 17,9% T-Zellen bei 64,1% CD14 positiven Monozyten/Makrophagen, während in der Vergleichsprobe der HCMV-seronegativen Mutter vom Tag 67 sich 84,2% aller Leukozyten als CD14 positiven Monozyten/Makrophagen und nur noch 2,7% als T-Zellen zeigten.

Die Anzahl der Granulozyten an allen Leukozyten in den longitudinal analysierten Proben der zwei Spenderinnen zeigte während der Laktation ebenfalls eine ähnliche Kinetik wie die zuvor beschriebenen T-Zellen. Zu Beginn der Laktation wurden nur 0,9% Granulozyten in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin detektiert, während sich 6,3% in der Probe der HCMV-seronegativen Spenderin fanden. Der Maximalwert wurde bei der HCMV-seropositiven Spenderin am 22. Tag post partum mit 6,4% erreicht, während sich der Höchstwert von 11,4% am 41. Tag post partum in der Probe der HCMV-seronegativen Spenderin zeigte. Von da an abfallend, wurden am 68. Tag post partum in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin noch 3% Granulozyten und in der Probe der HCMV-seronegativen Spenderin am 67. Tag post partum 0,4% Granulozyten detektiert (Abbildung 24, grün gefärbte Balken).

Äquivalent zur vorhergegangenen Gesamtleukozytenanalyse aller Proben konnten B-Zellen (CD19 positive Leukozyten) in nur sehr geringer Anzahl detektiert werden und stellten über die gesamte untersuchte Laktationsdauer in den Proben der HCMV-seropositiven Spenderin unter 0,5% der Leukozyten. In den Proben der HCMV-seronegativen Spenderin wurden ebenso unter 0,5% der Leukozyten detektiert, mit Ausnahme des 67. Tages post partum, an welchem B-Zellen 1,7% aller Leukozyten stellten (Abbildung 24, gelbgefärbte Balken).

Leukozyten, welche zwar eine CD45 Expression zeigten, jedoch keinen weiteren der eingesetzten Marker exprimierten, werden in Abbildung 24 als grau schraffierte Balken dargestellt. Diese machen zu Beginn der Laktation eine prominente Gruppe mit 26% in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin am Tag 13 post partum und 16% in der Probe der

HCMV-seronegativen Spenderin an Tag 12 post partum aus. Im Verlauf zeigt sich eine gleichbleibende Detektionsrate von durchschnittlich 17% in den Proben der HCMV-seropositiven Spenderin und 13% in Proben der HCMV-seronegativen Spenderin.

3.4.3 tSNE-Analyse (t-distributed stochastic neighbourhood embedding)

Die tSNE-Analyse ermöglicht die Darstellung von Beziehungen der betrachteten Immunzellphänotypen untereinander. Dabei werden sowohl die spezifische Antigenexpression nach Antikörperbindung und Färbung sowie deren Intensität in der durchflusszytometrischen Analyse zu Grunde gelegt. Die bereits in 3.4. analysierten 19 Milchproben wurden in der Analyse unabhängig des HCMV-Serostatus auf 3500 Zellen pro Probe reduziert und zu einer Gesamtprobe zusammengefasst. Dies gewährleistete eine gleichmäßigere Probenauswertung jeder einzelnen Probe im Probenvergleich. Dabei wurde auf eine Reduktion bei gleich bleibender prozentualer Verteilung geachtet. Abbildung 25 A) zeigt das Verteilungsmuster sowie die Aufteilung der Leukozytenuntergruppen der Gesamtprobe. Es zeigt sich als Hauptteil die CD14 tragenden Monozyten mit der klaren Abgruppierung der antigenpräsentierenden Fraktion (HLA-DR-positive CD14+-Monozyten). Ebenso die Gruppierung der CD positiven T-Zellen, ebenfalls mit einer antigenpräsentierenden Fraktion (HLA-DR-positive CD3+-T-Zellen). Die Gruppe der CD66b-positiven Granulozyten (rosa Markierung), der CD56-positiven NK-Zellen (braune Markierung) und der CD19-positiven B-Zellen (gelbe Markierung). Auf eine weitere Unterteilung wurde zur besseren Übersicht verzichtet.

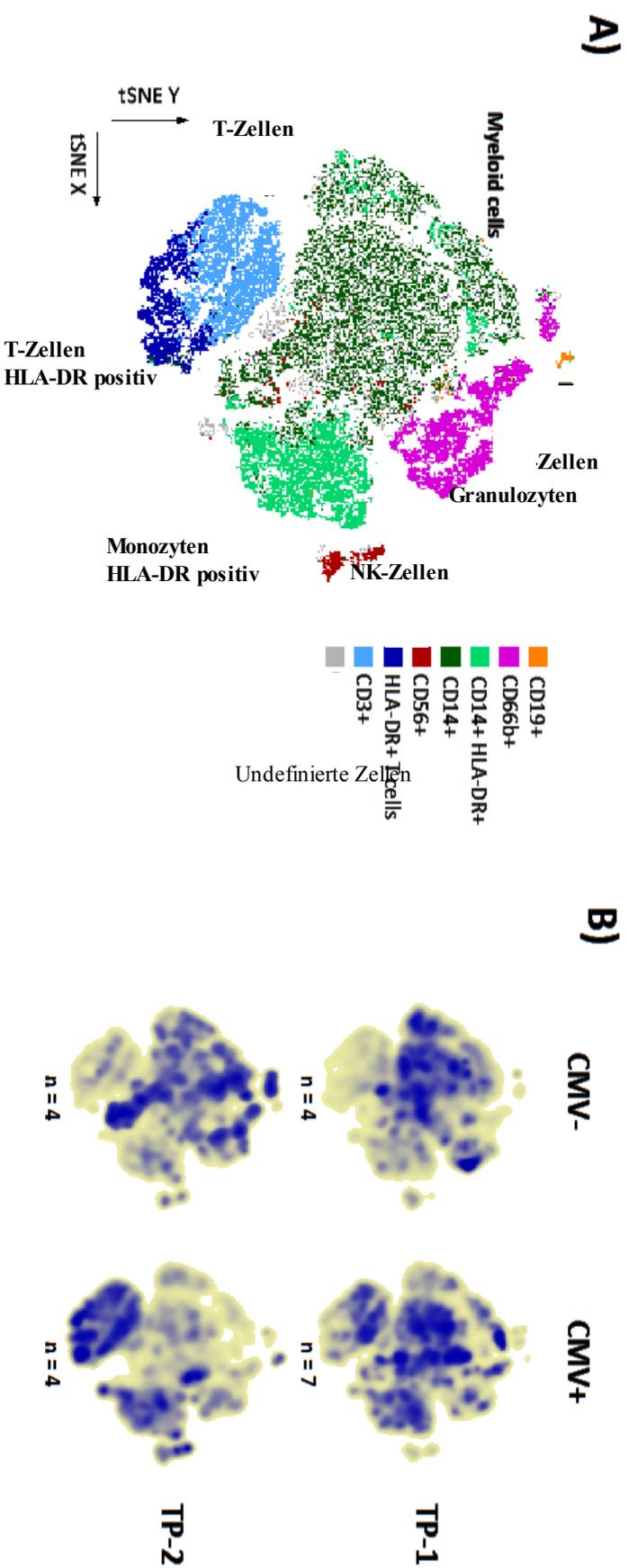


Abbildung 25: Zusammensetzung von CD45 positiven Leukozyten in Muttermilch

Kombinierte Analyse von Leukozytenphänotypen in 19 Muttermilchproben mittels tSNE-Analyse (t-distributed stochastic neighborhood embedding) (A).

Die Untergruppenanalyse der tSNE-Analyse, durch Trennung der Muttermilchproben nach HCMV Serostatus der Spenderinnen sowie Laktationszeitraum (Zeitraum 1 (TP 1) zwischen Tag 1 und Tag 30 nach Geburt; Zeitraum 2 (TP2) zwischen Tag 31 und Tag 108 nach Geburt), zeigt deutliche Unterscheidungen in der Zusammensetzung des analysierten Immunzellprofils, sichtbar im Dichtediagramm (B) (blaue Bereiche zeigen hohe Zellzahlen, gelbe Bereiche niedrige Zellzahlen).

Äquivalent zur vorherigen Gruppenunterteilung an Hand des HCMV-Serostatus und des Laktationszeitraums ließen sich nun auf Grundlage der Gesamtprobe die prominenten Zellpopulationen der jeweiligen Gruppe darstellen. Abbildung 25 B zeigt diese t-SNE-Untergruppenanalyse. Eine Blaufärbung indiziert eine hohe Zellanzahl, während eine Gelbfärbung eine geringe Zellzahl anzeigt. Dabei zeigte sich wie in der Leukozytenuntergruppenanalyse in 3.4.2., dass in den Gruppen der HCMV-seronegativen Spenderinnen vor allem Monozyten und Granulozyten während der gesamten untersuchten Laktationsdauer die dominierenden Leukozytenuntergruppen darstellen. Bei HCMV-seropositiven Spenderinnen waren im ersten Zeitraum der Laktation Monozyten, Granulozyten und T-Zellen prominent, im Verlauf der Laktation (zweiter Zeitraum) verschob sich die Leukozytenuntergruppenverteilung jedoch zu Gunsten der T-Zellen, vor allem antigenpräsentierende T-Zelle, sowie antigenpräsentierenden Monozyten (beide HLA-DR-positiv) und B-Zellen.

3.4.4 Epithelzellen/Laktozyten in Muttermilch

Als einziger Oberflächenmarker für nicht-leukozytäre Zellen wurde CD326 zum Nachweis von Epithelzellen/Laktozyten verwendet. Diese Zellgruppe wird ebenso als mögliche Zielzelle der HCMV-Übertragung in Muttermilch diskutiert.

Durchflusszytometrisch konnten CD326 positive Zellen in fast allen der 33 Muttermilchproben nachgewiesen und per ImageStream-Analyse die Zellen klar identifiziert werden (Abbildung 21; 3.3.2). Die Anzahl von CD326 positiven Zellen in der FACS-Analyse schwankte während der Laktation zwischen 0 und 23.611 Zellen. Dies entsprach 0-10,4% aller gemessenen Zellen nach Exkludierung der nichtzellulären Bestandteile (Abbildung 12, Bild 6). Die 15 Muttermilchproben HCMV-seronegativer Spenderinnen zeigten eine Anzahl von 0 - 8,3% Epithelzellen/Laktozyten mit einem Durchschnitt von 3,89% Epithelzellen/Laktozyten pro Muttermilchprobe. Die 18 Muttermilchproben HCMV-seropositiver Spenderinnen zeigte eine Anzahl von 0-10,4% Epithelzellen/Laktozyten mit einem Durchschnitt von 3,38% Epithelzellen/Laktozyten pro Muttermilchprobe.

Im zweiten Untersuchungszeitraum (ab 31. Tag post partum) konnten prozentual mehr Epithelzellen/Laktozyten als im ersten Untersuchungszeitraum (1.-29. Tag post partum) nachgewiesen werden. Im Durchschnitt waren dies 4,8% an Epithelzellen/Laktozyten aller nachgewiesenen Muttermilchzellen in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen und 4,1%

Epithelzellen/Laktozyten in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen im Vergleich zum ersten Untersuchungszeitraum in dem sich 2,9% Epithelzellen/Laktozyten in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen und 3,4% HCMV-seropositiver Spenderinnen nachweisen lies.

4 Diskussion

Das Kompartiment Muttermilch ist trotz einzelner Studien, in denen vor allem auf Einzelaspekte wie Stammzellen Augenmerk gelegt wurde (siehe 1.2), immer noch bezüglich der nutritiv-immunologischen Inhaltsstoffe, der Migration von Zellen und der Veränderlichkeit während der Laktation nicht ganz entschlüsselt. Weiterhin ist unklar in welchem Rahmen die Zellen der Muttermilch eine Rolle in der Übertragung von transienter oder bleibender Immunität, aber auch in der Übertragung von persistenten Infektionen wie HIV oder HCMV spielen.

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der zellulären Zusammensetzung und Veränderung der Muttermilch während der Laktation im Zusammenhang mit dem HCMV-Serostatus der Spenderinnen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Rangmar Gölz und der Neonatologie der Universitätsklinik Tübingen ein Kollektiv stillender Mütter in den Jahren 2015 und 2016 erstellt, deren Kinder postnatal auf einer der neonatologischen Stationen betreut wurden. Es wurden unter Zustimmung der Ethikkommission folgende Punkte berücksichtigt:

- Die freie Zustimmung der Studienteilnehmerinnen
- Die Versorgung des Säuglings musste gewährleistet werden und nur überschüssige Muttermilch wurde als Probe verwendet
- Bekannter HCMV-Serostatus der Spenderinnen

Die HCMV-Seroprävalenz der Spenderinnen wurde, wie in der Routine-Diagnostik der medizinischen Virologie Tübingens durch die Arbeitsgruppe Hamprecht etabliert, vor Geburt mittels HCMV-IgG-Antikörpern bestimmt (Hamprecht, Jahn in Neumeister, Geiss and Braun, 2009).

4.1 HCMV-Reaktivierung in Muttermilch

Die Reaktivierung von HCMV bei HCMV-seropositiven Müttern lokal in der Muttermilch während der Laktation ist bereits in vielen Studien bestätigt worden und entspricht nahezu der Seroprävalenz der Mutter (Hamprecht et al., 2008). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte der Nachweis von HCMV mittels PCR-Analyse in der Muttermilch erbracht werden. Dabei wurde zwischen der zellfreien Molkefraktion, welche in der Routinediagnostik für den direkten Virusnachweis verwendet wird, sowie der Muttermilchzellfraktion unterschieden. Bei 8 von 10 HCMV-seropositiven Spenderinnen konnte zu einem oder mehreren Zeitpunkten während der Laktation HCMV-DNA mittels PCR in Molke nachgewiesen werden. Von den

zwei verbleibenden Spenderinnen ohne Nachweis von HCMV-DNA in Molke lagen nur Proben am 6. und 12. Tag post partum vor, weshalb auf Grund der Studienlage davon auszugehen ist, dass der Nachweis einer Reaktivierung zu einem späteren Laktationszeitpunkt positiv ausgefallen wäre. Im zweiten Zeitraum ab Tag 30 post partum konnte in jeder Probe von HCMV-seropositiven Spenderinnen HCMV-DNA nachgewiesen werden.

Die beschriebene Kinetik der Reaktivierung (Hamprrecht et al., 2003) konnte auch im Rahmen dieser Studie nachvollzogen werden. Es zeigte sich jedoch, dass trotz der allgemeinen Kinetik der HCMV-Reaktivierung während der Laktation, es starke intraindividuelle Abweichungen gibt. So konnte eine Reaktivierung bei Mutter 13 bereits am 10. Tag post partum mittels positiver HCMV-DNA PCR nachgewiesen werden, während bei Mutter 10 am 22. Tag post partum keine HCMV-DNA nachgewiesen werden konnte und der erste positive Nachweis erst am 42. Tag post partum erfolgte. Bei Mutter 4 konnten konsekutiv bis zum 131. Tag post partum HCMV-DNA in der Muttermilch nachgewiesen werden.

Die Reaktivierung von HCMV in Muttermilch scheint trotz einer allgemeinen Kinetik starken intraindividuellen Einflüssen zu unterliegen. Eine frühe Reaktivierung beziehungsweise anhaltende Ausscheidung des Virus über die Muttermilch erhöht die Transmissionsrate auf den Säugling, weshalb weitere Studien zur Aufarbeitung möglicher Einflussfaktoren der Reaktivierung sowie Präventionsansatzpunkte nötig sind. Wie lange eine Virusinaktivierung der Muttermilch durch Verfahren wie beispielsweise die Kurzzeitpasteurisierung (Hamprrecht et al., 2004; Maschmann et al., 2015) notwendig sind, sollte auf Grund der oben beschriebenen intraindividuellen Unterschiede immer auf die einzelne Stillende ausgerichtet sein. Wie bei einer Mutter nachgewiesen kann der Nachweis von HCMV-DNA in Muttermilch auch noch Monate nach Geburt erfolgen. Ob dies in mehreren Spenderinnen reproduziert werden kann und über welche Dauer sollte ebenso Teil weiterer Forschungen sein wie die Überlegung ob es auch im Rahmen der HCMV-Reaktivierung in Muttermilch zu Dauerausscheidung während der gesamten Laktation kommen kann.

Wie bereits beschrieben konnte auch in früheren Studien (Maschmann et al., 2015) der Nachweis von HCMV mittels PCR und Kultur in der Leukozytenfraktion der Muttermilchzellen nur teilweise und selbst bei fortlaufenden Untersuchungen von Muttermilchproben einer Spenderin nur diskontinuierlich erfolgen. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte infektiöses Virus in Kultur von 5 Muttermilchzellen von 3 HCMV-seropositiven Spenderinnen nachgewiesen werden. Der schwierigere Nachweis aus Muttermilchleukozyten könnte dem Umstand geschuldet sein, dass erst der direkte Nachweis

von HCMV DNA in Molke erbracht werden muss, bevor aus einer weiteren Probe die Zellseparation erfolgen kann. Ein Zusammenhang zwischen Zellzahl und positivem Virusnachweis in Zellen konnte nicht gezeigt werden. Ebenso konnte in den begrenzten Daten keine Abhängigkeit zum Laktationszeitpunkt festgestellt werden.

4.2 Charakterisierung von Muttermilchzellen

4.2.1 Muttermilchzellzahl in Abhängigkeit des HCMV-Serostatus

Die bereits 1993 durch Speer et al. beschriebene Reduktion der Muttermilchzellzahl im Verlauf der Laktation (Speer & Hein-Kreikenbaum, 1993; Trend et al., 2015) konnte auch in unseren Analysen gezeigt werden, in denen in den ersten Tagen und Wochen post partum hohe Muttermilchzellzahlen von bis zu $2,0 \times 10^5$ pro Milliliter nativer Muttermilch gefunden wurden, während im Verlauf der Laktation die durchschnittliche Zellzahl signifikant (p-Wert 0,0025) von $7,9 \times 10^4$ im ersten Zeitraum auf $4,0 \times 10^4$ im zweiten Zeitraum abnahm. Auch hier zeigten sich jedoch große intraindividuelle Unterschiede. In Bezug auf den HCMV-Serostatus der Spenderin zeigten HCMV-seropositive Spenderinnen eine durchschnittlich höhere Zellzahl im ersten Zeitraum mit $9,8 \times 10^4$ im Vergleich zu den HCMV-seronegativen Spenderinnen mit einer durchschnittlichen Zellzahl von $4,4 \times 10^4$ (p-Wert 0,071). Im zweiten Zeitraum lag die durchschnittliche Zellzahl der HCMV-seropositiven Spenderinnen mit $6,4 \times 10^4$ signifikant über der Zellzahl der HCMV-seronegativen Spenderinnen mit $2,1 \times 10^4$ (p-Wert 0,005). Die fehlende Signifikanz im ersten Zeitraum lässt sich durch eine zu kleine Datenmenge bei Werten der HCMV-seronegativen Spenderinnen erklären. Wie einleitend erwähnt nehmen viele Faktoren auf die Zusammensetzung und Zellverteilung der Muttermilch Einfluss (Hassiotou et al., 2013; Riskin et al., 2012). Der HCMV-Serostatus sowie die damit verbundene Reaktivierung scheinen nach den von uns erhobenen Daten ebenfalls einen möglichen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung der Muttermilch während der Laktation zu nehmen.

Im Vergleich zweier Spenderinnen mit unterschiedlichem HCMV-Serostatus zeigte sich eine Art Kinetik der Zellzahl ähnlich zur beschriebenen Kinetik der HCMV-Reaktivierung (Maschmann et al., 2015) mit einer maximalen Zellzahl am 22. Tag post partum von $2,0 \times 10^5$. Im selben Zeitraum konnte durch Maschmann et al. die höchste Viruskonzentration mittels quantitativer PCR in zell-freier Molke nachgewiesen werden. Ob die Erhöhung der Zellzahl eine Reaktion auf eine steigende Virusmenge darstellt oder ob die Erhöhung der Virusmenge

durch die steigende Migration von Zellen in die Muttermilch bedingt ist, ist weiterhin unklar und sollte Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein.

4.2.2 Charakterisierung von Muttermilchzellen mittels Färbung

Bereits 1999 wurden zur Charakterisierung von Muttermilchzellen diese mittels Panoptischer Färbung nach Pappenheim nach Cytozentrifugation angefärbt (Järvinen et al., 1999). Eine spezifische Darstellung einzelner Muttermilchzellen von stillenden Müttern von Frühgeborenen < 1000g Geburtsgewicht und Gestationsalter < 30. Woche erfolgte erstmals in der Abteilung für medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen mittels alpha-Naphthylacetat-Esterase Färbung (Hamprecht et al., 2000) zur Darstellung von myelomonozytären Zellen der Muttermilch. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten die für die Muttermilch typischen lipidhaltigen Vakuolen in Muttermilchzellen dargestellt werden. Die Anzahl korreliert mit dem Lipidgehalt des umliegenden Milieus und ist Tages und Laktationszeitpunkts anhängig. Bei fortschreitender Laktation und erhöhtem Lipidgehalt der Muttermilch zeigen auch die Muttermilchzellen vermehrte Mengen an lipidhaltigen Vakuolen im Zytoplasma. Dabei zeigten nicht nur zur Phagozytose fähige Zellen wie Monozyten/Makrophagen einen hohen Anteil an lipidhaltigen Vakuolen, sondern ebenso unterschiedliche Subtypen von Granulozyten und vereinzelt Lymphozyten, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß. Weiterhin zeigen myelomonozytäre Zellen in Muttermilch eine große morphologische Divergenz.

Die mikroskopische Analyse der vorliegenden Arbeit zeigte einen Abfall der myelomonozytären Zellen in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen im Verlauf der Laktation bei steigender Anzahl an Granulozyten. Dies steht konträr zu früheren Analysen, in denen eine umgekehrte Dynamik mit steigender Monozyten- und fallender Granulozytenzahl beschrieben wurde (Maschmann et al., 2015). Es ist jedoch anzumerken, dass die mikroskopische Auswertung im Vergleich zu objektiveren Verfahren wie der Durchflusszytometrie Fehler behaftet ist und die Unterscheidung der Muttermilchzellen durch ihre starke Heterogenität erschwert. Auf Grund dieser Faktoren diente die mikroskopische Analyse vor allem der Zellzählung sowie der morphologischen Darstellung von Muttermilchzellen, während eine genauere Analyse der Muttermilchzellsubpopulationen im Rahmen dieser Dissertation mittels durchflusszytometrischer Verfahren erfolgte.

4.2.3 Durchflusszytometrische Analyse

Im Gegensatz zu etablierten Methoden der durchflusszytometrischen Analyse von Blutzellen stellte die Analyse von Muttermilchzellen auf Grund der fluktuierenden

Milchzellzusammensetzung und Antikörperexpression der Milchzellen eine Herausforderung dar. Die gleichzeitige tägliche Analyse von PBMCs eines festgelegten Kontrollspenders gewährleistete die Validierung der erhobenen cytofluorimetrischen Muttermilchzell-Daten.

Während in früheren Studien vor allem auf einzelne Subpopulationen mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen eingegangen wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf eine allgemeine Immunzellsignatur in Muttermilch mittels der Leukozytenhauptpopulationen (CD45+) gelegt und die Veränderung dieser während der Laktation sowie unter dem möglichen Einfluss des HCMV-serostatus und der HCMV-Reaktivierung in Muttermilch.

So konnten neben der allgemeinen Leukozytenpopulation mittels des Oberflächenmarkers CD45 Granulozyten, T- und B-Zellen, natürliche Killerzellen sowie NKlike-T-Zellen und klassische sowie nicht-klassische Monozyten/Makrophagen detektiert werden. Die HLA-DR-Expression als Marker für den Aktivierungszustand und die Antigenpräsentation der Zellen komplettierte das Leukozyten-Panel. Wie bereits 1994 postuliert zeigte sich die HLA-DR-Expression vor allem auf klassischen Monozyten/Makrophagen als sehr hoch (Rivas et al., 1994). Daraus wurde gefolgert, dass die Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation im Gastrointestinaltrakt der Säuglinge spielen. Doch auch T- und B-Zellen zeigten eine hohe HLA-DR-Expression, welche in den Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen ausgeprägter war, als in Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen. Eine mögliche Erklärung wäre die bereits intramammäre Hochregulation der Leukozytenpopulation als Reaktion der lokalen HCMV-Reaktivierung. Die hohe HLA-DR-Expression stellte in manchen Proben ein Problem durch Überschreiten der oberen Detektionsgrenze dar, weshalb in folgenden Untersuchungen eine geringere Menge HLA-DR-Antikörper verwendet werden sollte. Die Orientierung an Färbeprotokollen von Blutzellen führt bei Milchzellen zu einer zu hohen Expression.

Das Hauptaugenmerk in der durchflusszytometrischen Analyse lag auf der Veränderung der Immunzellsignaturen der Spenderinnen im Verlauf der Laktation in Relation zum HCMV-Serostatus. Es zeigte sich eine tendenzielle, nicht signifikante Veränderung für die Gesamtleukozytenpopulation, welche in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen zum zweiten Zeitpunkt im Vergleich zu Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen erhöht war. Trotz fallender Gesamtzellzahl im Verlauf der Laktation scheint es bei HCMV-seropositiven Spenderinnen einen Stimulus zu geben, in der Muttermilch auch nach dem 30. Tag post partum eine höhere Leukozytenzahl pro Milliliter nativer Muttermilch bereitzustellen. Eine

mögliche Erklärung wären die im Rahmen der HCMV-Reaktivierung bedingten Mechanismen, wie zum Beispiel der inflammatorische Shift wie für Chemokine gezeigt (Rabe et al., 2020). Zur genaueren Analyse dieses möglichen Zusammenhanges sollte ein deutlich größeres Kollektiv zusammengestellt werden. Hier sollte versucht werden über einen Zeitraum von mindestens 80 Tage post partum konsekutive Proben von HCMV-seropositiven wie –negativen Spenderinnen zu akquirieren.

B-Zellen stellten die am schwierigsten zu detektierende Subpopulation dar. Hier zeigte sich bei geringer Menge auch in der Gruppe der HCMV-seropositiven Spenderinnen zum zweiten Zeitraum ein Anstieg. Diese Zellen zeigten einen mittleren bis hohen Aktivierungszustand (HLA-DR positiv), welcher in Zellen HCMV-seronegativer Spenderinnen nicht oder nur gering auftrat. Anreiz zu dieser Differenzierung könnte erneut das Vorhandensein von HCMV intramammär sein.

Die prominentesten Veränderungen konnten an Monozyten/Makrophagen und T-Zellen gezeigt werden. Im zweiten Zeitraum stellten die T-Zellen mit über 30% in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen eine sehr große Gruppe mit deutlicher Zunahme im Vergleich des ersten Zeitraums und der korrespondierenden Gruppe der HCMV-seronegativen Spenderinnen. Eine durchschnittliche HLA-DR-Expression von zwischen 30 und 40% blieb über die Dauer der Laktation HCMV-Serostatus unabhängig nachzuweisen. Im Gegensatz zu den B-Zellen scheint im Verlauf der Laktation trotz steigender Anzahl in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen auf T-Zellen keine Hochregulation der Antigenpräsentation zu erfolgen. Der Vergleich der Leukozytensubpopulationen einer HCMV-seropositiven und –negativen Spenderin im Verlauf der Laktation zeigt eine anhaltend hohe Anzahl an T-Zellen bis zum 68. Tag post partum in der Probe der HCMV-seropositiven Spenderin. Zu diesem Zeitpunkt konnte weiterhin HCMV-DNA in der Molke nachgewiesen werden, was ein Trigger für die Persistenz hoher T-Zellmengen in Muttermilch darstellen könnte (Lazar et al., 2020; Rabe et al., 2020). Monozyten/Makrophagen zeigten in den vorherigen Studien einen prozentualen Abfall im Laufe der Laktation (Trend et al., 2015). Dies konnte in Proben der Gruppe HCMV-seropositiver Spenderinnen bestätigt werden, während in der Gruppe der HCMV-seronegativen Spenderinnen der prozentuale Anteil an CD14 positiven Monozyten/Makrophagen zunahm. In den Arbeiten von Hamprecht und Maschmann (Hamprecht et al., 2000; Maschmann et al., 2015) zeigte sich in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen ein temporärer Abfall der CD14 positiven Monozyten/Makrophagen Population zwischen dem 18. und 50. Tag post partum und ein darauffolgendes Ansteigen der

Monozyten/Makrophagen zur prominentesten Leukozytenpopulation. Eine mögliche Erklärung zu den unterschiedlichen Befunden könnte der Einfluss der HCMV-Reaktivierung sein. Der Abfall der CD14 positiven Monozyten/Makrophagen im zweiten Zeitraum welcher in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, deckt sich zeitlich mit der temporären Erniedrigung die durch Maschmann und Hamprecht beschrieben wurden sowie dem Nachweis von zellfreiem Virus lokal in der Muttermilch (Hamprecht et al., 2003). Ein Erklärungsansatz stellt die Hypothese dar, dass CD14 positive, aus Monozyten ausdifferenzierte, Makrophagen als Targetzelle für eine produktive HCMV-Infektion in Muttermilch dienen können und bei seropositiven Spenderinnen im Rahmen der Reaktivierung und der Virusreplikation infektiöse Viruspartikel freisetzen. Auch hier bedarf es einer größeren Datenmenge, welche den HCMV-Serostatus sowie den Gesamt-Zeitraum der Reaktivierung longitudinal erfasst.

Die t-SNE-Analyse der durchflusszytometrischen Daten, welcher alle 19 Proben zugeführt wurden, zeigte die Immunzellverteilung sowie ihre Beziehung zueinander an Hand der exprimierten Oberflächenmarker. Auch hier war deutlich die Verschiebung der Leukozytensubpopulationen während der Laktation, vor allem in Anbetracht des HCMV-Serostatus der Spenderin, zu erkennen. Die prominente Darstellung der HLA-DR positiven T-Zellen und HLA-DR positiven Monozyten im zweiten Zeitraum während der Reaktivierung von HCMV in Proben HCMV-seropositiver Spenderinnen, welche sich in den Proben HCMV-seronegativer Spenderinnen nicht zeigt, spricht für eine Aktivierung der vorhandenen Immunzellen, möglicherweise als Reaktion auf die durch Reaktivierung induzierte Präsenz des Virus in der Muttermilch. Ebenso konnten B-Zellen, welche in den Proben aller anderen 3 Zeiträume (Zeitraum 1 und 2 von HCMV-seronegativ und Zeitraum 1 bei HCMV-seropositiv) kaum nachweisbar waren, im zweiten Zeitraum von HCMV-seropositiven Spenderinnen in vermehrter Zahl nachgewiesen werden. Dies könnte wiederum zu Befunden von Lazar et al aus Nutrients 2020 passen, die zeigen konnten, dass spezifische HCMV neutralisierende IgG Antikörper im Rahmen der Virusreaktivierung nachweisbar waren (Lazar et al., 2020).

Gezeigt werden konnte also, dass jede Mutter eine individuelle Immunsignatur in Muttermilchzellen präsentiert, die vom Laktationszeitpunkt abhängig ist. Unsere Daten suggerieren, dass auch der HCMV-serostatus und die Reaktivierung in Muttermilch Einfluss auf diese Immunzellsignatur nehmen und verändern. In wie weit das als möglicher Ansatzpunkt zur gezielten Prävention der HCMV-Übertragung von Mutter auf Säugling genutzt werden kann (Bapistella et al., 2019), sollte ein Teil weiterer Arbeiten sein. Ebenso ist

zu diskutieren, in wie weit sich die veränderte Immunzellsignatur der Muttermilch (Lazar/Kussmann *et al.*, 2021) auf das werdende Immunsystem des Säuglings auswirkt.

4.2.4 Muttermilchzell-Analyse mittels ImageStream

Zur Untersuchung von Muttermilchzellen mittels ImageStream gibt es bisher in der Literatur keine Daten. Die Kombination von Durchflusszytometrie und mikroskopischer Darstellung ermöglicht einerseits die Verifizierung der konventionell durchflusszytometrischen Daten, da mittels Auflichtbild das gemessene Ereignis nicht nur anhand seiner Antikörperexpression und -dichte sondern auch durch das morphologische Bild als Einzelzelle identifiziert werden kann. Andererseits kann das Untersuchungsspektrum der Muttermilch erweitert werden indem auch Zellen ohne Antikörperexpression visualisiert sowie Kleinstbestandteile der Muttermilch nach Antikörperexpression untersucht werden können. So konnten in der normalerweise aus dem Gating entfernten Population des „Trash“ Bakterien unterschiedlicher Art und Zellbestandteile mit Expression von CD326 identifiziert werden, welche Zellabschnürungen der apokrin tätigen Laktozyten darstellen. Laktozyten konnten mittels ImageStream auch in Einzelzellen der Muttermilch dargestellt werden (Lazar/Kussmann *et al.*, 2021). Ob diese durch die regelmäßige Erneuerung des Milchdrüsenepithels in die Milch ausgeschieden werden oder ob sie eine spezifische Funktion nach Digestion des Säuglings übernehmen ist unklar. Ebenfalls ihre Funktion in der Reaktivierung von HCMV während der Laktation.

Die Visualisierung der Muttermilchzellen sowie der Verteilung der Antikörperexpression eröffnet neue Wege zur Darstellung und Unterscheidung unterschiedlicher Zellgruppen und stellt sicher auch eine Möglichkeit dar, die momentan viel untersuchte Subgruppen, wie Stammzellen, näher zu untersuchen (Lazar/Kussmann *et al.*, 2021). Die bislang durchgeführten, präliminären Analysen zeigen, dass eine Untersuchung von Muttermilchleukozyten-Subpopulationen nach spezifischer Anpassung an die Besonderheiten der Analyse von Muttermilch möglich ist und zu interessanten neuen Aspekten der Immunzellsignatur in Muttermilch führen können. Da in der konventionellen Durchflusszytometrie manche Gruppen auf Grund zu geringerer Werte exkludiert werden müssen, da sie nicht sicher identifiziert werden können, ermöglicht das ImageStream durch die Visualisierung jedes einzelnen Zähl-Ereignisses dieses mittels ihrer Antikörperexpression cytofluorimetrisch zu identifizieren. Nachfolgende Studien mit engmaschigen longitudinalen Analysen im Kontext der HCMV-Reaktivierung werden gerade auch kleine Subpopulationen mittels ImageStream darstellbar machen.

5 Zusammenfassung

Muttermilch als optimale Versorgung des Neugeborenen stellt durch die hohe Exkretion von humanem Cytomegalievirus die Hauptinfektionsquelle von Säuglingen dar. Obwohl in früheren Studien immer wieder die Reaktivierung sowie der Zelltropismus von HCMV untersucht wurden, ist bis heute der Ort der HCMV Persistenz und Reaktivierung in Muttermilch weitgehend unbekannt. In den letzten Jahren wurde die Kinetik der HCMV-Reaktivierung in Muttermilch weiter erforscht. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine hohe Rate an humanen Zytomegalieviren in Muttermilch bei HCMV-seropositiven Spenderinnen erfolgen, welche der Kinetik von Maschmann beschrieben folgt (Maschmann et al., 2015). Trotz allgemeiner Kinetik ist der Verlauf der Reaktivierung mit Erstdurchweis von HCMV sowohl in zellfreier Molke als auch in Milchzellen intraindividuell unterschiedlich.

Die zelluläre Zusammensetzung von Muttermilch zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit individuell spezifisch und Laktationszeitpunkt abhängig. Die morphologische Darstellung aller Zellen mittels Panoptischer Färbung nach Pappenheim sowie spezifisch von Monozyten/Makrophagen mittels alpha-Naphthylacetatesterase-Färbung zeigte typische Unterschiede von Milchzellen zu Blutzellen. Die charakteristischen lipidhaltigen Vakuolen in phagozytosefähigen Zellen, welche im Verlauf der Laktation zunahmten, sind in Muttermilch ebenso einzigartig, wie die schwankende Zellgröße einzelner Zellen, vor allem von Monozyten/Makrophagen. Die Untersuchung von Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie lieferte eine eindeutige Immunsignatur jeder Spenderin zu einem spezifischen Laktationszeitpunkt. Im Vergleich der Muttermilchzellen und Immunzellensignaturen von HCMV-seronegativen zu HCMV-seropositiven Spenderinnen fanden sich prominente Unterschiede. HCMV-seropositive Spenderinnen zeigten im Verhältnis zu HCMV-seronegativen Spenderinnen eine durchschnittlich deutlich erhöhte Zellzahl über den gesamten Verlauf der Laktation. Es zeigte sich weiterhin, dass um den Zeitpunkt der HCMV-Reaktivierung die Zellzahl stark anstieg. Im Verlauf der Laktation waren antigenpräsentierende Zellen wie T-Zellen und Makrophagen vor allem bei HCMV-seropositiven Spenderinnen prominent. Die Gesamtzahl der Monozyten/Makrophagen fiel in den durchflusszytometrischen Untersuchungen bei HCMV-seropositiven Spenderinnen signifikant ab. Die fortlaufende Analyse einer HCMV-seropositiven Mutter zeigte, dass der Abfall der Monozyten/Makrophagen womöglich nur ein temporäres Absinken während dem Maximum der HCMV-Reaktivierung darstellt und im Verlauf, wie teilweise in früheren Studien ersichtlich, wieder ansteigt. Eine mögliche Erklärung könnte die Lyse von infizierten Monozyten/Makrophagen im Rahmen der Virusreplikation und Exkretion darstellen. Dies

würde präliminäre Befunde, dass Monozyten/Makrophagen der Ort der Viruspersistenz und -vermehrung darstellen unterstützen (Maschmann et al., 2015). Möglicher Ansatzpunkt folgender Studien könnte die separate Analyse dieser Zellpopulation auf Vorliegen von HCMV darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Milchzellen mittels ImageStream-Verfahren untersucht. Muttermilchbestandteile konnten so mittels Auflichtbild identifiziert werden und Muttermilchzellen anhand ihrer Antikörperexpression mittels Zytofluorometrie in klare Subpopulationen unterschieden werden. Dies ergänzt und erweitert die klassische Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie. Weiterhin bietet dieses Verfahren neue Möglichkeiten auch Subpopulationen mit geringer Größe zu untersuchen und auf Grund ihrer Morphologie und der Antikörperverteilung ihrer Oberfläche zu kategorisiert.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, das Kompartiment Muttermilch während der Laktation besser analysieren zu können sowie den möglichen Einfluss von HCMV auf die zelluläre Zusammensetzung der Muttermilch, den Ort der Persistenz und Übertragungswege auf den Säugling zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- Armstrong, J., & Reilly, J. J. (2002). Breastfeeding and lowering the risk of childhood obesity. *Lancet*, 359(9322). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08837-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08837-2)
- Bapistella, S., Hamprecht, K., Thomas, W., Speer, C. P., Dietz, K., Maschmann, J., Poets, C. F., & Goelz, R. (2019). Short-term Pasteurization of Breast Milk to Prevent Postnatal Cytomegalovirus Transmission in Very Preterm Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 69(3), 438–444. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy945>
- Barbi, M., Binda, S., Primache, V., Caroppo, S., Didò, P., Guidotti, P., Corbetta, C., & Melotti, D. (2000). Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: A powerful tool for diagnosing congenital infection. *Journal of Clinical Virology*, 17(3). [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(00\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(00)00089-5)
- Boix-Amorós, A., Collado, M. C., & Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>
- Bolovan-Fritts, C. A., Mocarski, E. S., & Wiedeman, J. A. (1999). Peripheral blood CD14+ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood*, 93(1). https://doi.org/10.1182/blood.v93.1.394.401k44_394_398
- Bundesministeriums für Gesundheit. (2018). Humanes Cytomegalievirus (HCMV): Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(1), 116–128. <https://doi.org/10.1007/s00103-017-2661-3>
- Buts, J. P. (1998). -Bioactive factors in milk-. *Archives de Pédiatrie : Organe Officiel de La Société Française de Pédiatrie*, 5(3).
- Cabinian, A., Sinsimer, D., Tang, M., Zumba, O., Mehta, H., Toma, A., Sant'Angelo, D., Laouar, Y., & Laouar, A. (2016). Transfer of maternal immune cells by breastfeeding: Maternal cytotoxic t lymphocytes present in breast milk localize in the peyer's patches of the nursed infant. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156762>
- Cregan, M. D., Fan, Y., Appelbee, A., Brown, M. L., Klopčič, B., Koppen, J., Mitoulas, L. R., Piper, K. M. E., Choolani, M. A., Chong, Y. S., & Hartmann, P. E. (2007). Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell and Tissue Research*, 329(1). <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0390-x>
- De Vries, J. J. C., Vossen, A. C. T. M., Kroes, A. C. M., & Van Der Zeijst, B. A. M. (2011). Implementing neonatal screening for congenital cytomegalovirus: Addressing the deafness of policy makers. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/rmv.679>
- Diedrich, K. (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe* (W. Holzgreve, W. Jonat, K.-T. M. Schneider, & J. . Weiss (eds.)). Springer.
- Diosi, P., Babusceac, L., Nevinglovschi, O., & Kun-Stoicu, G. (1968). Cytomegalovirus infection associated with pregnancy. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 23(6). <https://doi.org/10.1097/00006254-196806000-00014>

- Dollard, S. C., Grosse, S. D., & Ross, D. S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, *17*(5). <https://doi.org/10.1002/rmv.544>
- Donne, A. (1845). *Cours de microscopie. Text and atlas*. Bailliere.
- Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R. F., & Alford, C. (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, *72*(3).
- Eggers, M., Radsak, K., Enders, G., & Reschke, M. (2001). Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *Journal of Medical Virology*, *63*(2). [https://doi.org/10.1002/1096-9071\(20000201\)63:2<135::AID-JMV1008>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1096-9071(20000201)63:2<135::AID-JMV1008>3.0.CO;2-P)
- Enders, G., Daiminger, A., Bäder, U., Exler, S., & Enders, M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *Journal of Clinical Virology*, *52*(3). <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.005>
- Enders, G., Daiminger, A., Lindemann, L., Knotek, F., Bäder, U., Exler, S., & Enders, M. (2012). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996-2010. *Medical Microbiology and Immunology*, *201*(3). <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0232-7>
- Farber, S., & Wolbach, S. B. (1932). Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions (“Protozoan-Like Bodies”) in the Salivary Glands and Other Organs of Infants. *The American Journal of Pathology*, *8*(2), 123-136.3.
- Furui, Y., Satake, M., Hoshi, Y., Uchida, S., Suzuki, K., & Tadokoro, K. (2013). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion*, *53*(10). <https://doi.org/10.1111/trf.12390>
- Goelz, R., Hihn, E., Hamprecht, K., Dietz, K., Jahn, G., Poets, C., & Elmlinger, M. (2009). Effects of different CMV-heat-inactivation-methods on growth factors in human breast milk. *Pediatric Research*, *65*(4). <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181991f18>
- Goldman, A. S. (1993). The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *12*(8), 664–672.
- Goodrum, F. D., Jordan, C. T., High, K., & Shenk, T. (2002). Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: A model for latency. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, *10*;99(25), 16255–16260. <https://doi.org/10.1073/pnas.252630899>
- Hamprecht, K., & Goelz, R. (2022). *Vertikale CMV-Transmission: Epidemiologie und Diversität der Übertragungsmuster sowie Therapieoptionen*.
- Hamprecht, K., & Jahn, G. (2007). Humanes Cytomegalievirus und kongenitale Infektion. *Bundesgesundheitsblatt*, *50*, 1379–1392.
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Jahn, G., Poets, C., & Goelz, R. (2008). Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *Journal of Clinical Virology*, *41*(3),

198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.12.005>.

- Hamprecht, K., Maschmann, J., Müller, D., Dietz, K., Besenthal, I., Goelz, R., Middeldorp, J. M., Speer, C. P., & Jahn, G. (2004). Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatric Research*, *56*(4). <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000139483.35087.BE>
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C. P., & Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*, *17*;357(9255), 513–518. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04043-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04043-5)
- Hamprecht, K., Vochem, M., Baumeister, A., Boniek, M., Speer, C. P., & Jahn, G. (1998). Detection of cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR. *Journal of Virological Methods*, *70*(2). [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00179-1)
- Hamprecht, K., Witzel, S., Maschmann, J., Dietz, K., Baumeister, A., Mikeler, E., Goelz, R., Speer, C. P., & Jahn, G. (2003). Rapid detection and quantification of cell free cytomegalovirus by a high-speed centrifugation-based microculture assay: Comparison to longitudinally analyzed viral DNA load and pp67 late transcript during lactation. *Journal of Clinical Virology*, *28*(3). [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00074-X](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00074-X)
- Hamprecht, K., Witzel, S., Maschmann, J., & Jahn, G. (2000). Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants. The role of cell free milk whey and milk cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *478*, 231–239.
- Hanson, L. A. (2000). The mother-offspring dyad and the immune system. In *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* (Vol. 89, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2000.tb01325.x>
- Hanson, L. Å. (1998). Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. In *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* (Vol. 81, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62704-4](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62704-4)
- Hanson, L., Hahn-Zoric, M., Berndes, M., Ashraf, R., Herias, V., Jalil, F., Bhutta, T. I., Laeeq, A., & Mattsby-Baltzer, I. (1994). Breast feeding: Overview and breast milk immunology. *Pediatrics International*, *36*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.1994.tb03246.x>
- Hassiotou, F., Beltran, A., Chetwynd, E., Stuebe, A. M., Twigger, A. J., Metzger, P., Trengove, N., Lai, C. L., Filgueira, L., Blancafort, P., & Hartmann, P. E. (2012). Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells*, *30*(10). <https://doi.org/10.1002/stem.1188>
- Hassiotou, F., Heath, B., Ocal, O., Filgueira, L., Geddes, D., Hartmann, P., & Wilkie, T. (2014). Breastmilk stem cell transfer from mother to neonatal organs (216.4). *FASEB J*, *28*(1_Supplement).
- Hassiotou, F., Hepworth, A. R., Metzger, P., Tat Lai, C., Trengove, N., Hartmann, P. E., & Filgueira, L. (2013). Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical and Translational Immunology*, *2*(4), e3-10. <https://doi.org/10.1038/cti.2013.1>

- Hayes, K., Danks, D., Gibas, H., & Jack, I. (1972). Cytomegalovirus in human milk. *N Engl J Med*, 27(287(4)), 177–178. <https://doi.org/10.1056/NEJM197207272870407>
- Hinde, K., & German, J. B. (2012). Food in an evolutionary context: Insights from mother's milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11). <https://doi.org/10.1002/jsfa.5720>
- Hotsubo, T., Nagata, N., Chiba, S., Shimada, M., Yoshida, K., & Fujinaga, K. (1994). Detection of Human Cytomegalovirus DNA in Breast Milk by Means of Polymerase Chain Reaction. *Microbiology and Immunology*, 38(10). <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1994.tb01862.x>
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., & Mizunoe, Y. (2010). Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 465(7296). <https://doi.org/10.1038/nature09074>
- Jahn, G., Scholl, B. C., Traupe, B., & Fleckenstein, B. (1987). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *Journal of General Virology*, 68(5). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-5-1327>
- Jain, L., Vidyasagar, D., Xanthou, M., Ghai, V., & Shimada, S. (1989). In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. *Archives of Disease in Childhood*, 64(7 SPEC NO), 930–933. https://doi.org/10.1136/adc.64.7_Spec_No.930
- Järvinen, K., Juntunen-Backman, K., & Suomalainen, H. (1999). Relation between weak HLA-DR expression on human breast milk macrophages and cow milk allergy (CMA) in suckling infants. *Pediatr Res*, 45(1), 76–81. <https://doi.org/10.1203/00006450-199901000-00013>
- Kenneson, A., & Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/rmv.535>
- Krech, U. (1973). Complement fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bulletin of the World Health Organization*, 49(1).
- Lachmann, R., Loenenbach, A., Waterboer, T., Brenner, N., Pawlita, M., Michel, A., Thamm, M., Poethko-Müller, C., Wichmann, O., & Wiese-Posselt, M. (2018). Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS ONE*, 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200267>
- Lamberson, H. V., & Dock, N. L. (1992). Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. In *Transfusion* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1992.32392213798.x>
- Langa, S., Maldonado-Barragán, A., Delgado, S., Martín, R., Martín, V., Jiménez, E., Ruiz-Barba, J. L., Mayo, B., Connor, R. I., Suárez, J. E., & Rodríguez, J. M. (2012). Characterization of Lactobacillus salivarius CECT 5713, a strain isolated from human milk: From genotype to phenotype. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(5). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4032-1>
- Lanzieri, T. M., Dollard, S. C., Josephson, C. D., Schmid, S., & Bialek, S. R. (2013). Breast milk-acquired cytomegalovirus infection and disease in VLBW and premature infants. In

- Larsson, S., Söderberg-Nauclér, C., & Möller, E. (1998). Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: Implications for prevention of CMV transmission. *Transplantation*, *65*(3). <https://doi.org/10.1097/00007890-199802150-00021>
- Lazar, K., Kussmann, T., Pawelec, G., Pöschel, S., Goelz, R., Hamprecht, K., & Wistuba-Hamprecht, K. (2021). Immunomonitoring of Human Breast Milk Cells During HCMV-Reactivation. *Frontiers in Immunology*, *12*(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.723010>
- Lazar, K., Rabe, T., Goelz, R., & Hamprecht, K. (2020). Human cytomegalovirus reactivation during lactation: Impact of antibody kinetics and neutralization in blood and breast milk. *Nutrients*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/nu12020338>
- Mandell, G., Benett, J., & Dolin, R. (2010). *Principles and practice of infectious diseases* (7th Editio). Churchill Livingstone/Elsevier.
- Maschmann, J., Goelz, R., Witzel, S., Strittmatter, U., Steinmassl, M., Jahn, G., & Hamprecht, K. (2015). Characterization of human breast milk leukocytes and their potential role in cytomegalovirus transmission to newborns. *Neonatology*, *107*(3), 213–219. <https://doi.org/10.1159/000371753>
- Meier, J., Lienicke, U., Tschirch, E., Krüger, D. H., Wauer, R. R., & Prösch, S. (2005). Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(3). <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1318-1324.2005>
- Meyer-König, U., Serr, A., Von Laer, D., Kirste, G., Wolff, C., Haller, O., Neumann Haefelin, D., & Hufert, F. T. (1995). Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: diagnostic value in renal transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases*, *171*(3). <https://doi.org/10.1093/infdis/171.3.705>
- Modrow, S., & Falke, D. (1998). *Molekulare Virology*. Springer Verlag.
- Mussi-Pinhata, M., Isaac, M. D. L., Carvalho, P. F. De, Boppana, S., & Britt, W. J. (2010). Birth Prevalence and Natural History of Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection in a Highly Seroimmune Population. *Clinical Infectious Diseases*, *49*(4), 522–528. <https://doi.org/10.1086/600882>. Birth
- Mussi-pinhata, M. M., Yamamoto, A. Y., Aragon, D. C., Duarte, G., Fowler, K. B., Boppana, S., & Britt, W. J. (2018). Seroconversion for Cytomegalovirus Infection During Pregnancy and Fetal Infection in a Highly Seropositive Population : “The BraCHS Study .” *Journal of Infectious Diseases*, *218*, 1200–1204. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy321>
- Neumeister, B., Geiss, H., & Braun, R. (2009). *Mikrobiologische Diagnostik*. Thieme Verlag.
- Papanicolaou, G. N., Bader, G. M., Holmquist, D. G., & Falk, E. A. (1956). Cytologic evaluation of breast secretions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *63*(6), 1409–1421. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1956.tb32146.x>
- Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., & Bhonde, R. (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human Cell*, *23*(2), 35–40.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2010.00083.x>

- Paxson, C. L., & Cress, C. C. (1979). Survival of human milk leukocytes. *The Journal of Pediatrics*, *94*(1). [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(79\)80352-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(79)80352-2)
- Rabe, T., Lazar, K., Cambroner, C., Goelz, R., & Hamprecht, K. (2020). Human cytomegalovirus (HCMV) reactivation in the mammary gland induces a proinflammatory cytokine shift in breast milk. *Microorganisms*, *8*(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020289>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, *2*(4). <https://doi.org/10.1038/86373>
- Riskin, A., Almog, M., Peri, R., Halasz, K., Srugo, I., & Kessel, A. (2012). Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatric Research*, *71*(2). <https://doi.org/10.1038/pr.2011.34>
- Rivas, R., El-Mohandes, A., & Katona, I. (1994). Mononuclear phagocytic cells in human milk: HLA-DR and Fc gamma R ligand expression. *Biol Neonate*, *66*(4), 195–204. <https://doi.org/10.1159/000244108>
- Sinclair, J., & Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. In *Journal of General Virology* (Vol. 87, Issue 7). <https://doi.org/10.1099/vir.0.81891-0>
- Smith, C. W., & Goldman, A. S. (1968). The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions. *Pediatric Research*, *2*(2). <https://doi.org/10.1203/00006450-196803000-00005>
- Smith, M. G. (1956). Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *92*(2). <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22498>
- Speer, C. H., & Hein-Kreikenbaum, H. (1993). IMMUNOLOGISCHE BEDEUTUNG DER MUTTERMILCH. In *Monatsschrift für Kinderheilkunde* (Vol. 141, Issue 1).
- Srivastava, M., Srivastava, A., Brouhard, B., Saneto, R., Groh-Wargo, S., & Kubit, J. (1996). Cytokines in human milk. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, *93*(3), 263–287.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J. G. P., Borysiewicz, L. K., & Sinclair, J. H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of General Virology*, *72*(9). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-9-2059>
- Trend, S., De Jong, E., Lloyd, M. L., Kok, C. H., Richmond, P., Doherty, D. A., Simmer, K., Kakulas, F., Strunk, T., & Currie, A. (2015). Leukocyte populations in human preterm and term breast milk identified by multicolour flow cytometry. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135580>
- Van De Perre, P. (2003). Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*, *28*; *21*(24), 3374–3376. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00336-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00336-0)
- Victora, C. G., Horta, B. L., de Mola, C. L., Quevedo, L., Pinheiro, R. T., Gigante, D. P., Gonçalves, H., & Barros, F. C. (2015). Association between breastfeeding and

- intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: A prospective birth cohort study from Brazil. *The Lancet Global Health*, 3(4).
[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(15\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(15)70002-1)
- Vochem, M., Hamprecht, K., Jahn, G., & Speer, C. P. (1998). Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 17(1). <https://doi.org/10.1097/00006454-199801000-00012>
- Witkowska-Zimny, M. (2017). *Cells of human breast milk*. 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
- Xanthou, M., Bines, J., & Walker, W. A. (1995). Human milk and intestinal host defense in newborns: an update. In *Advances in pediatrics* (Vol. 42).
- Zhou, L., Yoshimura, Y., Huang, Y. Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., Okabe, M., & Shimamura, M. (2000). Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: Through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology*, 101(4). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00144.x>

7 Erklärung zum Eigenanteil der Disertationsschrift

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Apl Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit durch Apl Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht und mich in Zusammenarbeit mit Dr. med. Rangmar Götz der Abteilung Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen und Dr. rer. Nat. Kilian Wistuba-Hamprecht aus der Abteilung II der Inneren Medizin des Universitätsklinikums Tübingen.

Die Akquirierung der Muttermilchproben, die Zellaufbereitung, Isolation der Milchzellen sowie mikroskopischen Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die fortlaufenden Testungen zum Virusnachweis von HCMV aus Molke und Zellen erfolgten im Rahmen der Routine-Diagnostik der AG Hamprecht des Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen.

Die durchflusszytometrische Färbung jeder in der Studie aufgenommenen Probe wurde, nach Einweisung, von mir selbstständig durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Messungen am FACS-Gerät aller Proben erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Kilian Wistuba-Hamprecht. Die Analyse der gewonnenen Daten sowie die in der Arbeit gezeigten Abbildungen wurden, ebenfalls nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Kilian Wistuba-Hamprecht, selbstständig von mir durchgeführt.

Die Färbung der Muttermilchzellen für die ImageStream-Analyse erfolgte äquivalent zur Durchflusszytometrie ebenfalls durch mich. Die Durchführung am ImageStream-Gerät erfolgte unter initialer Anleitung von Simone Pöschel in der „Imaging Flow Cytometry Core Facility“ der medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Leitung von PD Dr. Stella Autenrieth. Die für das ImageStream angepasste Gating-Strategie wurde von Frau Pöschel, Dr. rer. nat. Kilian Wistuba-Hamprecht und mir gleichermaßen festgelegt. Die Analyse der erhobenen Daten sowie die Gestaltung der Abbildungen erfolgte wiederum eigenständig durch mich.

Die gesamte statistische Auswertung aller erhobenen Daten erfolgte eigenständig durch mich.

In der Publikation ‘Immunomonitoring of Human Breast Milk Cells During HCMV-Reactivation’, in *Frontiers in Immunology*, welche in Ko-Autorenschaft mit Frau Katrin Lazar erstellt wurde, wurden die Rohdaten dieser Dissertation verwendet und mit den Daten, welche durch Frau Lazar erhoben wurden, verbunden. Es wurden keine einzelnen Ergebnisse oder Abschnitte dieser Dissertation in der oben genannten Publikation veröffentlicht. Die von Frau Lazar erhobenen Daten sind kein Bestandteil dieser Dissertation.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 16.05.2024

Thorsten Volkmar Kussmann

8 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

- Posterpräsentation auf der 27. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie
22. bis 25. März 2017 in Marburg
Titel - „Characterization of human milk cells and the role of CD14+ monocytes in HCMV cell-associated transmission during lactation”
- Vortrag vor dem Arbeitskreis Klinische Virologie, Schloss Zeilitzheim, Okt. 2017
Titel – “Characterization of leucocyte subpopulations in human breast milk during HCMV reactivation”
- Abschlusspräsentation im Kolloquium des Instituts für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen 2017
Titel – “Characterization of leucocyte subpopulations in human breast milk during HCMV reactivation”
- Geteilte Erstautorenschaft in folgender Publikation:
Lazar, K., Kussmann T., *et al.* (2021) ‘Immunomonitoring of Human Breast Milk Cells During HCMV-Reactivation’, *Frontiers in Immunology*, 12(September), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2021.723010.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung. Ich bin sehr Dankbar für jeden Rat und jede Hilfe, für allzeit ein offenes Ohr und den langen Atmen im Verlauf dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe der medizinischen Virologie unter Prof. Hamprecht möchte ich danken für die Einführung in die Geräte und Unterstützung bei der Durchführung der Virusaufbereitung und Analysen.

Einen großen Dank möchte ich an Dr. rer. Nat. Kilian Wistuba-Hamprecht aus der Abteilung II der Inneren Medizin des Universitätsklinikums Tübingen richten für eine herausragende Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der gesamten durchflusszytometrischen Analyse sowie des ImageStreams.

Die Anleitung und Durchführung des ImageStreams gelang Dank Simone Pöschel der Core Facility des Universitätsklinikums Tübingen unter Prof. Katja Schenke-Layland, hierfür vielen Dank.

Ich danke ebenso Herrn Dr. med. Rangmar Gölz und dem Team der Abteilung Neonatologie des Universitätsklinikums Tübingen bei der Akquirierung der Spenderinnen und Muttermilchproben.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des IZKF Promotionskollegs der Eberhard Karls Universität Tübingen erstellt (PK 2015-2-27).