Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde IV mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Ch. F. Poets

Vergleichende Untersuchungen zur Produktion und Wirkung von IFN-γ, IL-12, IL-18 und IL-10 im Nabelschnurblut und im Blut vom gesunden Erwachsenen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Lena Johanna Tewes
aus
Herdecke a. d. Ruhr

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. Ch. F. Poets
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. B. Neumeister

Geschrieben steht: „Im Anfang war das Wort!“
Hier stock ich schon! Wer hilft mir fort?
Ich kann das Wort so hoch unmöglich schätzen,
ich muß es anders übersetzen.

Wenn ich vom Geiste recht erleuchtet bin,
geschrieben steht: Im Anfang war der Sinn.
Bedenke wohl die erste Zeile,
daß Deine Feder sich nicht übereile!
Ist es der Sinn, der alles wirkt und schafft?
Es sollte stehn: Im Anfang war die Kraft.

Doch, auch indem ich dieses niederschreibe,
schon warnt mich was, daß ich nicht dabei bleibe.
Mir hilft der Geist! Auf einmal seh´ ich Rat
Und schreib getrost: Im Anfang war die Tat!

J. W. von Goethe, Faust

FÜR MEINE ELTERN,

ANNE UND CHRISTOPH

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1 Das Immunsystem des Neugeborenen und des Erwachsenen 1

1.2 T-Lymphozyten 2

1.3 Makrophagen: Professionelle Antigenpräsentierende Zellen 5

1.4 T-Zellaktivierung durch APC 7

1.5 Rezeptoren der B7-Familie 9

1.6 Zytokine 10

1.6.1 IFN-γ 10

1.6.2 IL-12 11

1.6.3 IL-18 11

1.6.4 IL-10 12

1.7 Hypothesen und Vorgehen 13

2. MATERIAL 15

2.1 Zellen 15

2.2 Materialien biologischen Ursprungs 15

2.3 Materialien nichtbiologischen Ursprungs 16

2.4 Enzymimmunoassay 17

2.5 Antikörper für die Durchflußzytometrie 17

2.6 mRNA-Messung 17

2.7 Glas- und Plastikmaterial 18

2.8 Geräte 18

3. METHODEN 20

3.1 Gewinnung von MNC aus Vollblut 20

3.2 Suspensionszellkulturen von MNC 21

3.3 Enzymimmunoassay (EIA) 22

3.3.1 Prinzip des EIA am Beispiel von IL-12 22

3.3.2 Bestimmung von IFN-γ, IL-12 oder IL-10 23

3.3.3 Bestimmung von IL-18 25

3.4 Immunphänotypisierung mittes Durchflußzytometrie 26

3.4.1 Prinzip der Durchflußzytometrie 26

3.4.2 Färbung, Messung und Auswertung der Immunfluoreszenz .. 27

3.4.3 Bestimmung der T-Zell- und Blastenzahl 28

3.5 Messung der Zytokin-mRNA 28

3.5.1 RNA-Extraktion 28

3.5.2 Umschreibung der RNA in cDNA 29

3.5.3 LightCycler PCR 30

4. ERGEBNISSE 34

4.1 Zytokinproduktion im Vergleich zwischen PB und NSB 34

4.1.1 IFN-γ-Produktion 34

4.1.2 IL-12(p40)-Produktion nach T-Zellstimulation 35

4.1.3 IL-18-Produktion nach T-Zellstimulation 36

4.1.4 IL-12(p40)- und IL-18-Produktion nach LPS-Stimulation 37

4.1.5 Interaktion zwischen IL-12 und IL-18 38

4.2 Induzierbarkeit der IFN-γ-Produktion durch IL-12 und IL-18 41

4.2.1 IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 41

4.2.2 IFN-γ-Produktion nach Stimulation von IL12, IL-18 und anti-CD3 43

4.3 Untersuchungen zur IL-10-Produktion 44

4.3.1 IL-10-Produktion nach T-Zellstimulation 44

4.3.2 IL-10-Produktion nach LPS-Stimulation 45

4.4 Zytokineffekte bezüglich der CD80-/CD86-Expression und Modulation, des T-Zellüberlebens und der Blastenbildung ... 47

4.4.1 CD80/CD86-Modulation auf Makrophagen ... 47

4.4.2 T-Zellüberleben und Blastenbildung ... 53

4.5 Zytokin-mRNA-Synthese ... 56

4.5.1 IFN-γ-mRNA ... 56

4.5.2 IL-12(p40)-mRNA ... 57

4.5.3 IL-18-mRNA ... 58

4.5.4 IL-10-mRNA ... 59

5. DISKUSSION ... 61

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 61

5.2 Zytokinproduktion im Vergleich zwischen PB und NSB ... 62

5.2.1 IFN-γ ... 62

5.2.2 IL-12 ... 63

5.2.3 IL-18 ... 64

5.2.4 Induzierbarkeit der IFN-γ-Produktion durch IL-12 und IL-18 ... 65

5.2.5 IL-10 ... 67

5.3 Zytokineffekte auf den Makrophagenphänotyp, die T-Zellproliferation und die Blastenbildung ... 68

5.4 mRNA-Produktion der Zytokine IFN-γ, IL-12, IL-18 und IL-10 ... 70

5.5. Zytokine im klinischen Zusammenhang ... 71

5.6 Methodenkritik ... 74

5.6.1 Heterogenität des Spenderkollektivs ... 74

5.6.2 Suspensionszellkultur für die Zytokinbestimmung ... 74

5.6.3 Enzymimmunoassay ... 75

6. ZUSAMMENFASSUNG ... 76

7. LITERATUR 78

8. ANHANG 95

8.1 Verzeichnis der Abkürzungen 95

8.2 Verzeichnis der Abbildungen 96

8.3 Verzeichnis der Tabellen 98

1. Einleitung

Ausgehend von den Besonderheiten des neonatalen Immunsystems wird die zytokinabhängige Differenzierung von Makrophagen und T-Zellen mit ihren Auswirkungen auf Immunreaktionen beschrieben. Neben der rezeptorvermittelten Zellaktivierung spielen humorale Botenstoffe im komplexen Netzwerk der Signalübermittlung eine wesentliche Rolle.

Zytokine sind Signalproteine, die von Immun- und Nichtimmunzellen sezerniert werden und das Verhalten anderer Zellen beeinflussen. Sie binden an spezifische Rezeptoren der Zielzellen und können mittels Genaktivierung ein dynamisches Netzwerk aufbauen, das den Zellkontakt, die Rezeptoraffinität und die Funktion steuert. Interferon-γ (IFN-γ) ist ein Schlüsselzytokin für eine proinflammatorische Immunantwort (Boehm et al. 1997). Es wird im Neugeborenenalter im Vergleich zum Erwachsenen weniger gebildet und seine Wirkung auf kostimulatorische Rezeptoren ist ebenfalls geringer als beim Erwachsenen (Wakasugi & Virelizier 1985, Maródi 2002). Darauf aufbauend wird die Hypothese vorgestellt, dass die verringerte IFN-γ-Produktion und -Wirkung beim Neugeborenen durch eine geringere Produktion bzw. Wirkung seiner Hauptinduktoren IL-12 und IL-18 bedingt ist (La Pine et al. 2003).

1.1 Das Immunsystem des Neugeborenen und des Erwachsenen

Das Immunsystem des Neu- und insbesondere des Frühgeborenen ist im Vergleich zum Erwachsenen auf humoraler und zellulärer Ebene hinsichtlich seiner einzelnen Komponenten sowie deren Zusammenwirken beeinträchtigt (Tab. 1). Aus diesem Grund wird die Neugeborenenzeit auch als Zeit der „physiologischen Immundefizienz“ bezeichnet (Burgio et al. 1987). Die herabgesetzte Immunität während der Schwangerschaft, sowohl der Mutter als auch des Feten, wird als ein zentraler Mechanismus zur Wahrung der immunologischen Toleranz und Verhinderung von Abstoßungsreaktionen des semiallogenen Feten verstanden (Gaunt & Ramin 2001).

Immunologische Besonderheiten des Neugeborenen

- Die Aktivität des Komplementsystems ist beim Neugeborenen im Vergleich zum Erwachsenen um 20-50% vermindert (Fleer et al. 1988).
- Die Bildung funktionstüchtiger Granulozyten im Knochenmark des Neugeborenen ist verlangsamt (Cairo 1989, Schelonka & Infante 1998).
- B-Lymphozyten des Neugeborenen erlangen die Fähigkeit zur Antikörperbildung erst in den ersten Lebenswochen (Quie 1990).
- Neonatale T-Zellen proliferieren weniger stark nach Antigenstimulation und sind bezüglich ihrer Produktion von Zytokinen wie IFN-γ oder IL-2 eingeschränkt (Adkins 1999, Harris et al. 1992, Wilson & Lewis 1990).

Tab. 1: Immunologische Besonderheiten des Neugeborenen

Aus der eingeschränkten Immunkompetenz und der Tatsache, dass Neugeborene besonders auf Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität angewiesen sind, resultiert eine stark erhöhte Infektanfälligkeit. Dabei stehen vor allem Infektionen im Vordergrund, die eine intakte T-Zellimmunität und T-Zellaktivierung voraussetzen, wie beispielsweise Infektionen durch Cytomegalieviren oder Toxoplasma gondii (Wilson 1986, Adkins 1999).

1.2 T-Lymphozyten

T-Zellen können fremde Antigene nur in Zusammenhang mit körpereigenen Gewebsmolekülen, so genannten MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) erkennen (Zinkernagel & Doherty 1974 und 1975). Diese Prägung auf körpereigene Strukturen, MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II erlangen sie während der Embryonalentwicklung im Thymus (Boehmer 1992).

Reife T-Zellen, die noch mit keinem Antigen konfrontiert wurden, bezeichnet man als naiv. Wird diesen durch eine professionelle Antigen-präsentierende Zelle (APC, Janeway et al. 2002) ein Antigen präsentiert, resultieren drei Reaktionsmöglichkeiten: Anergie, d. h. Lähmung der Zelle, Zelltod oder Aktivierung (Schwarz et al. 1989, Wang et al. 1998).
Die T-Zellaktivierung beinhaltet sowohl eine klonale Expansion der T-Zellen als auch die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine, deren Balance den Verlauf einer Infektion wesentlich mitbestimmt (Volk et al. 1991).

T-Lymphozyten, die den Oberflächenrezeptor CD4 tragen (cluster of differentiation), so genannte T-Helferzellen oder $CD4^+$ T-Zellen, differenzieren sich in proinflammatorische T_H1-Zellen oder in antiinflammatorische T_H2-Zellen (Abb. 1). Sie unterscheiden sich nicht phänotypisch, sondern aufgrund ihrer sezernierten Zytokine (Typ-1- oder Typ-2-Zytokine; Mosmann et al. 1986, Seder & Paul 1994, Abbas et al. 1996).

➔ *T_H1-Zellen*

Sie sezernieren Typ-1-Zytokine (Tab. 2), zu denen IFN-γ, IL-12 und IL-18 gehören, die mit einer Steigerung der zellulären Immunantwort assoziiert sind (Cher & Mosmann 1987). IFN-γ ist ein Schlüsselzytokin für eine proinflammatorische Immunantwort (Boehm et al. 1997).

➔ *T_H2-Zellen*

T_H2-Zellen sezernieren Typ-2-Zytokine wie zum Beispiel IL-4, IL-5 und IL-10 was vorzugsweise eine humorale, B-Zellvermittelte Immunantwort induziert (Mosmann et al. 1986, Abbas et al. 1996, Romagnani 1996).

Ob sich eine T-Helferzelle in eine T_H1- oder eine T_H2-Zelle differenziert, wird durch das Zytokinmilieu (Maggi et al. 1992) und durch die Expression von kostimulatorischen Rezeptoren der B7-Familie (z. B. CD80/CD86) auf APC reguliert (Salomon & Bluestone 2001, Kuchroo et al. 1995).
Den vereinfachten Ablauf einer zytokinabhängigen T-Zelldifferenzierung zeigt Abb. 1.

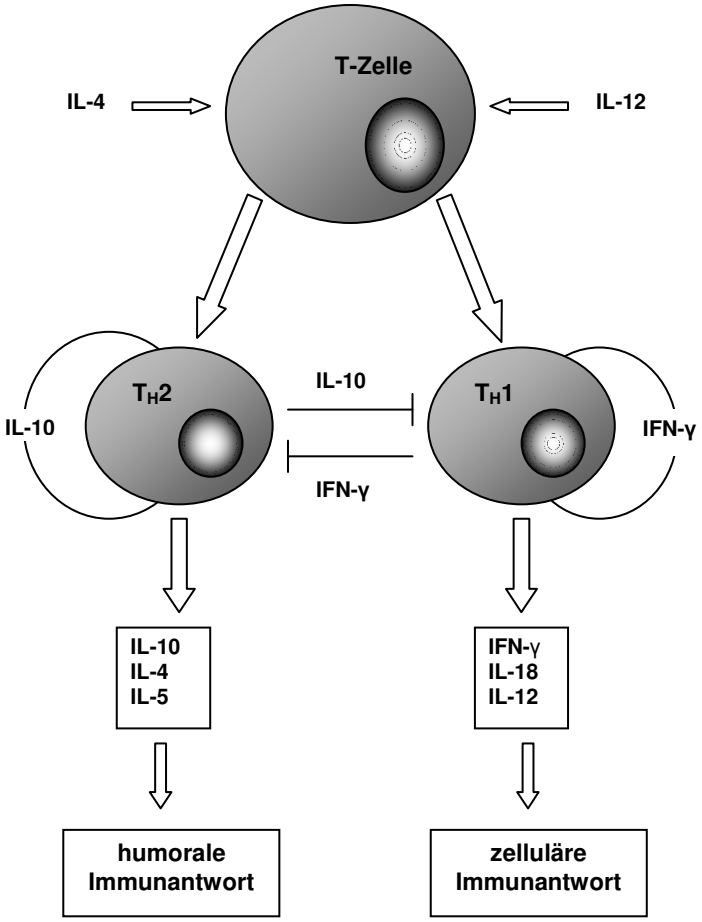

Abb. 1: Zytokinabhängige T-Zelldifferenzierung

IL-12 induziert die Entwicklung einer T_H1-Antwort, IL-4 die einer T_H2-Antwort (Liew 2002). Die daraufhin produzierten Zytokine IFN-γ (T_H1) bzw. IL-10 (T_H2) nehmen Einfluss auf die Balance der T-Zelldichotomie (Maggi et al. 1992) in

Form von autokriner Stimulation und Hemmung der anderen Differenzierungsseite und unterstützen die Ausbildung einer humoralen bzw. zellulären Immunantwort.
Beim Neugeborenen überwiegt eine Sekretion von T_H2-Zytokinen (Zhao et al. 2002, Langrish et al. 2002). T_H1-Zytokine wie IFN-γ verlieren ihre Wirkung bei einer Dominanz von T_H2-Zytokinen (Ding & Shevach 1992, Ding et al. 1993).

1.3 Makrophagen: Professionelle Antigenpräsentierende Zellen

Antigenpräsentierende Zellen, welche kostimulatorische Rezeptoren exprimieren, werden als professionelle antigenpräsentierende Zellen bezeichnet. Darüber hinaus können auch nicht-immunkompetente Zellen, Epithelien, Keratinozyten bis hin zu neoplastischen Zellen kostimulatorische Rezeptoren exprimieren (Bluestone 1998). Als professionelle APC sind besonders dendritische Zellen (DC), Monozyten/ Makrophagen und B-Zellen von Bedeutung.
Makrophagen (MΦ) stammen vom Blutmonozyten ab und werden in verschiedenen Geweben gefunden. Sie lassen sich in unterschiedliche Subtypen unterteilen, die sich in der Expression von kostimulatorischen Rezeptoren und ihrer Funktion als Helfer-Makrophagen bzw. zytotoxische Makrophagen unterscheiden (Kummerle-Deschner et al. 1998; Abb. 2).

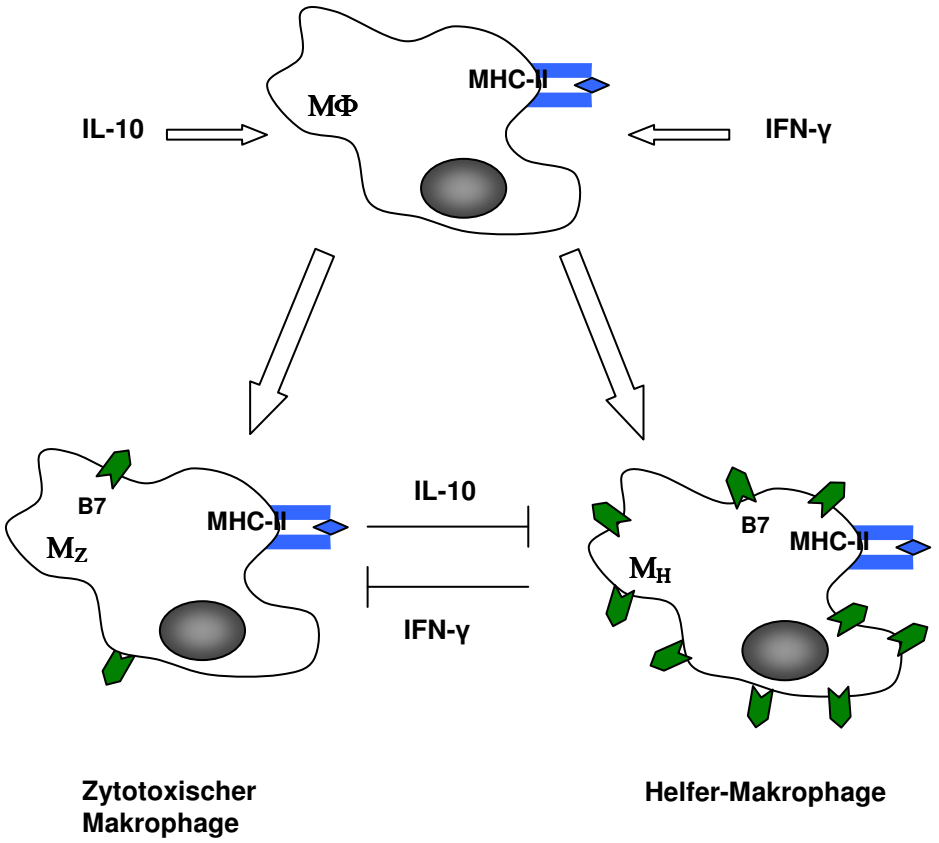

Abb. 2: Zytokinabhängige Makrophagendifferenzierung

IFN-γ differenziert die Makrophagen in Richtung eines kostimulatorischen T-Zellaktivierenden Helfertyps (M_H), während IL-10 die Ausprägung eines zytotoxischen Makrophagen (M_Z) fördert, welcher T-Zellen bei Kontakt eliminiert (Orlikowsky et al. 1997, Wang et al. 1998). Je nach Dominanz des Subtypes wird die T-Zellantwort in Richtung Aktivierung oder Deletion gelenkt (Dudhane et al. 1996).

Makrophagen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen (Trinchieri 1997) von denen IL-10 und IL-12 antagonistische Funktionen bezüglich der T-Zelldifferenzierung und der IFN-γ-Produktion besitzen. IL-10 unterdrückt die IFN-γ-Produktion von T_H1-Zellen (Fiorentino et al. 1989) und IFN-γ inhibiert reziprok die monozytenabhängige IL-10-Produktion (Chomarat et al. 1993). IL-12 hingegen spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung einer T_H1-Antwort und damit dem Schutz vor intrazellulären Pathogenen (Kalinski et al. 1997).

Neben dem Lipopolysaccharid-(LPS)-Bindungsrezeptor CD14, dem Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) und dem Mannose Rezeptor exprimieren Makrophagen weitere Rezeptoren, die bei der Erkennung bakterieller Oberflächenkomponenten eine wichtige Rolle spielen. LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellwand beeinflusst die Steuerung der Immunantwort (Janeway & Medzhitov 2002, Akira et al. 2001). Makrophagen werden aktiviert und produzieren daraufhin proinflammatorische Zytokine, die sich für die angeborene Immunantwort als entscheidend erwiesen haben (Ulevitch & Tobias 1995).
Ruhende Makrophagen tragen weniger MHC-Klasse-II-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche als aktivierte Zellen. Die Fähigkeit von neonatalen Makrophagen zur Antigenpräsentation (Lu et al. 1979) und MHC-II-Expression (Inaba et al. 1986, Kitaura et al. 1988) ist gegenüber Makrophagen aus Erwachsenenblut herabgesetzt.
Makrophagen exprimieren kostimulatorische Rezeptoren der B7-Familie, wobei CD86 (B7-2) konstitutiv exprimiert wird, während CD80 (B7-1) nur nach Stimulation auf der Zelloberfläche erscheint (Freeman et al. 1993, Linsley et al. 1994). Durch die Phagozytose von Mikroorganismen und Fremdantigenen wird die Expression von MHC-II- und B7-Molekülen induziert (Nabavi et al. 1992).

1.4 T-Zellaktivierung durch APC

Ein wesentliches Prinzip der T-Zellaktivierung ist ihre Abhängigkeit von zwei Signalen.
Das erste, spezifische Signal, wird durch die Bindung zwischen T-Zellrezeptor (TCR) und peptidbeladenem MHC-Komplex (Abb. 3 und 4, blaue Rezeptoren) ausgelöst. Wird der T-Zelle nur dieses Signal präsentiert, wird sie entweder anergisch, d.h. sie bleibt gegenüber T-Zellaktivierung refraktär, bzw. paralytisch, oder apoptotisch, d.h. sie wird durch eine Kaskade von zellauflösenden Substanzen über einen programmierten Zelltod eliminiert (Schwartz 1992, Janeway & Bottomly 1994; Abb. 3).

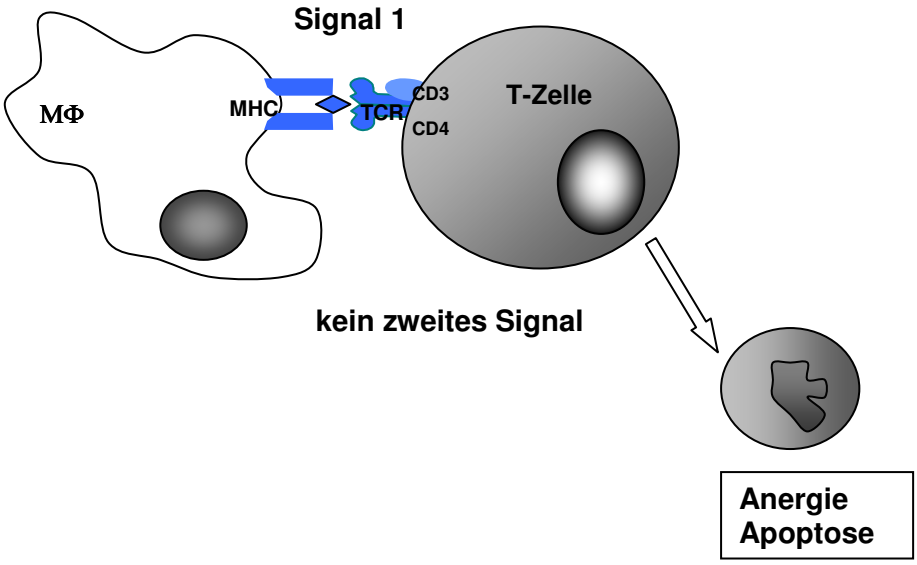

Abb. 3: T-Zellaktivierung ohne zweites Signal

Das zweite, unspezifische, ist ein kostimulatorisches Signal (Abb. 4). Wird der T-Zelle neben dem Antigen auch ein solches Signal angeboten, führt dies zur erfolgreichen Aktivierung (Inaba & Steinman 1984).

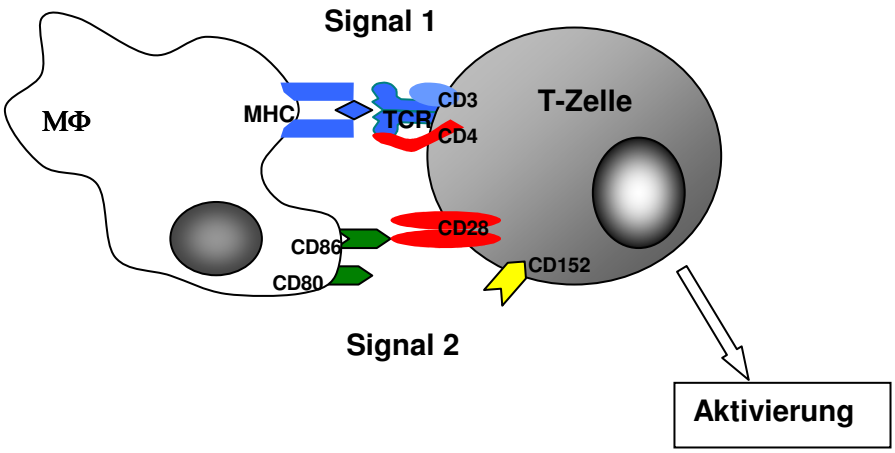

Abb. 4: T-Zellaktivierung mit zweitem Signal

Die T-Zellaktivierung unterliegt keinem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip, sondern findet zwischen der APC und der T-Zelle in Form eines Dialoges über kostimulatorische Moleküle statt, wobei eine höhere Dichte dieser Moleküle eine bessere Aktivierung zur Folge hat (Hathcock et al. 1994).
Dieser Mechanismus wird als immunologischer Selbstschutz gedeutet, da während der T-Zellselektion im Thymus nicht alle potentiell selbstreaktiven T-Zellen aussortiert werden. Die Notwendigkeit zweier Signale zur Aktivierung verhindert so selbst zerstörerische Immunantworten. Bei Autoimmunerkrankungen, in welchen eine T-Zellhyperreaktivität gefunden wird, lassen sich Auffälligkeiten im System der Kostimulation finden (Salomon & Bluestone 2001).
Als „*in vitro* Modell“ der makrophagenabhängigen T-Zellaktivierung kann die Stimulation mit dem gegen den CD3-Rezeptor des T-Zellrezeptorkomplexes gerichteten monoklonalen Antikörper (anti-CD3) dienen (Dudhane et al. 1996).

1.5 Rezeptoren der B7-Familie

In Bezug auf die Kostimulation von T-Zellen haben sich auf Makrophagen Rezeptoren der B7-Familie als entscheidend erwiesen (Carreno & Collins 2002). Die am besten charakterisierten Rezeptoren sind die beiden Glykoproteine B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die erstmals als B-Zellaktivierendes Antigen beschrieben wurden (Freeman et al. 1987, Freeman et al. 1989). Sie binden mit unterschiedlicher Affinität an entsprechenden Liganden, CD28 und CD152 auf der T-Zelloberfläche (Carreno & Collins 2002), wobei CD80 etwa zwei bis dreimal stärker bindet als CD86 (Freeman et al. 1993). CD86 wird im Gegensatz zu CD80 konstitutiv auf Makrophagen exprimiert (Linsley et al. 1994). Die Bindung der Rezeptoren an der T-Zelle kann sowohl stimulierende als auch inhibierende und damit die Aktivierung terminierende Signale vermitteln (Appleman & Boussiotis 2003).

1.6 Zytokine

Die nachfolgende Beschreibung einzelner Zytokine beschränkt sich auf die in der Arbeit verwendeten (Tab. 2).

T_H1-Zytokine	T_H2-Zytokine
• Interferon-γ • Interleukin-12 • Interleukin-18	• Interleukin-10

Tab. 2: Untersuchte Zytokine

1.6.1 IFN-γ

IFN-γ wurde 1965 aufgrund seiner antiviralen Aktivität entdeckt (Wheelock 1965). Seine Hauptinduktoren *in vivo* sind IL-12 und IL-18 (Gately et al. 1998, Ushio et al. 1996). Tabelle 3 stellt einige Charakteristika von IFN-γ vor.

IFN-γ
• Nichtkovalentes 34kDa großes homodimeres Molekül (Greenlund et al. 1992, Fountoulakis et al. 1992).
• Produktion durch: aktivierte T_H1-Zellen (Mosmann & Coffman 1989), Monozyten und $CD8^+$ T-Zellen (Sad et al. 1995, Perussia 1991)
• IL-12 induziert in Antigen-stimulierten $CD4^+$ T-Zellen die IFN-γ Gen-Transkription (Trinchieri 1995) und Sekretion (Lederer et al. 1996)
• Erhöhung der Expression von MHC-Oberflächenmolekülen (Revel & Chebath 1986, Rosa et al. 1986).

Tab. 3: Charakteristika von IFN-γ

1.6.2 IL-12

IL-12 wurde als Produkt einer mit dem Epstein-Barr-Virus transformierten humanen B-Zelllinie identifiziert, das Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert und die IFN-γ-Produktion und T-Zellproliferation induziert (Gately et al. 1986, Wong et al. 1988, Kobayashi et al. 1989, Stern et al. 1990; Tab. 4).

IL-12

- 75kDa großes Zytokin, bestehend aus zwei Untereinheiten: 35kDa (p35) und 40kDa (p40) (Kobayashi et al. 1989).
- IL-12(p35) wird nur zusammen mit IL-12(p40) aus der Zelle ausgeschleust, wohingegen IL-12(p40) auch alleine außerhalb der Zelle vorkommen kann (Carra et al. 2000).
- Hauptproduzenten: Antigen-stimulierte Makrophagen, Dendritische Zellen (DC), Neutrophile Granulozyten und B-Zellen (Zeh et al. 1994).
- Induziert: die IFN-γ-Produktion, die Zelldifferenzierung in T_H1-Zytokin-produzierende Zellen und die Aktivierung und Produktion T_H1-assoziierter Immunglobulin-Klassen (IgG2a) durch B-Zellen (Trinchieri 2003).

Tab. 4: Charakteristika von IL-12

1.6.3 IL-18

IL-18 gehört zur IL-1 Familie (Okamura et al. 1995a und 1995b, Dinarello et al. 1998, Tsutsui et al. 2000, Akira 2000, Nakanishi et al. 2001a). Die beiden Zytokine ähneln sich in struktureller Hinsicht, bezüglich des Rezeptorkomplexes, im Signaltransduktionsweg und in ihren proinflammatorischen Fähigkeiten (Dinarello 1999, Lebel-Binay et al. 2000). Ursprünglich wurde es aufgrund seiner Fähigkeit entdeckt, die IFN-γ-Produktion von T_H1-Zellen in Gegenwart von IL-12 zu induzieren. Tabelle 5 beschreibt weitere Charakteristika von IL-18.

IL-18

- Wird als 24kDa großes biologisch inaktives Vorläuferprotein produziert und durch Caspasen in ein aktives Zytokin gespalten (Fantuzzi & Dinarello 1999, Gu et al. 1997, Ghayur et al. 1997, Tsutsui et al. 1999).
- Produktion durch: Makrophagen und DC (Fantuzzi et al. 1998, Bohn et al. 1998, Shibata et al. 1998, Sanchez-Bueno et al. 1996, Stoll et al. 1998), sowie Nicht-Immunzellen wie z. B. Keratinozyten (Stoll et al. 1997) oder Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes (Takeuchi et al. 1997) und der Luftwege (Cameron et al. 1999).
- Wirkt zusammen mit IL-12 synergistisch auf die IFN-γ-Produktion von nichtpolarisierten T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und DC (Okamura et al. 1995a und 1995b, Okamura et al. 1998, Tsutsui et al. 2000, Yoshimoto et al. 1997, Yoshimoto et al. 1998, Fukao et al. 2000).
- Ohne IL-12 kann es die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 von T-Zellen, NK Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten induzieren (Hoshino et al. 1999, Yoshimoto et al. 1999, Yoshimoto et al. 2000).
- IL-18 beeinflusst sowohl die T_H1- als auch die T_H2-Antwort in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu (Okamura et al. 1998, Xu et al. 2000).

Tab. 5: Charakteristika von IL-18

1.6.4 IL-10

IL-10 wurde erstmals aufgrund seiner Wirkung auf APC (Fiorentino et al. 1989) als Inhibitor der Zytokinproduktion von T_H1-Zellen charakterisiert (Fiorentino et al. 1991a). IL-10 ist das bisher am stärksten wirkende antiinflammatorische Zytokin der T_H2-Familie (Tab. 6).

IL-10

- Es wird unter anderem von T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen produziert (Howard & O´Garra 1992, Yssel et al. 1992).
- IL-10 wirkt als Mastzell- (Thompson-Snipes et al. 1991) und T-Zell- (MacNeil et al. 1990) Wachstumsfaktor, erhöht die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf ruhenden B-Zellen (Go et al. 1990) und verstärkt die B-Zelldifferenzierung und Proliferation in Gegenwart von anti-CD40 und IL-4 (Rousset et al. 1992).
- IL-10 behindert einige Makrophagenfunktionen, wie die Produktion von IL-1, IL-6, TNF-alpha, GM-CSF, G-CSF und die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite, die eine Rolle bei der Elimination intra- und extrazellulärer Parasiten spielen (Fiorentino et al. 1991b, Bogdan et al. 1991, Gazzinelli et al. 1992).
- IL-10 erhöht die Zytotoxizität von Makrophagen in der antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität (Orlikowsky et al. 1997, Dudhane et al. 1996).

Tab. 6: Charakteristika von IL-10

1.7 Hypothesen und Vorgehen

1. Die im Vergleich zum Blut von Erwachsenen erniedrigte IFN-γ-Produktion im Nabelschnurblut ist auf eine reduzierte Produktion und/oder verminderte Wirkung von IL-12 und IL-18 zurückzuführen.

   Da die Produktion von IFN-γ und seine Wirkungen auf die kostimulatorischen Rezeptoren von Makrophagen beim Neugeborenen reduziert sind (Taylor & Bryson 1985, Orlikowsky et al. 2003), untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit, ob die erniedrigte IFN-γ-Produktion auf eine reduzierte Produktion der IFN-γ-Induktoren IL-12 oder IL-18 zurückzuführen ist und ob eine Hemmung bereits auf Transkriptionsebene vorliegt. Des-

halb wurden im Zellkulturüberstand Zytokinkonzentrationen basal und nach Stimulation gemessen, sowie mRNA-Kopien detektiert.

2. Die T_H2-Lastigkeit des Neugeborenen könnte bei erhöhter IL-10-Produktion im Nabelschnurblut die IFN-γ-, IL-12- und IL-18-Produktionen und Wirkungen hemmen.

   Da beim Neugeborenen eine Sekretion von T_H2-Zytokinen überwiegt (Zhao et al. 2002, Langrish et al. 2002) und T_H1-Zytokine wie IFN-γ ihre Wirkung bei einer Dominanz von T_H2-Zytokinen verlieren (Ding et al. 1993), wurde die Hypothese getestet, ob eine Reduktion der Wirksamkeit von IFN-γ, IL-12, IL-18 im Nabelschnurblut durch eine erhöhte IL-10-Produktion bedingt ist.

3. Die Zytokinwirkung von IL-12, IL-18 und IFN-γ auf die CD80-/CD86-Expression und die damit verbundene T-Zellaktivierung ist im Nabelschnurblut geringer als im Blut Erwachsener.

   Eine weitere mögliche Erklärung für die im Vergleich zum Erwachsenen reduzierte IFN-γ-Wirkung auf die T-Zellaktivierung stellt eine herabgesetzte Wirkung von IL-12 und/oder IL-18 auf kostimulatorische Moleküle des Makrophagen bzw. auf T-Zellen dar. Deshalb wurde durchflusszytometrisch die Expression und Kinetik von Rezeptoren der B7-Familie auf der Zelloberfläche von Makrophagen bestimmt sowie quantitativ die T-Zellentwicklung und Blastenbildung verfolgt.

2. Material

2.1 Zellen

Die mononukleären Zellen (MNC) wurden aus peripherem Venenblut (PB) gesunder Erwachsener (n=52) und dem Nabelschnurblut (NSB) reifer Neugeborener (n=54) gewonnen. Die Nabelschnurblutentnahme erfolgte bei reifen Neugeborenen, ohne Anhalt für pränatal erworbene Infektionen, durch sterile Punktion. Zuvor wurde die schriftliche Einwilligung der Mutter und die Zustimmung der Ethikkommission (290/99) eingeholt. Gesunde erwachsene Spender dienten als Vergleichsgruppe.

2.2 Materialien biologischen Ursprungs

Bovines Serum Albumin (BSA), lyophilisiert	Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Fötales Kälberserum (FCS), (inaktiviert im 56°C Wasserbad für 30 Minuten)	Fa. Biochrom, Berlin
Lipopolysaccharid (LPS), E.coli. (5mg)	Fa. Sigma, Taufkirchen
anti-CD3 (5mg)	Fa. CRAG GmbH, Orthoclone
Polyglobin (10%)	Fa. Bayer, Leverkusen
Rekombinantes Humanes IL-10 (5µg)	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rekombinantes Humanes IL-12 (5µg)	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rekombinantes Humanes IL-18 (5µg)	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)
Rekombinantes Humanes IFN-γ (100µg)	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)

Sample Diluent No. 1	Fa. Bender MedSystems GmbH, San Bruno, USA

2.3 Materialien nichtbiologischen Ursprungs

Ampuwa	Fa. Fresenius, Bad Homburg
Biocoll Separating Solution, Dichte 1,077	Fa. Biochrom, Berlin
Carbonat-Puffer (pH 9,5; 8,4g/l Natriumhydrogen-carbonat; 3,56g/l Natriumcarbonat)	Universitätsapotheke, Tübingen
FACS Flow	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Lysing Solution	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Heparin-Natrium (5000 I. E./0,5ml)	Fa. B. Braun, Melsungen
H_2SO_4 (2N, 4N)	Fa. Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Fa. Biochrom, Berlin
NaCl (0,9%)	Fa. Fresenius, Bad Homburg
PBS-Dulbecco (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Fa. Biochrom, Berlin
Propidiumiodid	Fa. Sigma, Taufkirchen
3, 3´,5,5´Tetramethylbenzidin (TMB)	Fa. BD Biosciences PharMingen, Heidelberg
Trypanblau	Fa. Biochrom, Berlin
Tween20	Fa. Sigma, Taufkirchen
VLE RPMI (Very Low Endotoxin, Roswell Park Memorial Inst.)1640 Medium	Fa. Biochrom, Berlin

2.4 Enzymimmunoassay

Human IFN- γ OptEIA™ Set	Fa. BD Biosciences PharMingen, Heidelberg
Human IL-10 OptEIA™ Set	Fa. BD Biosciences PharMingen, Heidelberg
Human IL-12 OptEIA™ Set	Fa. BD Bioscience PharMingen, Heidelberg
Human IL-18	Fa. Bender MedSystems GmbH, San Bruno, USA

2.5 Antikörper für die Durchflußzytometrie

Sie wurden von Becton Dickinson in Heidelberg bezogen.

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert:
CD4 (RPA-T4; IgG_1)
CD86 (2331 (FUN-1); $IgG_{1\kappa}$)
CD14 (MΦP9; IgG_1)

Phycoerythrin (PE) markiert:
CD8 (RPA-T8; IgG_1)
CD80 (L307.4; IgG_1)

Simultest Control y1/y2 (IgG1/IgG1, MOPC-21)

2.6 mRNA-Messung

RNeasy Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT PCR	Fa. Roche, Mannheim

Primer und Sonden für IL-10, IL-12(p40), IL-18 und IFN-γ	Fa. TIB Molbiol, Berlin
FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit	Fa. Roche, Mannheim

2.7 Glas- und Plastikmaterial

Butterfly-21 Venisystems	Fa. Abbott, Sligo (Irland)
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Einmalspritzen, Plastipack (30 ml, 50 ml)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
24-Loch-Kulturplatten	Fa. Costar, Bodenheim
96-Loch-Microtiterplatten Immuno-Plate MaxiSorp	Fa. Nunc, Wiesbaden
Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim
Pipetten	Fa. Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	Fa. Greiner, Frickenhausen
8-Kanalpipette (Transferpette)	Fa. Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße Safe-Lock	Fa. Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (2,5 ml,15 ml, 50 ml)	Fa. Greiner, Frickenhausen

2.8 Geräte

Brutschrank (5% CO_2)	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
CellQuest-Software	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
FACSScan (Fluorescence-activated cell sorter)	Fa. Becton Dickinson Heidelberg
Kühlschrank	Fa. Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Fa. Olympus, Hamburg
LightCycler	Fa. Roche, Mannheim

Mikrotiterplattenwaschgerät	Fa. Tecan, Crailsheim
Photometer	Fa. Tecan, Crailsheim
Pipettierhilfe	Fa. Brand, Wertheim
Schüttelmixer	Fa. Schütt, Göttingen
Sterilbank	Fa. Heraeus Instruments, Stuttgart
Zentrifuge Rotanta 46 RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

3. Methoden

Aus NSB und PB wurden mononukleäre Zellen (MNC) gewonnen, die als Ausgangsmaterial für Zellkulturen dienten und mit verschiedenen Substanzen inkubiert wurden. Ein Enzymimmunoassay (EIA) diente der Quantifizierung von Zytokinen im Zellkulturüberstand. Die Phänotypisierung der Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Analog der Methode von Löffler et al. (2003) wurde die Zytokin-mRNA mittels RT-PCR gemessen.

3.1 Gewinnung von MNC aus Vollblut

Die Isolierung von MNC aus Vollblut erfolgte nach einer von Böyum (Böyum 1968 und 1977) entwickelten Methode mittels Dichtegradientenzentrifugation. 15 ml Nabelschnurblut, das direkt nach der Abnabelung unter sterilen Bedingungen der Nabelschnur entnommen wurde, sowie 50 ml des Erwachsenenblutes wurden zur Antikoagulation mit 2 I.E. Heparin je Milliliter versetzt. Das 1:1 mit PBS verdünnte Blut wurde jeweils in 50 ml Zentrifugenröhrchen auf 15 ml Lymphoprep® unter Vermeidung einer Durchmischung geschichtet und anschließend bei 400 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der bei der Zentrifugation entstandene Zellring von MNC wurde mit einer 10 ml Pipette vorsichtig und selektiv abgesaugt, in ein leeres Zentrifugenröhrchen überführt und mit kaltem PBS + 5 % fötalem Kälber Serum (FCS) auf 50 ml aufgefüllt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 500 g für 10 Minuten an. Der Überstand des am Boden befindlichen Zellpellets wurde verworfen, die Zellen mit 50 ml 4 °C kaltem PBS + 5 % FCS resuspendiert, bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert und mit 20 ml kaltem RPMI + 10 % FCS resuspendiert. 50 µl dieser Suspension wurden 1:1 mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Aufgrund des Zählergebnisses wurde durch entsprechende Zugabe von RPMI + 10 % FCS, eine Zellzahl von 4 x 10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.2 Suspensionszellkulturen von MNC

Die MNC wurden in eine 24-Loch Zellkulturplatte ausgesät, so dass sich in jedem Loch 1 ml Zellsuspension befand, entsprechend 4 x 10^6 Zellen. Dem Versuchsplan folgend wurde den Zellen die zu untersuchende Substanz in einer Verdünnung von 1:101 zugesetzt. Die einzelnen Substanzen waren zuvor frisch aliquotiert worden, so dass sich die eingesetzte Konzentration in 10 µl PBS oder Ampuwa befand.

- LPS: Zellwandbestandteil von gramnegativen Bakterien, der an den Makrophagenrezeptor CD14 bindet und eine Aktivierung und Zytokinkaskade induziert.
  5 µg lyophilisiertes Pulver wurden in 500 µl PBS aufgenommen und 1:100 mit PBS weiter verdünnt, Endkonzentration: 1,0 µg/ml (falls im Text nicht anders beschrieben).
- anti-CD3: monoklonaler, gegen den CD3-Rezeptor der T-Zelle gerichteter Antikörper, der eine makrophagenabhängige, polyklonale T-Zellstimulation induziert.
  Konzentration der Stammlösung 1 mg/ml, 100 µl Stammlösung wurden mit 100 µl PBS verdünnt, Endkonzentration: 5,0 µg/ml (falls im Text nicht anders beschrieben).
- IFN-γ: humanes rekombinantes IFN-γ ist ein starker Induktor der CD80 und CD86 Rezeptoren auf Makrophagen.
  100 µg lyophilisiertes IFN-γ, entsprechend 680.000 I.E., wurden in 680 µl PBS gelöst und 1:20 weiter verdünnt, Endkonzentration: 500 I.E./ml (falls im Text nicht anders beschrieben).
- IL-10: 5 µg IL-10 wurden in 1000 µl PBS gelöst, Endkonzentration: 50 ng/ml (falls im Text nicht anders beschrieben).
- IL-12: 5 µg IL-12 wurden in 50 µl Ampuwa gelöst und 1:10 weiter verdünnt, Endkonzentration: 100 ng/ml.
- IL-18: 5 µg IL-18 wurden in 50 µl Ampuwa gelöst und 1:10 weiter verdünnt, Endkonzentration: 100 ng/ml.

Analog zu der von Ding et al. (1993) verwendeten Methode erfolgte bei Kombination von anti-CD3 mit IFN-γ oder IL-10 eine Zugabe von anti-CD3 eine Stunde nach Zytokinzusatz.
Die Zellkulturplatten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 bis zu 48h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden aus jedem Loch 500 µl Zellkulturüberstand abgesaugt und bei -75°C eingefroren.

3.3 Enzymimmunoassay (EIA)

3.3.1 Prinzip des EIA am Beispiel von IL-12

Ein EIA dient der Quantifizierung eines Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzyms. Hierbei findet sowohl eine immunologische als auch eine enzymatische Reaktion statt.
Eine Mikrotiterplatte wird mit IL-12 AKs beschichtet (1) und anschließend mit der Lösung inkubiert, in der IL-12 quantifiziert werden soll. IL-12 bindet spezifisch an die AKs (2). Ein weiterer für IL-12 spezifischer aber an ein anderes Epitop bindender AK wird hinzugegeben. An diesem ist ein Enzym gebunden (3). Wird nun ein Substrat hinzugegeben, entsteht bei dessen Umsetzung ein Farbstoff (4). Eine Säure stoppt die enzymatische Reaktion, was an einem erneuten Farbumschlag zu erkennen ist (5). Die Konzentration des gebildeten Farbstoffs ist direkt proportional zur IL-12-Konzentration der Lösung und kann mit einer Extinktionsmessung im Photometer bestimmt werden.

(1) (2) (3) (4) (5)

Abb. 5: Prinzip eines EIA

Durch die Mitführung eines bezüglich seiner Konzentration bekannten Standards wird die Probenkonzentration anhand der erstellten Standardkurve durch Interpolation bestimmt.
Diese Analyseform hat seit ihrer unabhängigen Einführung durch Engvall & Perlmann (1971) sowie Avrameas & Guilbert (1971) weltweit Verbreitung gefunden.

3.3.2 Bestimmung von IFN-γ, IL-12 oder IL-10

Die Bestimmung von IFN-γ, IL-12 und IL-10 erfolgte nach gleichem Versuchsplan, wobei sich lediglich die Standards und die spezifischen Antikörper unterschieden.
Alle Reagenzien wurden bei Raumtemperatur verwendet. Zuerst mussten die 96-Loch-Mikrotiterplatten mit Antikörpern beschichtet werden. Dazu wurden je Platte 48 µl des jeweils spezifischen Antikörperkonzentrats mit 11,95 ml Carbonat-Puffer verdünnt. 100 µl dieses Gemisches wurde in jedes Loch pipettiert, woran sich eine etwa 10-stündige Über-Nacht-Inkubation im Kühlschrank bei 4°C anschloss.
Am nächsten Morgen wurde die Mikrotiterplatte 3x mit einem Waschpuffer, bestehend aus 500 ml PBS-Dulbecco + 0,05 % Tween20, mit dem Mikrotiterplattenwaschgerät gewaschen und nach dem letzten Waschvorgang bei -20°C eingefroren.
Das IL-10 Standardkonzentrat wurde in 1 ml Ampuwa gelöst und in 20 µl Aliquots bei -75°C eingefroren. Die Behandlung des IL-12 und IFN-γ Standardkonzentrates erfolgte analog.

Durchführung:

Die Proben wurden 1:1 mit Assay Diluent, der aus 500 ml PBS-Dulbecco + 10 % FCS bestand, verdünnt. Um eine Standardkurve erstellen zu können, bediente man sich einer aus einem Standardaliquot hergestellten Verdünnungsreihe.

IL-10 Verdünnungsreihe: 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,3 – 15,6 – 7,8 pg/ml
IL-12 Verdünnungsreihe: 2000 – 1000 – 500 – 250 – 125 – 67,6 – 31,3 pg/ml
IFN-γ Verdünnungsreihe: 300 – 150 – 75 – 37,5 – 18,8 – 9,4 – 4,7 pg/ml

Folgende Volumina wurden pro Loch auf eine mit Antikörpern beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert:

- 200 µl Assay Diluent
- Inkubation der Mikrotiterplatte über 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT)
- 3x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl Standard bzw. Proben in Doppelbestimmung
- Inkubation der Mikrotiterplatte über 2 Stunden bei RT
- 5x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl Streptavidin-Peroxidase verbundener Nachweisantikörper
- Inkubation der Platte über 1 Stunden bei RT
- 7x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl TMB-Substratreagenz
- Inkubation der Mikrotiterplatte über 30 Minuten bei RT, in Dunkelheit
- 50 µl Stopp-Lösung, H_2SO_4

Daran schloss sich eine Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Korrekturwellenlänge von 570 nm mit dem Photometer an. Die Sensitivität des IL-12(p40) EIA lag bei 31,2 pg/ml, des IL-10 EIA bei 7,8 pg/ml und des IFN-γ EIA bei 4,7 pg/ml. Die Erstellung der Standardkurve und Berechnung der Probenkonzentrationen erfolgte mit dem Computerprogramm Mathcad Professional 2000. Zur Darstellung der Daten wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen verwendet.

3.3.3 Bestimmung von IL-18

Alle Reagenzien waren vom Hersteller gebrauchsfertig geliefert und wurden bei Raumtemperatur verwendet. Am Vorabend wurde die Mikrotiterplatte mit Antikörpern beschichtet, wozu 500 µl des Antikörperkonzentrats in 9,5 ml PBS gelöst und in jedes Loch 100 µl des Gemisches pipettiert wurden. Nachdem die Platte über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert worden war, wurde sie am nächsten Morgen mit einem Waschpuffer, bestehend aus 500 ml PBS-Dulbecco + 0,05 % Tween20, mit dem Mikrotiterplattenwaschgerät gewaschen.
Der Sample Diluent wurde 1:2 mit Assay Buffer verdünnt. Das lyophilisierte IL-18 Standardkonzentrat wurde in 250 µl Assay Buffer gelöst, 1:10 verdünnt und in 250 µl Aliquots bei -75°C eingefroren.
Um eine Standardkurve zu erstellen, bediente man sich einer aus einem Standardaliquot hergestellten Verdünnungsreihe. Dazu wurde das eingefrorene Konzentrat 1:1 mit dem Sample Diluent verdünnt, so dass eine Höchstkonzentration von 5000 pg/ml entstand. Diese Konzentration wurde 1:1 weiter verdünnt, bis zum Erreichen einer Konzentration von 78 pg/ml.

Folgende Volumina wurden pro Loch auf eine beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte, pipettiert:

- 250 µl Assay Buffer (500 ml PBS-Dulbecco + 0,05 % Tween20 + 2,5 g BSA)
- Inkubation der Mikrotiterplatte über 2 Stunde bei RT
- 2x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl Standard bzw. Proben in Doppelbestimmung
- Inkubation der Mikrotiterplatte über 2 Stunden bei RT
- 3x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl des biotinylierten Nachweisantikörpers
- Inkubation der Platte über 1 Stunden bei RT
- 3x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl des Streptavidinreagenzes

- 3x Waschen der Platte mit Waschpuffer
- 100 µl TMB-Substratreagenz
- Inkubation der Mikrotiterplatte über 10 Minuten bei RT, in Dunkelheit
- 100 µl Stopp-Lösung, H_2SO_4

Daran schloss sich eine Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 620 nm mit dem Photometer an. Die Sensitivität des IL-18 EIA lag bei 55 pg/ml. Die Erstellung der Standardkurve und Berechnung der Probenkonzentrationen erfolgte mit dem Computerprogramm Mathcad Professional 2000. Zur Darstellung der Daten wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen verwendet.

3.4 Immunphänotypisierung mittes Durchflußzytometrie

3.4.1 Prinzip der Durchflußzytometrie

Diese Methode dient der Quantifizierung und Identifizierung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenantigene durch Lichtstreuung eines Laserstrahls, wobei die Streuung mittels Photodetektoren gemessen wird.
Dabei wird ein Strom einzelner Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung mittels Überdruck in einer Kapillare erzeugt, so dass die Zellen einzeln einen Argonlaser der Wellenlänge 488 nm durchlaufen können.
Das Vorwärtsstreulicht (Forward Light Scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße. Je größer die Zelle, desto stärker ist die Streuung des Laserlichtes. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC), das orthogonal zum einfallenden Laserstrahl streut, ist ein Maß für die Granularität der Zellen.
Die Immunphänotypisierung der Zelloberfläche erfolgte durch Färbung der Zellen mit spezifischen fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern, die an bestimmten Zelloberflächenstrukturen binden.
Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Fluorescein-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) eingesetzt, die durch das Laserlicht angeregt werden und

Licht einer spezifischen Wellenlänge emittieren. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Antikörper und damit der exprimierten Oberflächenmoleküle auf einer Zelle.

3.4.2 Färbung, Messung und Auswertung der Immunfluoreszenz

Die MNC wurden mit PBS vom Boden des Lochs gewaschen, in Teströhrchen überführt, so dass sich in jedem Röhrchen 10^5 Zellen befanden, und bei 330 g für 6 Minuten zentrifugiert. Jedem Teströhrchen wurden 15 µl Polyglobin 10% zugesetzt, vermischt und auf Eis für 20 Minuten inkubiert. 20 µl von jedem Antikörper wurden anschließend zu den Zellen pipettiert und nochmals für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Unspezifische Immunglobuline gleichen Isotyps dienten als Isotypkontrolle zur Detektion des Hintergrundes. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml FACS Flow und Abzentrifugieren bei 330 g für 6 Minuten wurden die Zellen am FACScan analysiert. Makrophagen und Lymphozyten wurden durch FSC und SSC, wie in Abbildung 6 dargestellt, bestimmt.

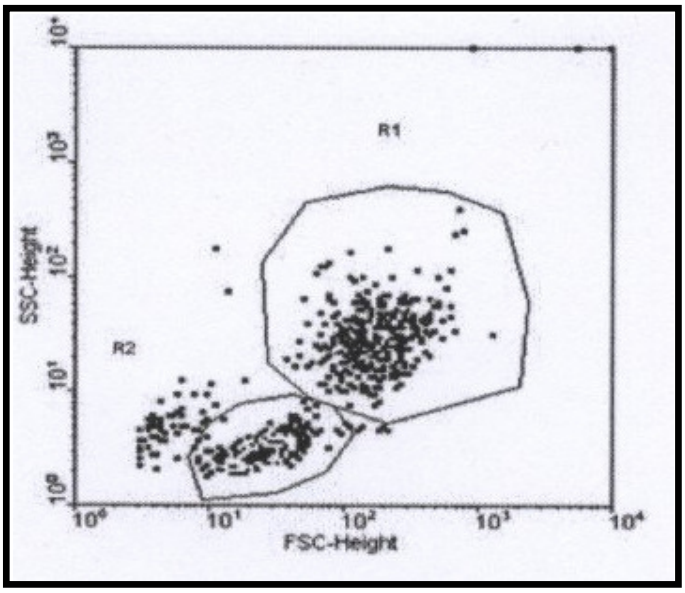

Abb. 6: Beispiel für ein Scattergramm
Es zeigt den Zusammenhang von Größe (x-Achse, forward scatter) und Granularität (y-Achse, side scatter). R1: Lymphozyten; R2: Monozyten/Makrophagen

3.4.3 Bestimmung der T-Zell- und Blastenzahl

Die inkubierten MNC wurden geerntet und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zahl der T-Zellen wurde mittels CD4 und CD8 Färbung im FACS erfasst, die der Makrophagen durch CD14 Färbung.
Als T-Zellen wurde die Summe von CD4 hochpositiven Zellen und CD8 hochpositiven T-Zellen bestimmt, welche sich in unstimulierten Kontrollen in R1 befanden.
Als Blasten wurden CD4- oder CD8 hochpositive Zellen detektiert, welche CD14 negativ waren und in ihrer Größe und Granularität in die oben dargestellte Region 2 (R2) hineinreichten.

3.5 Messung der Zytokin-mRNA

Analog der Methode von Löffler et al. (2003) wurde die Zytokin-mRNA mittels RT-PCR quantifiziert. Dazu wurde die RNA extrahiert, in cDNA überführt und im LightCycler gemessen.

3.5.1 RNA-Extraktion

Nachdem die MNC von der Zellkulturplatte mit einer Pipette abgesaugt worden waren, wurden sie 1:1 mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.
Die Gesamt RNA der MNC wurde mit dem RNeasy Mini Kit nach der Anleitung des Herstellers isoliert.

- zentrifugieren bei 2200 rpm für 5 min
- den Überstand verwerfen und das Pellet mit 350 µl RLT-Puffer resuspendieren

- Zelllysates auf eine QIAshredder-Säule pipettieren und bei 14000 rpm für 2 min zentrifugieren
- 350 µl 70%iges Ethanol hinzufügen, das gesamte Lysat auf eine RNeasy mini-Säule geben und bei 14000 rpm für 15 sec zentrifugieren
- 700 µl RW1 Puffer hinzupipettieren bei 14000 rpm für 15 sec zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 500 µl RPE Puffer hinzupipettieren bei 14000 rpm für 5 min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzen, 30 µl Wasser auf die Membran pipettieren und bei 14000 rpm für 1 min zentrifugieren und auf Eis lagern.

3.5.2 Umschreibung der RNA in cDNA

Die Reverse Transkription wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR den Anweisungen des Herstellers folgend durchgeführt.

- 8,0 µl der extrahierten RNA Probe und 2 µl des Oligo-p(dT)15-Primers wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert, für 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.
- Ansatz des Mastermixes mit folgenden Volumina je Probe

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10x Reaktions Puffer	2,0 µl	1x
25 mM MgCl2	4,0 µl	5 mM
dNTP-Mix	2,0 µl	1 mM
RNase Inhibitor	1,0 µl	50 U
AMV Reverse Transkriptase	1,0 µl	>20 U
Gesamtvolumen	10,0 µl	

- 10,0 µl Mastermix wurden der RNA mit dem Primer hinzupipettiert und bei 42°C für 60 min inkubiert
- Stopp der Reaktion durch Inkubation bei 96°C für 5 min
- 20 µl Probe enthielten einzelsträngige cDNA, die bei -20°C gelagert wurde

3.5.3 LightCycler PCR

a) Primer und Sonden

F= Vorwärts-(forward-)primer R= Rückwärts-(reverse-)primer
FL= Fluorescein markierte Sonde LC= LC red 640 markierte Sonde
B= Sonden in 3´→ 5´ Richtung Bp= Basenpaar

IL-10 336 bp

F321: AGCTGAGAACCAAGACCCAGA	64,0 °C
R657: GGGCTGGGTCAGCTATCC	60,0°C
FL400: CGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCT-fluorescein	78,0°C
LC426: LCred 640-TGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGC-p	80,0°C

IL-12(p40) 202 bp

F64: CTCGTGGCCATATGGGAAC	60,0 °C
R266: TGGCCAGCATCTCCAAACT	58,0°C
FL144: GGTCCTCACCTGTGACACCCCTGA-fluorescein	78,0°C
LC170: LCred 640-AAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACC-p	82,0°C

IL-18 178 bp

F354: GTATGTATAAAGATAGCCGGCCTA	68,0 °C
R532: ATGTCCTGGGACACTTCTCTG	64,0 °C
FL439[b]: GTTCTCACAGGAGAGAGTTGAAATTTTCTC-fluorescein	84,0 °C
LC408[b]: LCred640-CACTTCACAGAGATAGTTACAGCCATAACCT-p	86,0 °C

IFN-y 254 bp

F371: GCATCCAAAAGAGTGTGGAG	60,0 °C
R625: GCAGGCAGGACAACCATTAC	62,0 °C
FL491: TCCAACGCAAAGCAATACATGAACTC-fluorescein	74,0 °C
LC518: LCred 640-TCCAAGTGATGGCTGAACTGTCG-p	70,0 °C

Für die PCR im LightCycler wurde das FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit verwendet.

Mastermix

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
H_2O	2,6 µl	
$MgCl_2$	2,4 µl	3 mM
Primer 1	0,5 µl	0,125 µM
Primer 2	0,5 µl	0,125 µM
Sonde 1	1,0 µl	0,15 µM
Sonde 2	1,0 µl	0,15 µM
FastStartTaq Polymerase+PCR-Puffer+dNTP-Mix (10x)	2,0 µl	1x

Folgende Reaktionsvolumina wurden pipettiert:

- 2,0 µl cDNA Probe
- 8,0 µl H_2O
- 10,0 µl Mastermix

Die Negativkontrolle bestand aus 10,0 µl H_2O.
Externe Standards dienten zur absoluten Quantifizierung von Zytokin-mRNA im LightCycler (Löffler et al. 2003).

b) LightCycler PCR Protokoll

Initialdenaturierung: 10 min bei 95°C (20°C/s)
Amplifikation:

- Denaturieung: 3 s bei 95°C (20°C/s)
- Annealing: 15 s bei 54°C (20°C/s)
- Extension: 25 s bei 72°C (20°C/s)

Cooling: 3 min bei 40°C (20°C/s)
Es wurden 45 Zyklen durchgeführt.

c) Berechnung der Kopienzahl

Anhand der mitgeführten Zytokin-mRNA Standards berechnete das Computerprogramm Light Cycler 2 die absolute Anzahl mRNA-Kopien der Proben.
Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellzahl, der verwendeten RNA- und cDNA-Mengen und der Verdünnungen wurde die Kopienzahl wie folgt auf $1x10^6$ Zellen berechnet:

$$Z = \frac{K \times 10 \times 3{,}75}{\text{Gezählte Zellzahl}}$$

Z = Zahl der mRNA Kopien je 1 x 10^6 MNC

K = Kopienzahl nach den LightCycler-Zyklen

3.6 Datenaufarbeitung und Statistik

Zur statistischen Analyse bezüglich Differenzen in der Fluoreszenzintensität und der T-Zellproliferation zwischen den Probanden wurde der t-Test verwendet. Die Werte wurden mit der Sigmaplot 2000 Software für Windows berechnet, wobei ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant erachtet wurde. Die im Text genannten Konzentrationen bezeichnen die Mittelwerte, Standardabweichungen werden in Klammern angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Zytokinproduktion im Vergleich zwischen PB und NSB

4.1.1 IFN-γ-Produktion

MNC wurden mit anti-CD3, IL-10, der Kombination aus anti-CD3 und IL-10 oder LPS inkubiert und die IFN-γ-Produktion nach 24h gemessen. Nicht stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Basal lag die IFN-γ-Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Nach Stimulation mit anti-CD3 zeigte sich ein deutlicher Konzentrationsanstieg im PB und im NSB, der im PB mit 2160 pg/ml (SD 487) größer war als im NSB mit 137 pg/ml (SD 237; $p<0,05$). IL-10 induzierte keine IFN-γ-Produktion und hemmte die durch anti-CD3 vermittelte Produktion ($p<0,05$). Die LPS induzierte IFN-γ-Produktion war im NSB mit 32 pg/ml (SD 28) unwesentlich höher als im PB mit 15 pg/ml (SD 18).

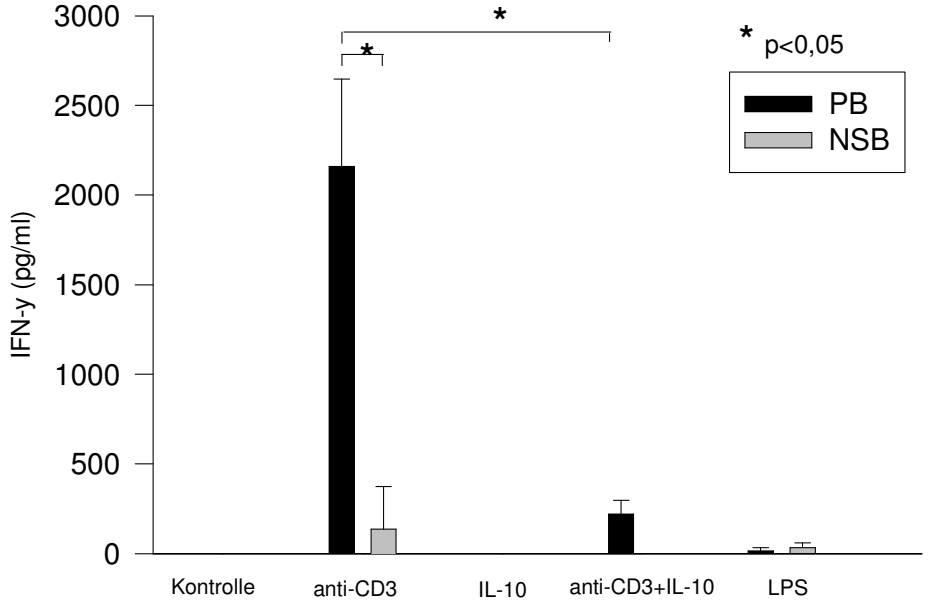

Abb. 7: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IL-10, anti-CD3 + IL-10 und LPS nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=5)

4.1.2 IL-12(p40)-Produktion nach T-Zellstimulation

Die Messung von IL-12(p40) erfolgte über einen Zeitraum von 48h. Die basale IL-12(p40)-Produktion lag unterhalb der Nachweisgrenze. Nach Stimulation mit IFN-γ wurden nach 12h und 24h im PB (2289 pg/ml SD 1200 und 3327 pg/ml SD 1500) höhere Konzentrationen gemessen als im NSB (1032 pg/ml SD 939 und 1374 pg/ml SD 1299). Anti-CD3 induzierte im PB und NSB etwa gleich viel IL-12(p40) und hemmte die durch IFN-γ induzierte Produktion. Nach Zugabe von IL-10 und anti-CD3 lag die IL-12(p40)-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze.

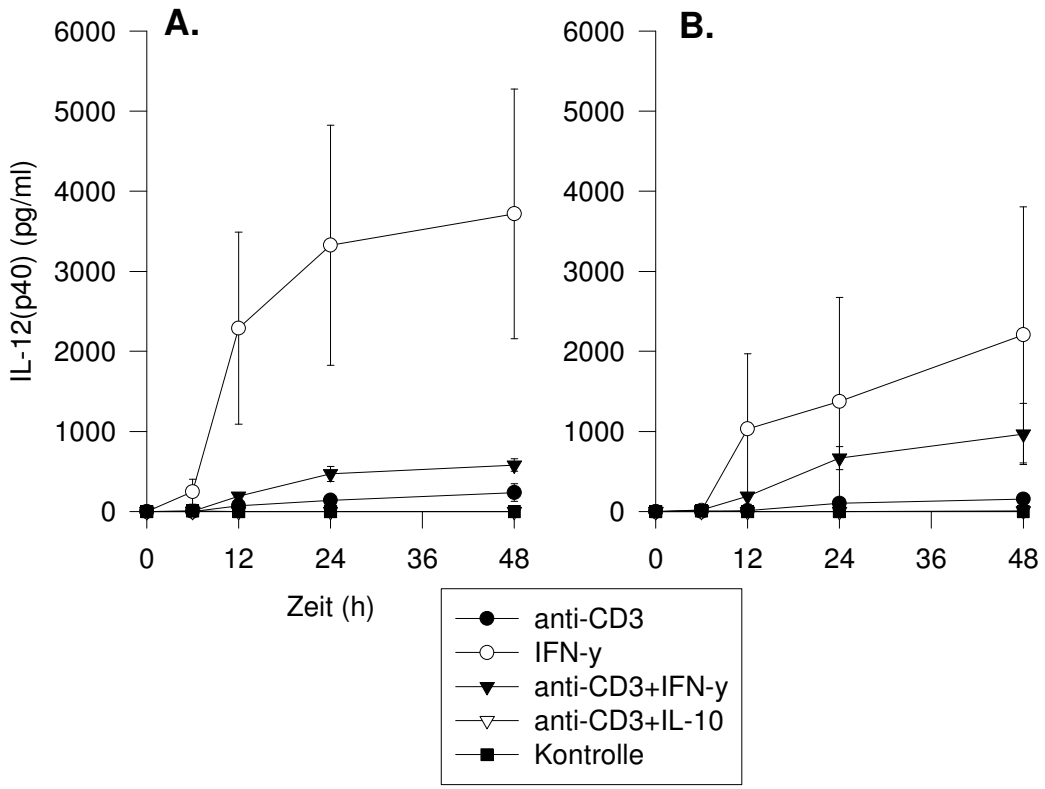

Abb. 8: IL-12(p40)-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IFN-γ, anti-CD3 + IFN-γ und anti-CD3 + IL-10 im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4)

4.1.3 IL-18-Produktion nach T-Zellstimulation

Sowohl die basale als auch die IL-18-Konzentration im NSB lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Die IL-18-Produktion im PB begann nach 12h anzusteigen. Nach Stimulation mit anti-CD3 wurden nach 48h 87 pg/ml (SD 17) gemessen. IFN-γ induzierte kein IL-18 und reduzierte die durch anti-CD3 nach 48h induzierte Produktion auf 62 pg/ml (SD 57).

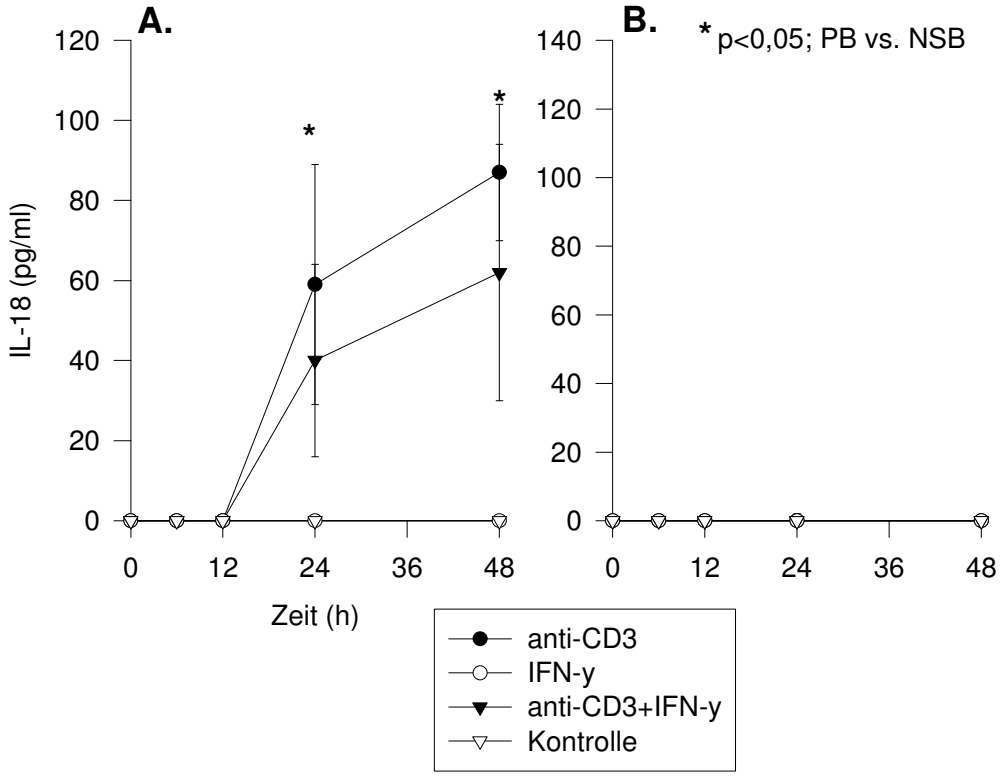

Abb. 9: IL-18-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IFN-γ, anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4)

4.1.4 IL-12(p40)- und IL-18-Produktion nach LPS-Stimulation

Unstimulierte MNC zeigten keine basale IL-12(p40)- oder IL-18-Produktion. Die Produktion von IL-12(p40) lag nach 48h im PB bei 634 pg/ml (SD 183) und im NSB bei 894 pg/ml (SD 300). Der Konzentrationsanstieg von IL-12(p40) begann im PB bereits nach 6h, im NSB erst nach 12h.
Im NSB war keine IL-18-Produktion messbar. Nach 48h wurden im PB 81 pg/ml (SD 18) IL-18 gemessen.

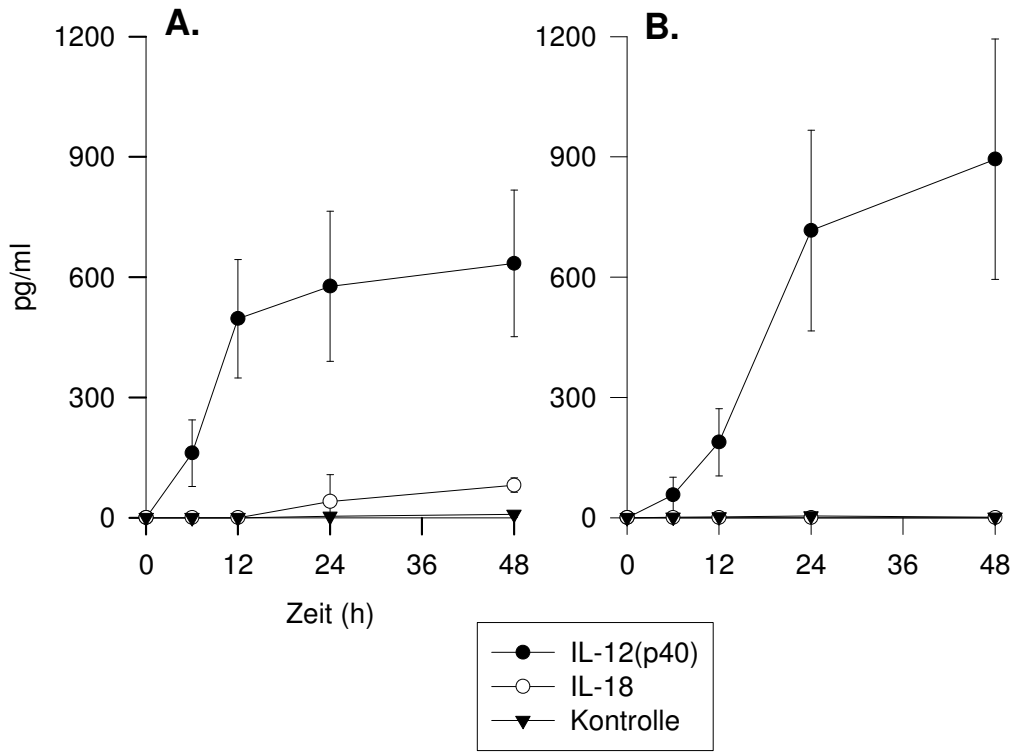

Abb. 10: IL-12(p40)- und IL-18-Produktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4)

4.1.5 Interaktion zwischen IL-12 und IL-18

Die MNC wurden mit IL-18 und/oder anti-CD3 inkubiert und nach 48h wurde die IL-12(p40)-Konzentration gemessen.
In unstimulierten Kulturen wurde kein IL-12(p40) gemessen. IL-18 induzierte im PB und im NSB eine konzentrationsabhängige IL-12(p40)-Produktion. Nach Stimulation mit anti-CD3 wurde im PB (141 pg/ml, SD 31) mehr IL-12(p40) gemessen als im NSB (104 pg/ml, SD 2). Die Kombination von IL-18 und anti-CD3 induzierte im PB 203 pg/ml (SD 87) IL-12(p40) und im NSB 109 pg/ml (SD 50; $p<0,05$).

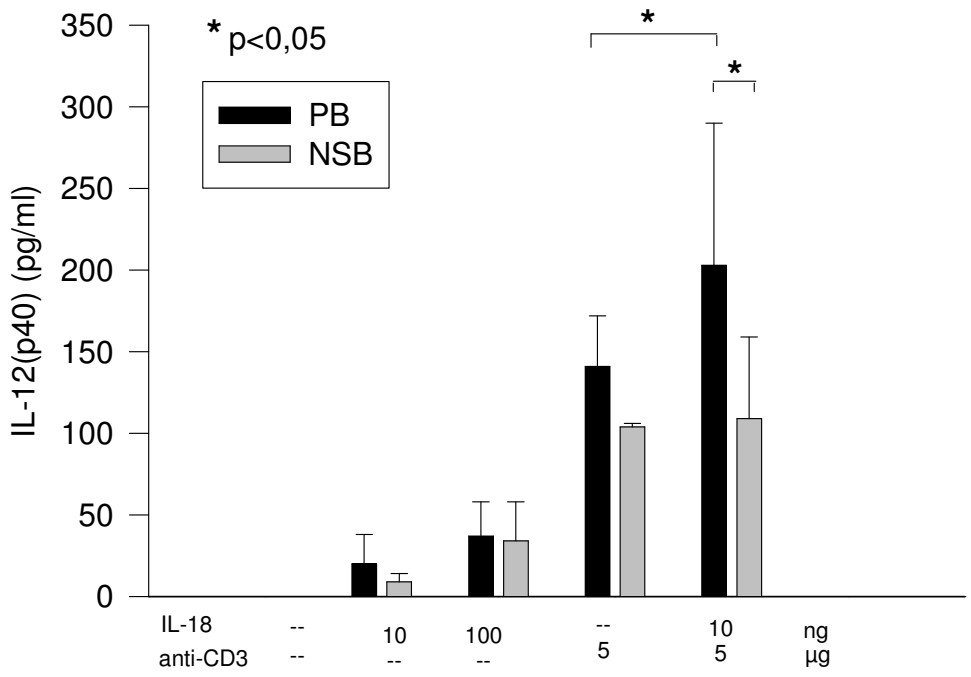

Abb. 11: IL-12(p40)-Produktion nach Stimulation mit IL-18 (10 ng/ml, 100 ng/ml), anti-CD3 und IL-18 + anti-CD3 nach 48h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)

Die MNC wurden mit IL-12 und/oder anti-CD3 inkubiert und nach 48h die IL-18-Produktion gemessen.

In den unstimulierten Kulturen und im NSB lag die IL-18-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Nach Zugabe von IL-12 wurde im PB kein IL-18 gemessen. Anti-CD3 induzierte 87 pg/ml (SD 17) IL-18 und in Kombination mit IL-12 142 pg/ml (SD 111; $p<0,05$).

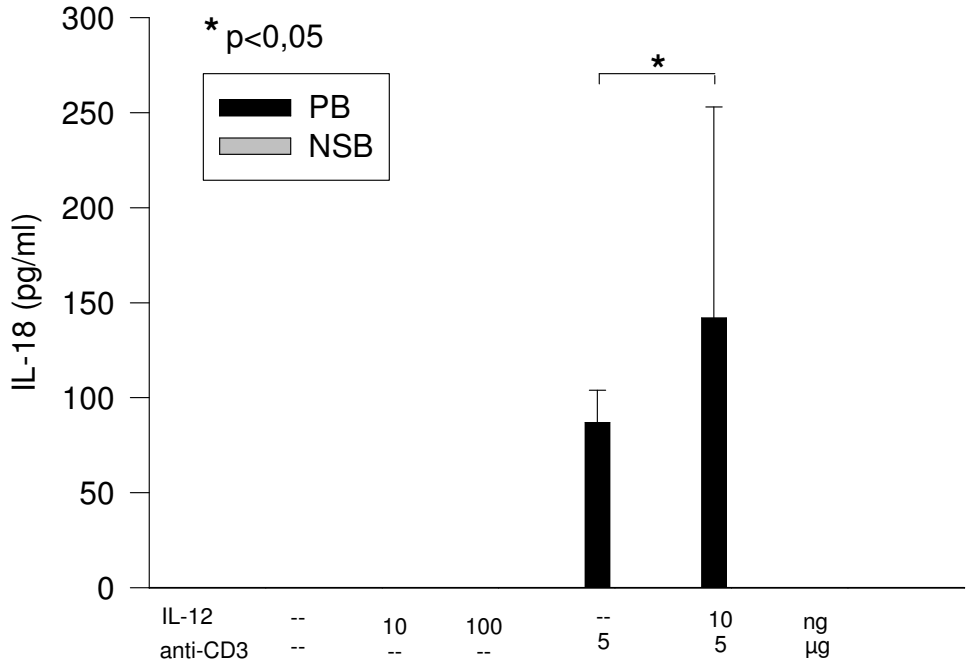

Abb. 12: IL-18-Produktion nach Stimulation mit IL-12 (10 ng/ml, 100 ng/ml), anti-CD3 und IL-12 + anti-CD3 nach 48h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)

Zusammenfassung der Ergebnisse unter 4.1

- ➔ Im NSB wurde weniger IFN-γ nach T-Zell-Stimulation produziert als im PB ($p<0,05$; Abb. 7).

- ➔ Die IL-12(p40)-Produktion nach IFN-γ-Stimulation war im NSB geringer als im PB ($p<0,05$; Abb. 8).

- ➔ Im NSB wurde kein IL-18 gemessen (Abb. 9 und 12).

- ➔ Nach Stimulation der Makrophagen mit LPS unterschieden sich die IFN-γ- und IL-12(p40)-Produktionen im NSB und PB nicht signifikant (Abb. 7 und 10).

- ➔ IL-18 induzierte eine IL-12(p40)-Produktion im PB und NSB, wobei die Kombination mit anti-CD3 einen additiven Effekt hatte ($p<0,05$; Abb. 11).

- ➔ IL-12 induzierte nur in Kombination mit anti-CD3 eine IL-18-Produktion im PB (Abb. 12). Im NSB wurde kein IL-18 gemessen.

4.2 Induzierbarkeit der IFN-γ-Produktion durch IL-12 und IL-18

4.2.1 IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18

Die IFN-γ-Produktion wurde über einen Zeitraum von 48h gemessen, wobei unstimulierte MNC als Kontrollen dienten.

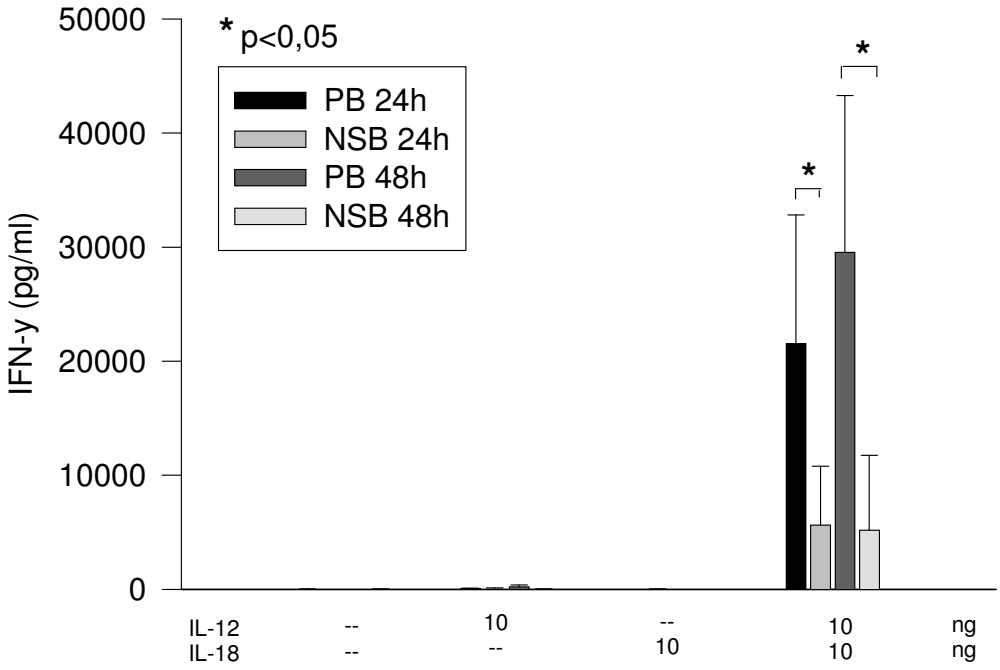

Abb. 13: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 nach 24h und 48h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)

IL-12 und IL-18 induzierten nur eine sehr geringe IFN-γ-Produktion. Die Kombination beider Zytokine resultierte in einem Konzentrationsanstieg, der im PB mit 21533 pg/ml (SD 11272) nach 24h bzw. 29516 pg/ml (SD 13775) nach 48h höher war als im NSB mit 5616 pg/ml (SD 5166) nach 24h bzw. 5166 pg/ml (SD 6578) nach 48h ($p<0,05$). Dabei stieg die IFN-γ-Konzentration im PB nach 24h weiter an, blieb im NSB jedoch nahezu konstant.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob sich ein Dosiseffekt bezüglich der IFN-γ-Produktion zeigt, wenn die MNC mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-12 und IL-18 stimuliert werden.

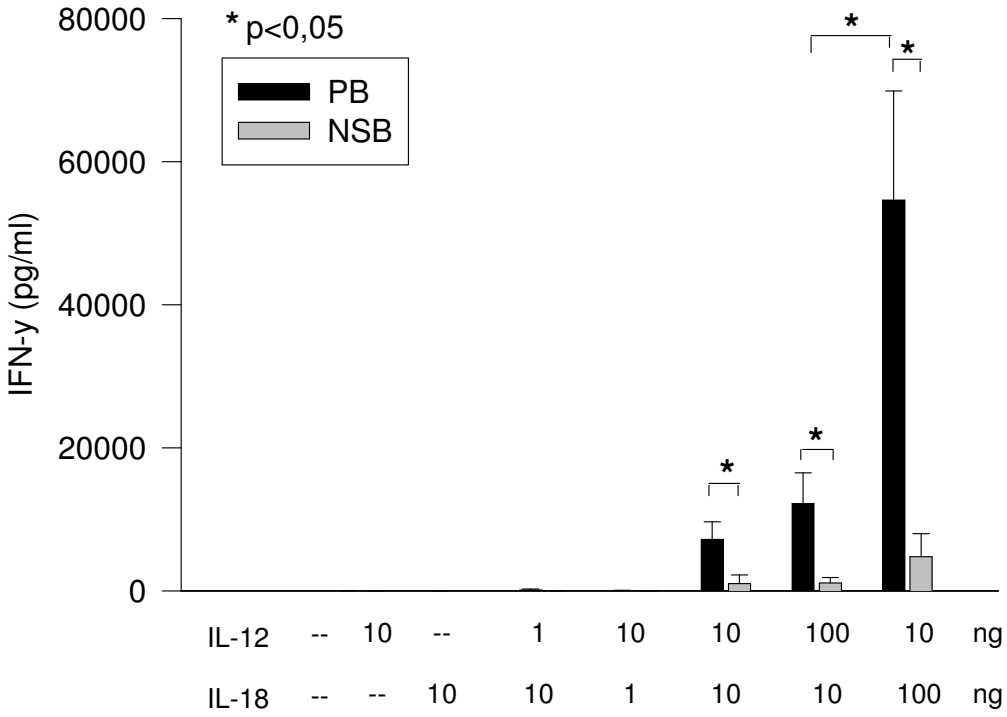

Abb. 14: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 unterschiedlicher Konzentrationen nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)

In der unstimulierten, als Kontrolle dienenden Kultur war keine Zytokinproduktion messbar. IL-12 und IL-18 induzierten nur eine geringe Menge IFN-γ. Die Kombination beider Zytokine zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit, die bei IL-12 weniger stark war, wobei die IFN-γ-Produktion mit zunehmender IL-12- und IL-18-Dosis im PB stärker anstieg als im NSB ($p<0,05$). Dieser Effekt war am ausgeprägtesten bei gleich bleibender IL-12-Konzentration von 10 ng und Erhöhung der IL-18-Dosis von 10 ng auf 100 ng. Die IFN-γ-Produktion stieg da-

nach im PB von 12216 pg/ml (SD 4277) auf 54633 pg/ml (SD 15258) und im NSB von 1133 pg/ml (SD 757) auf 4773 pg/ml (SD 3234).

4.2.2 IFN-γ-Produktion nach Stimulation von IL12, IL-18 und anti-CD3

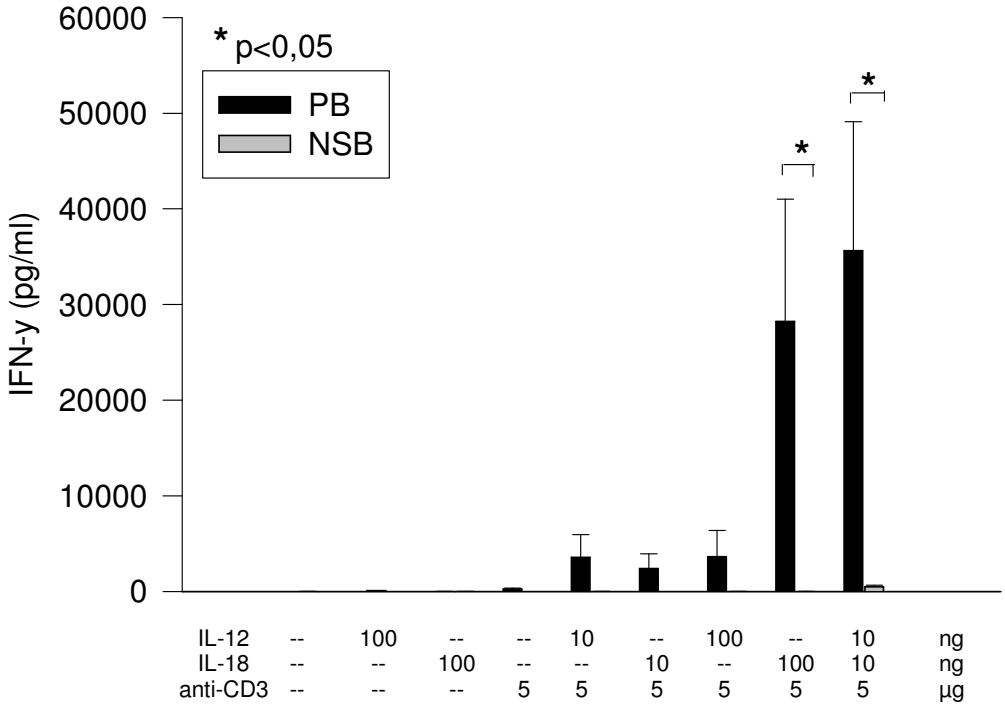

Abb. 15: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12, IL-18 und anti-CD3 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)

IL-12, IL-18 und anti-CD3 induzierten nur eine sehr geringe IFN-γ-Produktion. Nach Kombination von anti-CD3 mit IL-12 oder IL-18 war im PB eine höhere IFN-γ-Konzentration messbar als im NSB ($p<0,05$). Wurde die IL-18-Dosis in Kombination mit anti-CD3 von 10 ng/ml auf 100 ng/ml erhöht, stieg die IFN-γ-Produktion von 2408 pg/ml (SD 1521) auf 28225 pg/ml (SD 12798) an. Die IL-12-Stimulation zeigte im Bereich zwischen 10 ng und 100 ng keinen dosisabhängigen Effekt. Nach Kombination von IL-12, IL-18 und anti-CD3 war die IFN-γ-Produktion im PB mit 35637 pg/ml (SD 13492) höher als im NSB mit 490

pg/ml (SD 147; p<0,05). Anti-CD3 hatte in Kombination mit IL-12 und IL-18 keinen additiven Effekt bezüglich der IFN-γ-Produktion (vgl. Abb. 14).

Zusammenfassung der Ergebnisse unter 4.2

- ➔ Die IFN-γ-Produktion war durch eine Kombination von IL-12 und IL-18 im PB stärker induzierbar als im NSB (p<0,05; Abb. 13).

- ➔ IL-18 zeigte eine dosisabhängige Steigerung der IFN-γ-Produktion, die im PB besonders ausgeprägt war (p<0,05; Abb. 14).

- ➔ Anti-CD3 in Kombination mit IL-12 und IL-18 hatte keinen additiven Effekt auf die IFN-γ-Produktion (Abb. 15).

4.3 Untersuchungen zur IL-10-Produktion

4.3.1 IL-10-Produktion nach T-Zellstimulation

Basal war im PB keine IL-10-Produktion messbar. Anti-CD3 induzierte im PB nach 48h 948 pg/ml (SD 491) IL-10, wohingegen im NSB kein IL-10 messbar war. Nach Stimulation mit IFN-γ war im PB und im NSB kein IL-10 messbar. IFN-γ hatte im PB in Kombination mit anti-CD3 keinen Einfluss auf die durch anti-CD3 induzierte IL-10-Produktion. Im NSB wurden durch diese Kombination 170 pg/ml (SD 76) IL-10 produziert.

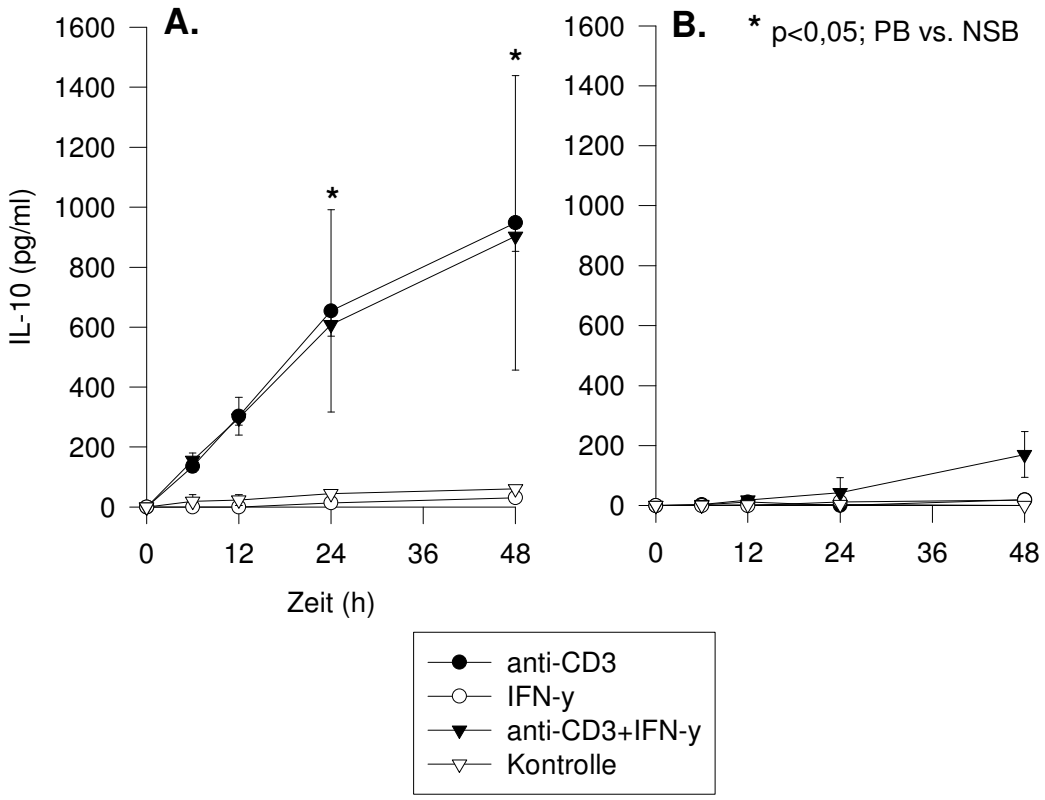

Abb. 16: IL-10-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IFN-γ und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=5)

4.3.2 IL-10-Produktion nach LPS-Stimulation

In der unstimulierten Kontrolle wurde kein IL-10 produziert. Nach Stimulation mit LPS wurden nach 48h im PB 614 pg/ml (SD 48) IL-10 gemessen und im NSB 202 pg/ml (SD 0; $p<0,05$). Dabei stieg die IL-10-Produktion im PB nach 6h an, im NSB erst nach 12h.

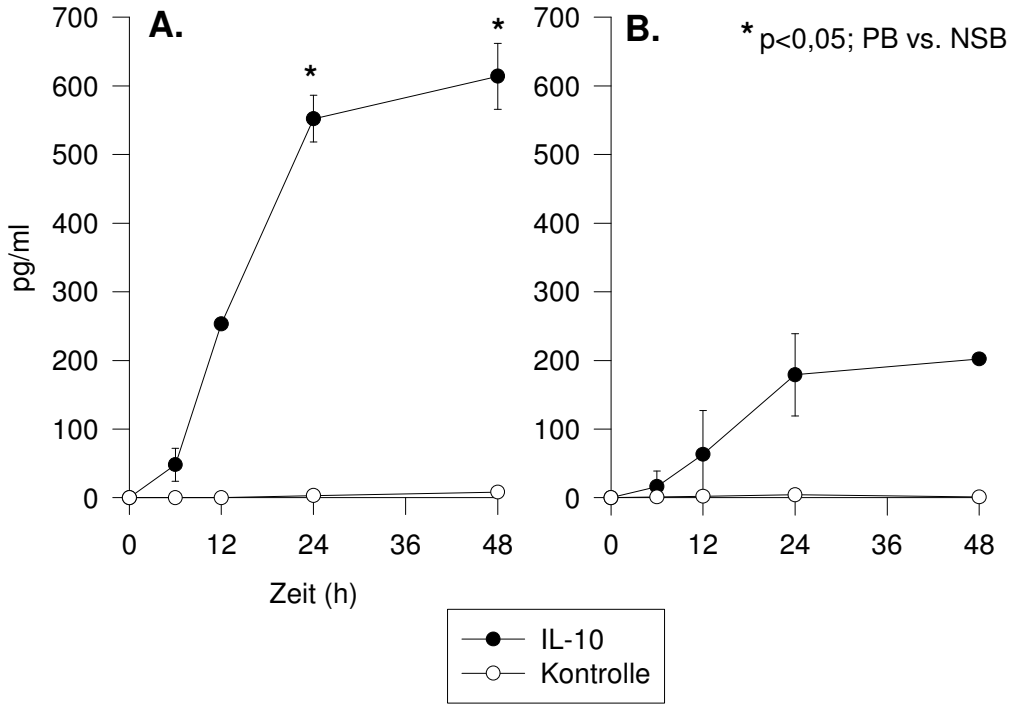

Abb. 17: IL-10-Produktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4)

Zusammenfassung der Ergebnisse unter 4.3

➔ Die IL-10-Produktion war nach T-Zell- und Makrophagen-Stimulation im NSB geringer als im PB ($p<0,05$; Abb. 16 und 17).

➔ Nach Stimulation mit LPS erfolgt der Konzentrationsanstieg im NSB 6h später als im PB (Abb. 17).

4.4 Zytokineffekte bezüglich der CD80-/CD86-Expression und Modulation, des T-Zellüberlebens und der Blastenbildung

4.4.1 CD80/CD86-Modulation auf Makrophagen

Im Folgenden wurde die Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 auf Makrophagen über einen Zeitraum von 2 Tagen untersucht. Unstimulierte Makrophagen dienten dabei als Kontrolle.

a) nach Stimulation mit anti-CD3 und IFN-y

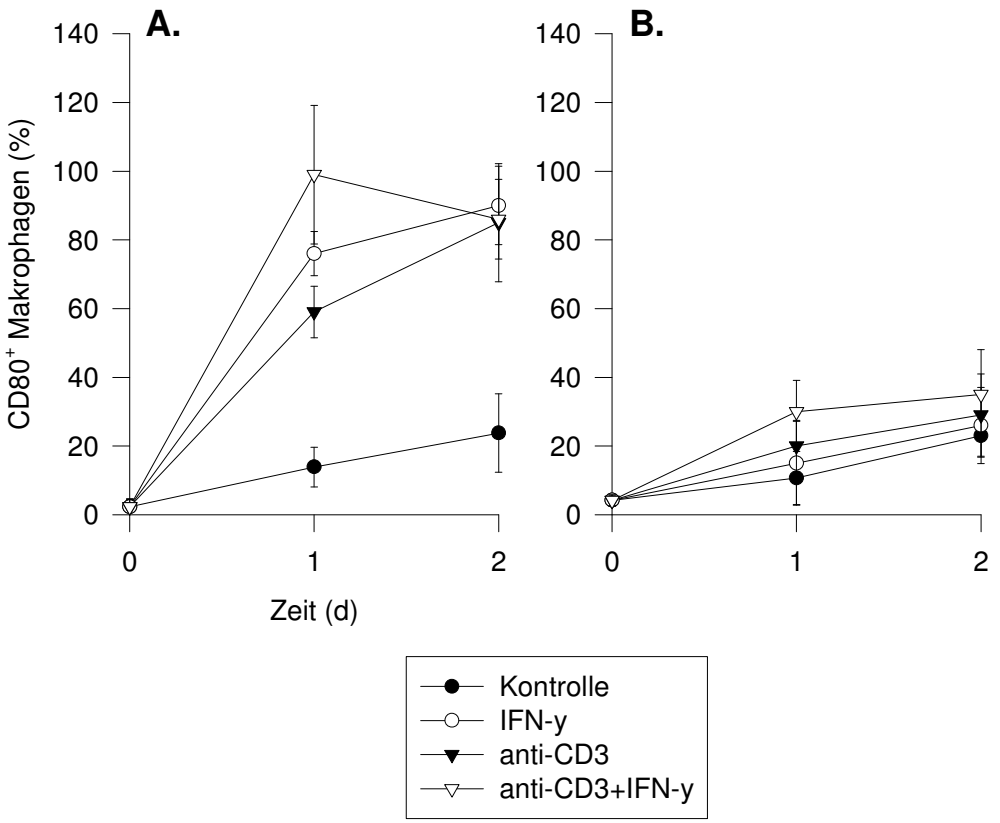

Abb. 18: CD80⁺ Makrophagen nach Stimulation mit IFN-γ, anti-CD3 und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

IFN-γ und anti-CD3 induzierten eine Zunahme der Anzahl $CD80^+$ Makrophagen, die im PB größer war als im NSB. Dabei steigerte die Kombination von IFN-γ und anti-CD3 die Anzahl am deutlichsten nach einem Tag.

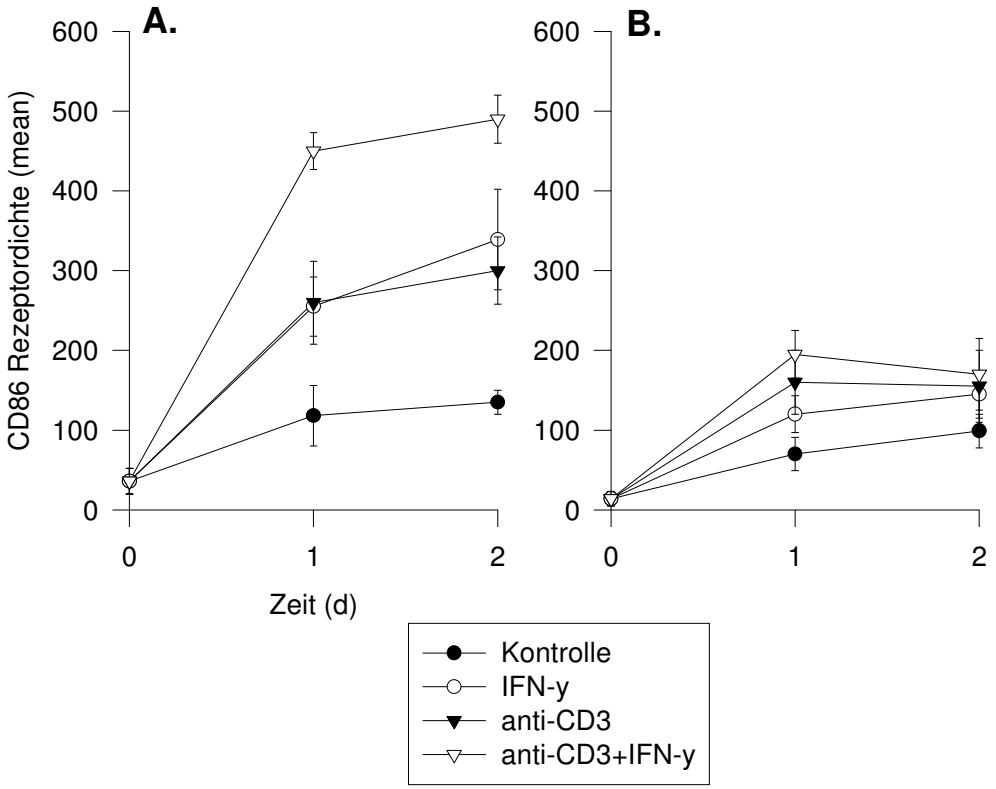

Abb. 19: CD86 Rezeptoren nach Stimulation mit IFN-γ, anti-CD3 und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Die CD86 Rezeptordichte stieg nach Stimulation im PB stärker an als im NSB. Die Kombination von IFN-γ und anti-CD3 hatte den größten Effekt. Im PB stieg die Rezeptordichte im Gegensatz zum NSB über den Zeitraum von 2 Tagen an.

b) nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-12

IL-12 induzierte konzentrationsabhängig eine Zunahme $CD80^+$ neonataler und adulter Makrophagen. Die Anzahl $CD80^+$ Makrophagen war im PB höher als im NSB.

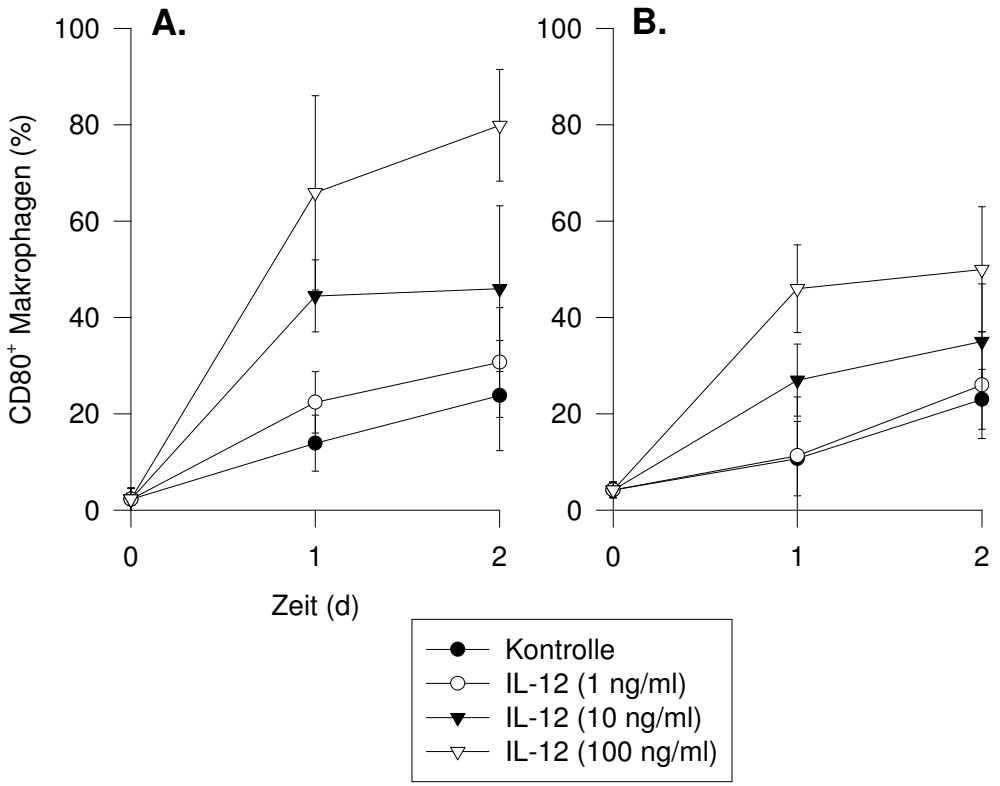

Abb. 20: $CD80^+$ Makrophagen nach Stimulation mit IL-12 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Die CD86 Rezeptordichte war auf Makrophagen von Erwachsenen größer als auf neonatalen Makrophagen. Dabei zeigte sich nur im PB eine Konzentrationsabhängigkeit von IL-12.

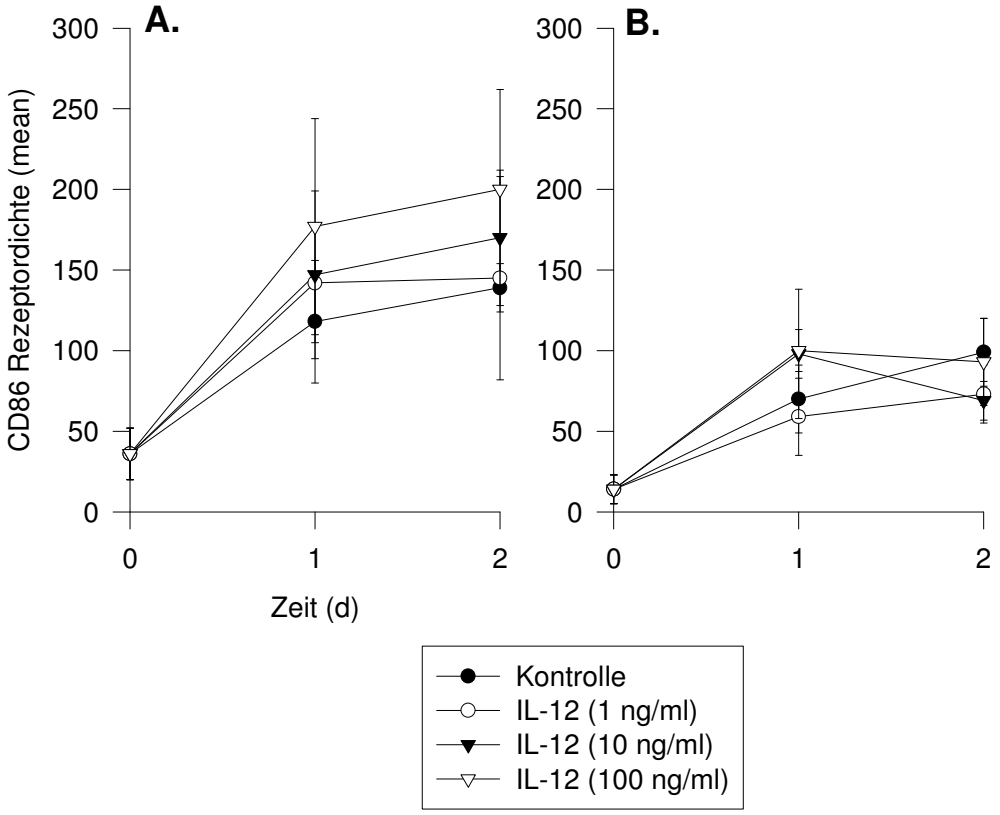

Abb. 21: CD86 Rezeptoren nach Stimulation mit IL-12 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

c) nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-18

Die Zahl $CD80^+$ Makrophagen nach IL-18-Stimulation unterschied sich nach einem Tag zwischen PB und NSB nicht. Am zweiten Tag wurden mehr neonatale $CD80^+$ Makrophagen gemessen. Mit steigender IL-18-Konzentration nahm die Zahl $CD80^+$ Makrophagen zu.

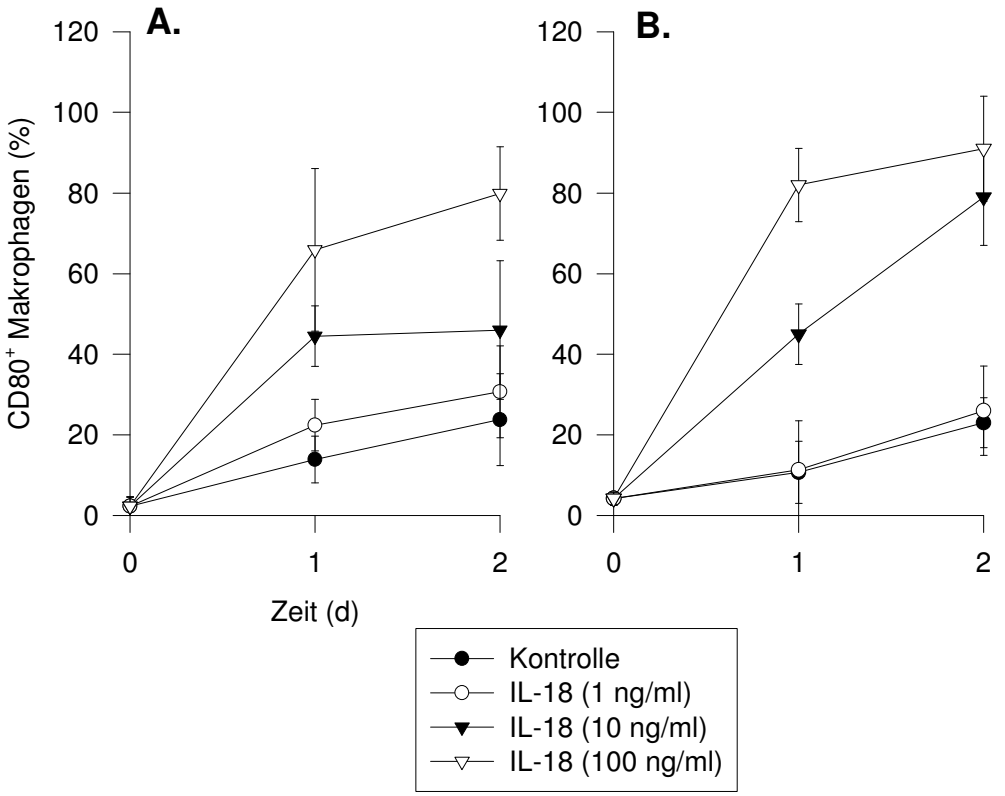

Abb. 22: CD80$^+$ Makrophagen nach Stimulation mit IL-18 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Die Anzahl von CD86 Rezeptoren auf unstimulierten Makrophagen war im PB größer als im NSB. Neonatale Makrophagen zeigten eine deutliche IL-18-dosisabhängige Zunahme der Rezeptordichte.

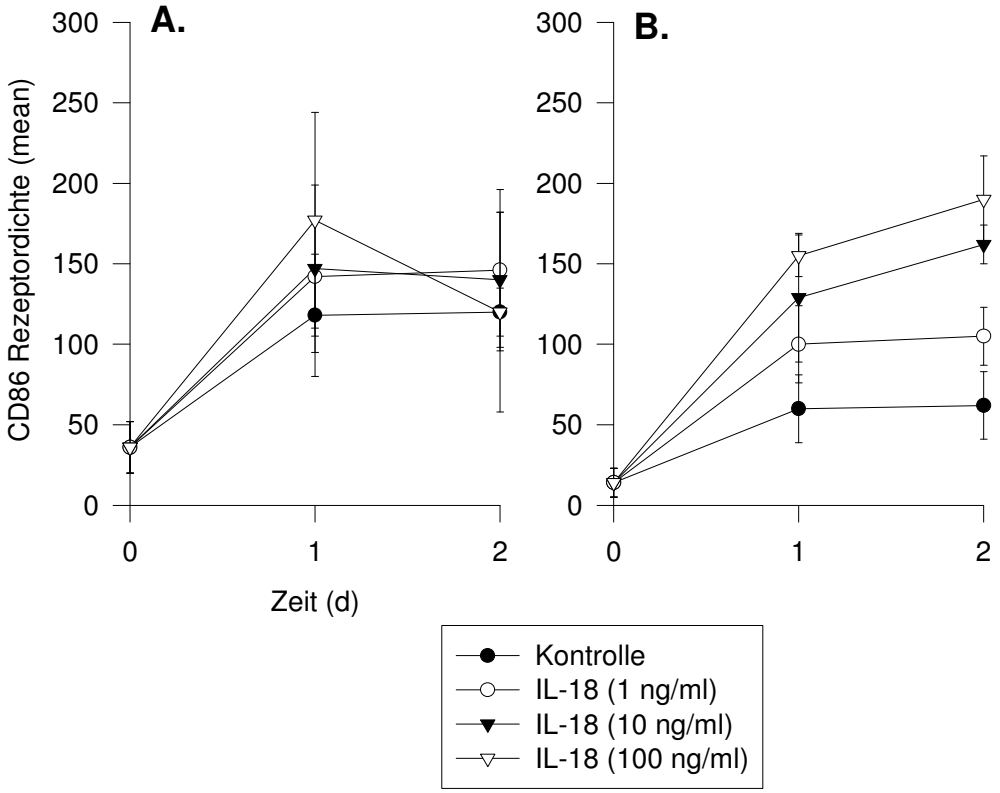

Abb. 23: CD86 Rezeptoren nach Stimulation mit IL-18 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Zusammenfassung der Ergebnisse unter 4.4.1

➔ Die Zunahme der $CD80^+$ Makrophagen und der CD86 Rezeptordichte war nach Stimulation mit IFN-γ, anti-CD3 und deren Kombination im PB größer als im NSB (Abb. 18 und 19).

➔ Die Zahl $CD80^+$ Makrophagen und der CD86 Rezeptordichte zeigte eine Dosisabhängigkeit von IL-12, wobei mit steigender IL-12 Dosis die Zahl $CD80^+$ Makrophagen und der CD86 Rezeptordichte zunahm. Diese Effekte waren im PB deutlicher war als im NSB (Abb. 20 und 21).

➔ Analog zu IL-12 zeigte sich auch eine Dosisabhängigkeit von IL-18. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen PB und NSB (Abb. 22 und 23).

4.4.2 T-Zellüberleben und Blastenbildung

Die Entwicklung der T-Zellzahl und der Blastenbildung wurde über einen Verlauf von drei Tagen verfolgt. Dabei diente die T-Zellzahl und Blastenbildung in unstimulierten Kulturen als Kontrolle.

a) nach Stimulation mit anti-CD3 und IFN-γ

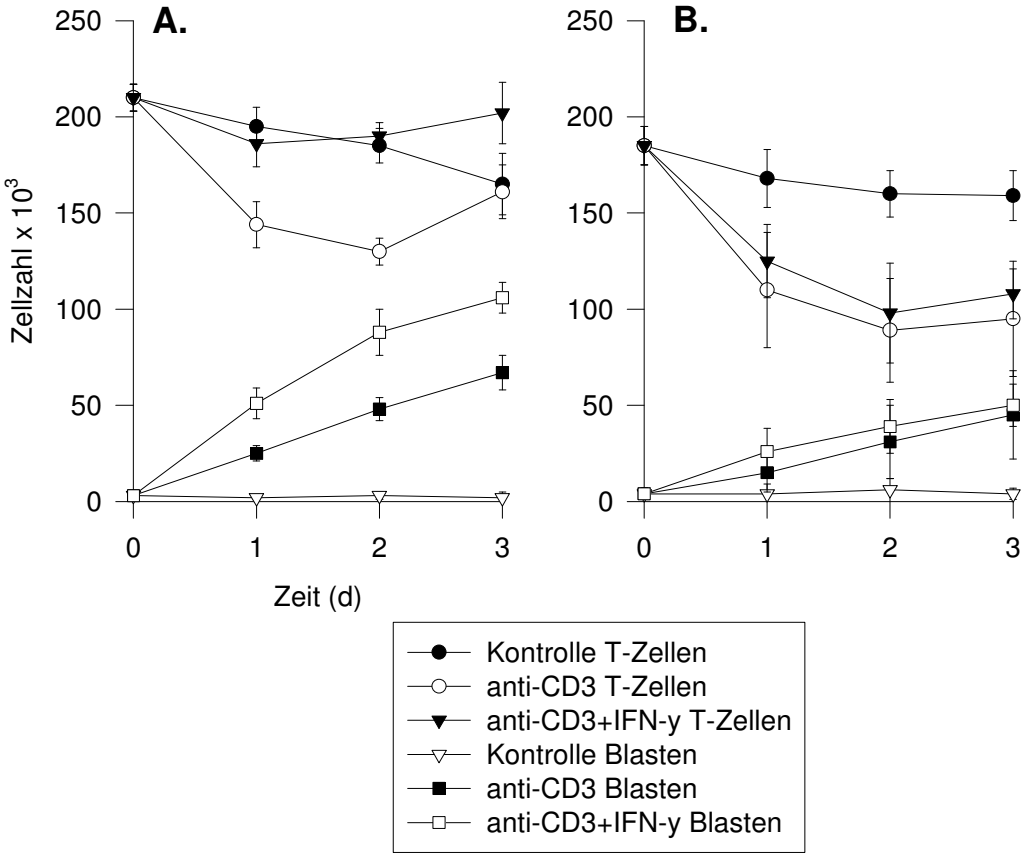

Abb. 24: T-Zellzahl und Blastenbildung nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Nach Zugabe von anti-CD3 fiel die Zahl der T-Zellen sowohl im PB als auch im NSB bis zum zweiten Tag stark ab und begann danach wieder anzusteigen. Wurde IFN-γ in Kombination mit anti-CD3 zugegeben sank im PB die T-Zellzahl

zu Beginn weniger stark als mit anti-CD3-Zugabe. Dieser Effekt von IFN-γ zeigte sich nicht im NSB. Die Blasten proliferierten im PB stärker als im NSB, wobei IFN-γ im NSB nicht zu einer Steigerung führte.

b) nach Stimulation mit IL-12 und anti-CD3

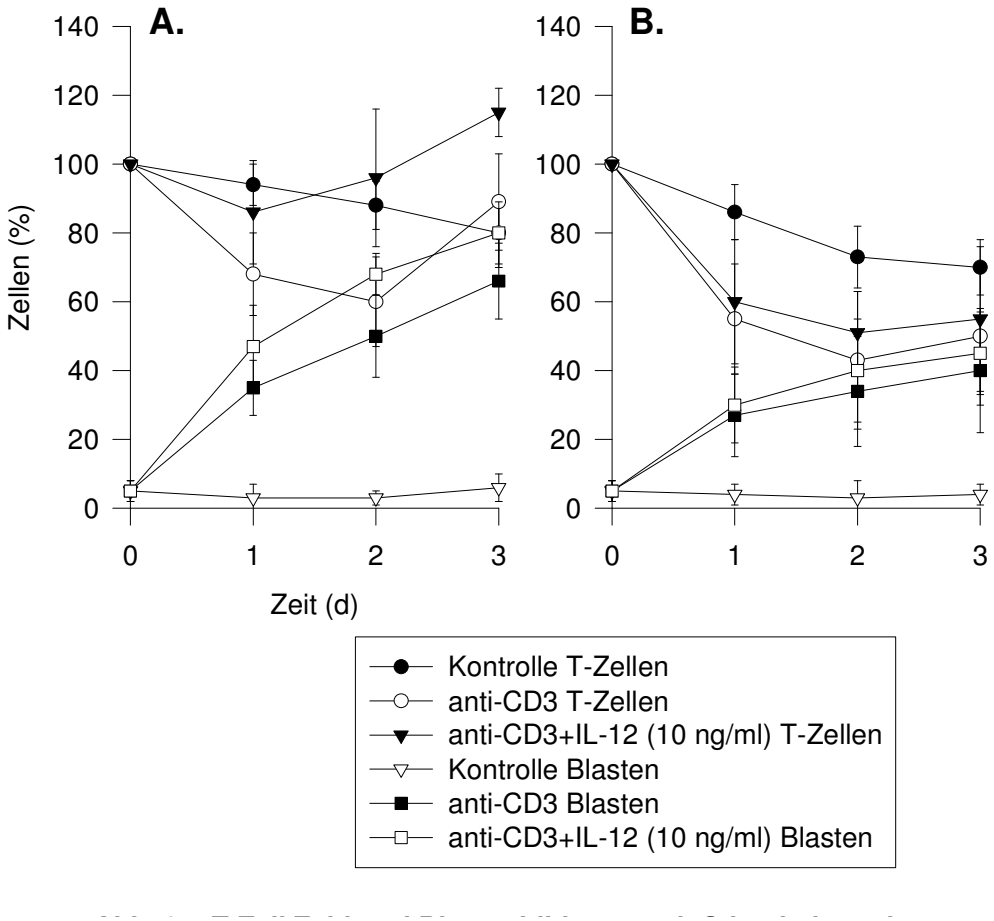

Abb. 25: T-Zellzahl und Blastenbildung nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD3 + IL-12 (10 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Die T-Zellzahl sank nach Kombination von anti-CD3 mit IL-12 weniger stark ab als nach anti-CD3-Zugabe. Dieser Effekt zeigte sich nicht im NSB.
Die Blastenzahl stieg im PB stärker als im NSB an; vor allem nach Stimulation mit anti-CD3 und IL-12 in Kombination.

c) nach Stimulation mit IL-18 und anti-CD3

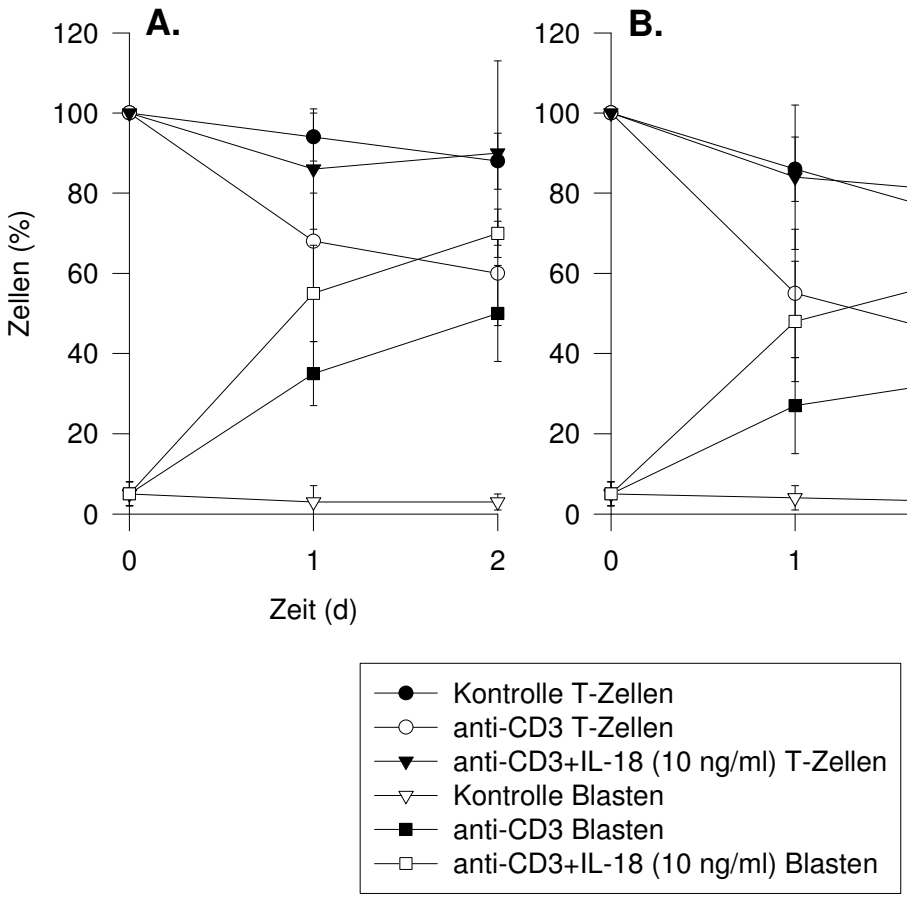

Abb. 26: T-Zellzahl und Blastenbildung nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD3 + IL-18 (10 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)

Nach Stimulation mit anti-CD3 und IL-18 in Kombination war die Zahl initial deletierter T-Zellen geringer als ohne IL-18. Auch die Blastenbildung wurde durch die Kombination von anti-CD3 mit IL-18 verstärkt. Die Effekte waren im PB und im NSB gleich.

Zusammenfassung der Ergebnisse unter 4.4.2

➔ IFN-γ reduzierte die anti-CD3-vermittelte T-Zellzerstörung und verstärkte die Blastenbildung im PB deutlicher als im NSB (Abb. 24).

➔ IL-12 reduzierte die anti-CD3-vermittelte T-Zellzerstörung und verstärkte die Blastenbildung im PB deutlicher als im NSB (Abb. 25).

➔ IL-18 reduzierte die anti-CD3-vermittelte T-Zellzerstörung und verstärkte die Blastenbildung. Die Effekte waren im PB und NSB gleich (Abb. 26).

4.5 Zytokin-mRNA-Synthese

Die MNC wurden mit LPS, anti-CD3, IL-12 oder IL-18 inkubiert und nach 24h wurde die IFN-γ-mRNA-Kopienzahl gemessen. Nicht stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die folgenden Abbildungen (Abb. 27-30) zeigen einen repräsentativen Versuch von dreien.

4.5.1 IFN-γ-mRNA

Basal und nach Stimulation mit LPS war im PB und im NSB nur wenig IFN-γ-mRNA messbar. Anti-CD3 induzierte einen Anstieg der Kopienzahl, der im PB (14815476 Kopien/10^6Zellen) deutlich größer war als im NSB (80991 Kopien/10^6Zellen). IL-18 induzierte im PB nur wenig IFN-γ-mRNA. Nach Zugabe von IL-12 wurde im PB (1891234 Kopien/10^6Zellen) mehr IFN-γ-mRNA gemessen als im NSB (67252 Kopien/10^6Zellen).

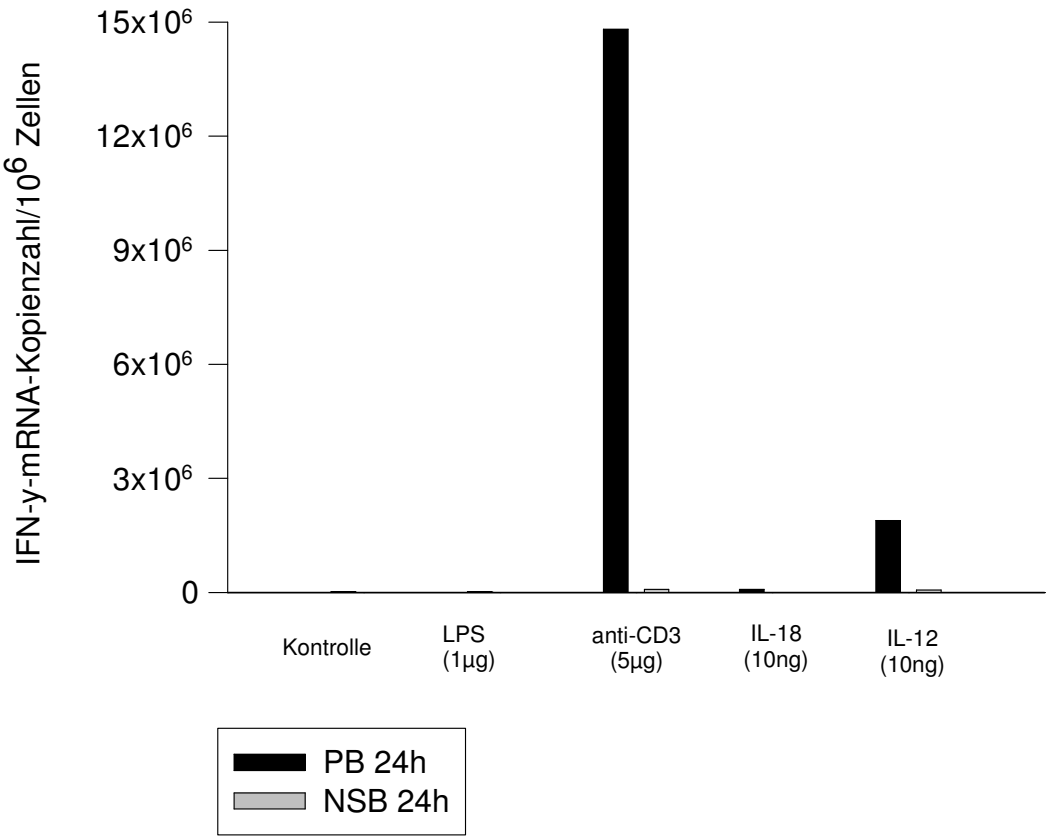

Abb. 27: IFN-γ-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IL-12 und IL-18 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB

4.5.2 IL-12(p40)-mRNA

Unstimulierte MNC im PB und NSB synthetisierten nur eine geringe Menge IL-12(p40)-mRNA. Nach Stimulation mit LPS unterschied sich die mRNA-Kopienzahl im PB und NSB nicht von der durch unstimulierte Zellen produzierten. Anti-CD3 und IFN-γ induzierten im PB 141324 Kopien/10^6Zellen bzw. 85957 Kopien/10^6Zellen, im NSB wurden durch anti-CD3 16317 Kopien/10^6Zellen und durch IFN-γ 16158 Kopien/10^6Zellen induziert.

Nach Stimulation mit IL-18 wurde im PB und NSB gleich viel IL-12(p40)-mRNA produziert.

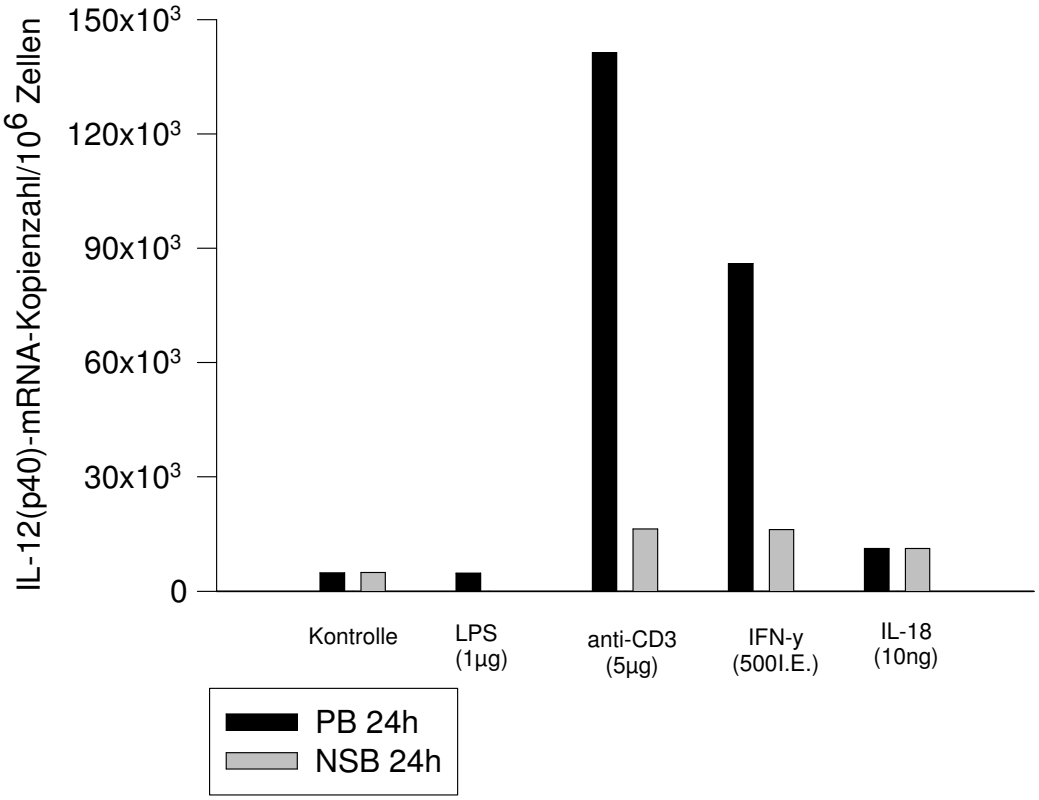

Abb. 28: IL-12(p40)-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IFN-γ und IL-18 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB

4.5.3 IL-18-mRNA

Die MNC des Erwachsenenblutes (PMNC) produzierten unstimuliert 1445 Kopien/10^6Zellen. Die Stimulation mit LPS und anti-CD3 erhöhte die IL-18-mRNA-Produktion auf 2214 Kopien/10^6Zellen bzw. 2298 Kopien/10^6Zellen. Im NSB war keine IL-18-mRNA messbar. IFN-γ induzierte im PB (2784 Kopien/10^6Zellen) deutlich mehr mRNA als im NSB (493 Kopien/10^6Zellen). Die auf die IL-12-Zugabe produzierte Kopienzahl war im PB niedriger als in der Kontrolle, war aber im Vergleich zum NSB höher.

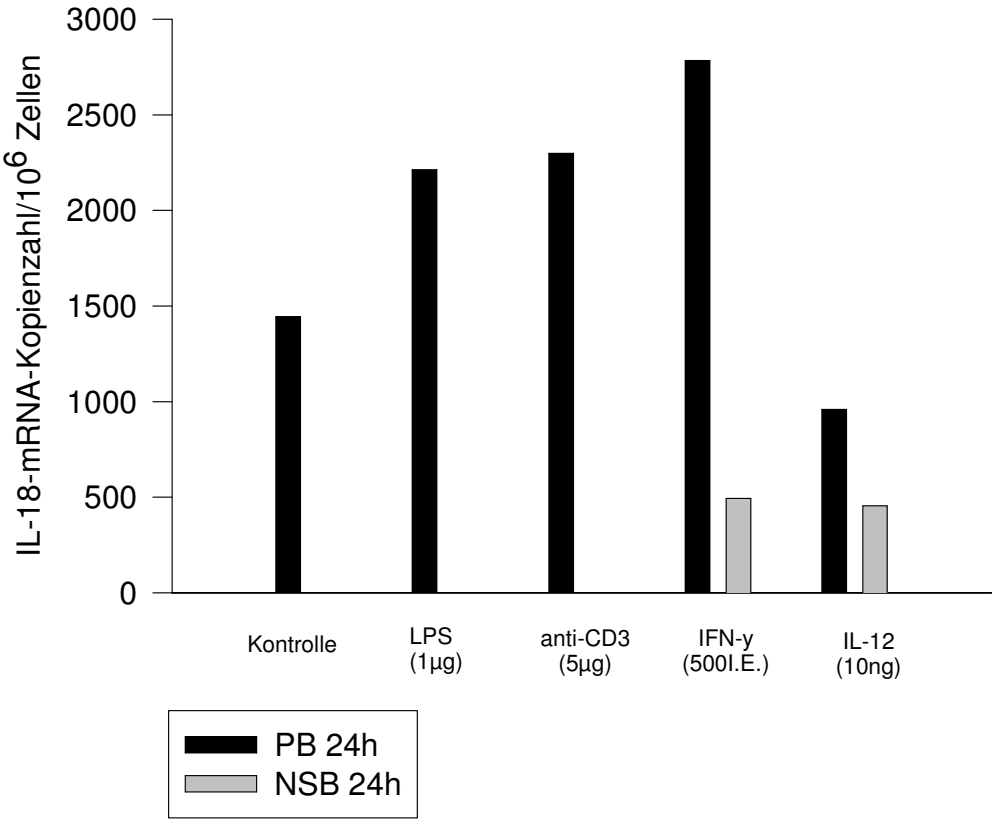

Abb. 29: IL-18-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IFN-γ und IL-12 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB

4.5.4 IL-10-mRNA

Basal wurde im PB IL-10-mRNA gemessen, die nach Stimulation mit LPS nur gering anstieg. Nach Stimulation mit IFN-γ, IL-18 und IL-12 wurde weniger mRNA produziert als basal. Nach Zugabe von anti-CD3 stieg die Kopienzahl auf 12740 Kopien/10^6Zellen an und war deutlich höher als im NSB mit 519 Kopien/10^6Zellen. Im NSB wurde basal und nach Stimulation mit LPS keine IL-10 mRNA gemessen. IL-18 induzierte im NSB mehr IL-10-mRNA als im PB.

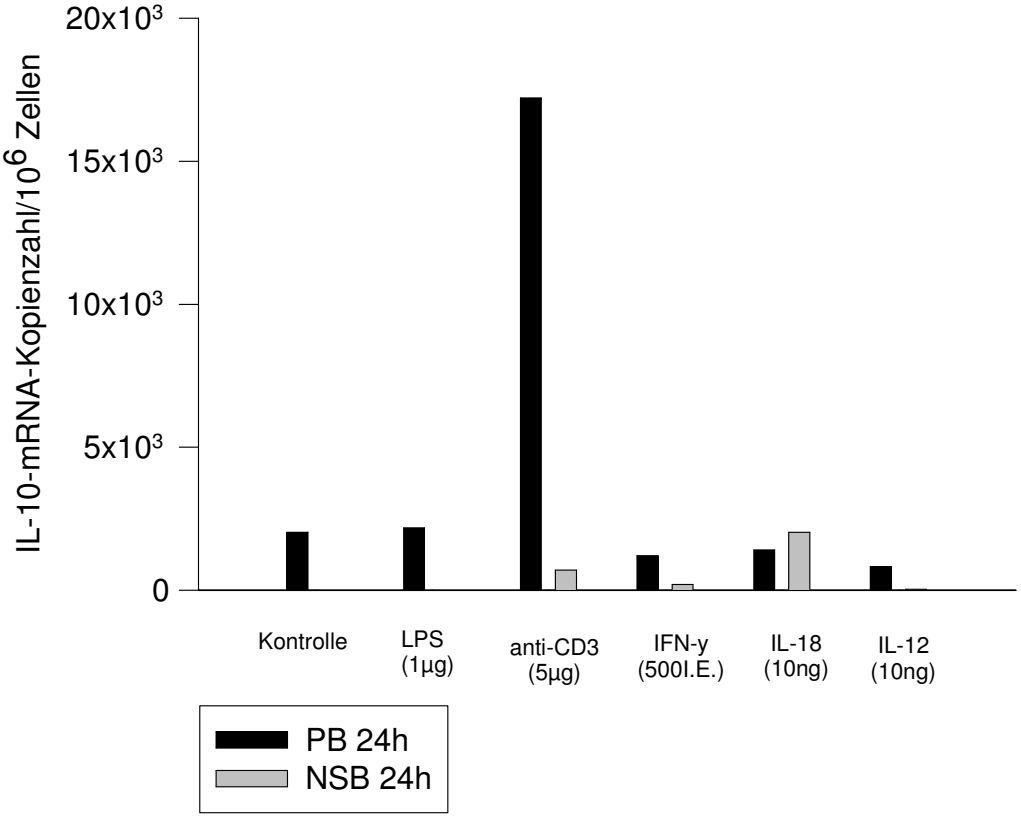

Abb. 30: IL-10-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IFN-γ, IL-18 und IL-12 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB

Zusammenfassung der Ergebnisse unter 4.5

➔ Die mRNA-Expression von IFN-γ, IL-12, IL-18 und IL-10 war nach LPS und anti-CD3 Stimulation im NSB geringer als im PB ($p<0,05$, Abb. 27-30).

➔ Im PB unterschied sich die Menge der IL-18-mRNA unstimulierter MNC nur gering von der stimulierter MNC (Abb. 29).

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorgelegte Arbeit hatte das Ziel, folgende Hypothesen zu untersuchen:

1. Die im Vergleich zum Blut Erwachsener erniedrigte IFN-γ-Produktion im Nabelschnurblut ist auf eine reduzierte Produktion und/ oder verminderte Wirkung von IL-12 und IL-18 zurückzuführen.

   Bisheriges Ergebnis:
   Die IFN-γ-Produktion im Nabelschnurblut war basal und nach Stimulation mit einem T-Zellmitogen (anti-CD3) im Vergleich zum Blut gesunder erwachsener Spender reduziert ($p<0,05$; Abb. 7), was sich bereits auf Transkriptionsebene zeigte (Abb. 27). Auch die Induzierbarkeit der IFN-γ-Produktion durch IL-12 und IL-18 war im NSB schlechter ($p<0,05$; Abb. 13 -15). Die Transkription der Hauptinduktoren IL-12 (Abb. 28) und IL-18 (Abb. 29) war im NSB ebenfalls deutlich reduziert. Die anti-CD3-induzierte IL-18-Sekretion und die IFN-γ-induzierte IL-12(p40)-Sekretion waren im NSB geringer (Abb. 8 und 9). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass beim Neugeborenen nicht nur eine seit längerem bekannte IFN-γ-Minderproduktion besteht (Bryson et al. 1980, Wilson et al. 1986), sondern ebenfalls Defizite bei der IL-12- und IL-18-Sekretion bzw. ihren feedback-Mechanismen gefunden werden.

2. Die T_H2-Lastigkeit des Neugeborenen könnte bei erhöhter IL-10-Produktion im Nabelschnurblut die IFN-γ-, IL-12- und IL-18-Produktionen und -Wirkungen hemmen.

Bisheriges Ergebnis:
Parallel zur verringerten Produktion von IL-12, IL-18 und IFN-γ fand sich im NSB basal und nach Stimulation eine verringerte Produktion von IL-10 (Abb. 16 und 17), was sich auch auf Transkriptionsebene andeutete (Abb. 30). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verringerte Wirkung der oben genannten Zytokine nicht auf einer Mehrproduktion des T_H2-Zytokins IL-10 beruht.

3. Die Zytokinwirkung von IL-12, IL-18 und IFN-γ auf die CD80-/CD86-Expression und die damit verbundene T-Zellaktivierung ist im Nabelschnurblut geringer als im Blut Erwachsener.

   Bisheriges Ergebnis:
   Durch IL-12 und IFN-γ wurden CD80 und CD86 auf neonatalen Makrophagen deutlich weniger hochreguliert als beim Erwachsenen (Abb. 18-21); bei IL-18 zeigte sich hingegen kein Unterschied (Abb. 22 und 23). Damit wurde die Fähigkeit zur makrophagenabhängigen T-Zellstimulation durch anti-CD3 beim Neugeborenen durch Zugabe von IFN-γ und IL-12 nicht deutlich verbessert und erreichte nicht die Werte von Erwachsenen.

5.2 Zytokinproduktion im Vergleich zwischen PB und NSB

5.2.1 IFN-γ

Bereits zu Beginn der 1980iger Jahre wurde gezeigt, dass die IFN-γ-Produktion von T-Zellen in der Neugeborenenperiode verringert ist (Bryson et al. 1980, Taylor & Bryson 1985, Wilson et al. 1986, Frenkel & Bryson 1987, Harris et al. 1992). Unsere Versuchsergebnisse stimmten mit diesen Beobachtungen über-

ein (Abb. 7 und 27). Obwohl die IFN-γ-Rezeptordichte und -konformation neonataler und adulter Makrophagen ähnlich sind (Wakasugi & Virelizier 1985), wurden Defekte in der intrazellulären Signalübermittlung der STAT-Kinasen gefunden (Maródi 2002), welche die verringerte Wirkung von IFN-γ mit erklären könnten.

5.2.2 IL-12

IFN-γ ist beim Erwachsenen ein wirksamer Induktor von IL-12 (Yoshida et al. 1994, Trinchieri 1995). Die Sekretion des biologisch aktiven IL-12(p70) im NSB ist gegenüber der im PB herabgesetzt (Lee et al. 1996, Joyner et al. 2000), was unter anderem auf eine geringere Stabilität der p40-mRNA zurückgeführt wird (Lee et al. 1996). Unsere Ergebnisse zeigten nach Stimulation mit IFN-γ eine verminderte IL-12(p40)-Produktion im NSB gegenüber dem PB (Abb. 8).
Die verringerte IL-12-Produktion im NSB scheint kein auf die Neonatologie beschränktes Phänomen zu sein. Upham et al. (2002) untersuchten bei gesunden Probanden, wie sich die Fähigkeit der T-Zellen zur Produktion des bioaktiven IL-12 während der Kindheit entwickelt. Sie fanden eine gegenüber Erwachsenen geringere IL-12(p70)-Produktion nach Stimulation mit der Kombination aus IFN-γ und LPS im NSB wie auch bei gesunden 5- und 12jährigen Kindern.
Unsere Ergebnisse deuteten an, dass die IL-12(p40)-Produktion nicht generell im NSB herabgesetzt ist. Wie Abb. 10 zu entnehmen ist, ließ sie sich durch eine Makrophagen-Stimulation mit LPS im NSB wie im PB gleich gut induzieren. Dieses Ergebnis stimmte mit dem von Karlsson et al. (2002) überein, welche nach Stimulation mit gram+ und gram- Bakterien der Standortflora (*S. mitis, E. coli* u.a.) eine ähnliche IL-12(p70)-Produktion im NSB und PB nachwiesen. Auch Scott et al. (1997) zeigten, dass die IL-12(p40)- und IL-12(p70)-Produktion von MNC nach Stimulation mit S. aureus, einem gram+ Bakterium, im NSB vergleichbar oder höher war als im PB.
Damit scheint die verringerte IL-12-Produktion nach IFN-γ im NSB ein spezifischer Prozess zu sein, welcher unter anderem nach Stimulation mit T_H1-

Zytokinen auftritt, und könnte einen Schutzmechanismus gegen Hyperinflammationsreaktionen und autoimmune Vorgänge darstellen.

5.2.3 IL-18

Im Gegensatz zum PB war im unstimulierten und stimulierten NSB kein IL-18 messbar (Abb. 9 und 10). Nach 48h Stunden war die IL-18-Produktion im PB am höchsten nach Stimulation mit anti-CD3. IFN-γ hatte im PB einen hemmenden Effekt auf die durch anti-CD3 induzierte IL-18-Produktion, was möglicherweise auf einen negativen feedback-Mechanismus hindeutet (s. u.).
Nakanishi et al. (2001a und 2001b) berichteten, dass IL-18 ohne IL-12 eine T_H2-Immunantwort verstärkt und keine Produktion des T_H1-Zytokins IFN-γ resultiert. Dies deutet darauf hin, dass dem Zytokin IL-18 eine wichtige Rolle in der Steuerung der T-Zellvermittelten Immunantwort zukommt.
Pro-IL-18 wird spontan von MNC in Erwachsenenblut produziert (Puren et al. 1999, Marshall et al. 1999, Manigold et al. 2000), wobei man davon ausgeht, dass pro-IL-18 extrazellulär durch die Caspase-1 in biologisch aktives IL-18 gespaltet wird (Fantuzzi & Dinarello 1999).
Makrophagen produzieren IL-18 nur, nachdem sie zuvor stimuliert wurden (Fantuzzi et al. 1998, Bohn et al. 1998, Shibata et al. 1998, Sanchez-Bueno et al. 1996). LPS induziert die Aktivierung der Caspase-1, die vom pro-IL-18 das biologisch aktive IL-18 abspaltet, was zu einer Sekretion von IL-18 im Erwachsenenblut führt (Gu et al. 1997, Ghayur et al. 1997). Unsere Ergebnisse zeigten eine IL-18-Produktion nach LPS-Stimulation im PB, jedoch nicht im NSB (Abb. 10). Da die LPS vermittelte IL-18-Sekretion abhängig vom CD14 Rezeptor ist (Manigold et al. 2000), der auf der Oberfläche von Makrophagen beim Neugeborenen weniger dicht exprimiert wird als auf Makrophagen des Erwachsenen (Berner et al. 2002), könnte dies ein Erklärungsansatz für die im NSB verminderte LPS-induzierte IL-18-Sekretion sein.

Mögliche weitere Erklärungen wären eine Verminderung der Caspase-1-Produktion, -Aktivität oder biologischen Halbwertszeit beim Neugeborenen. Diese Punkte sind momentan Gegenstand weiterer Experimente.

5.2.4 Induzierbarkeit der IFN-γ-Produktion durch IL-12 und IL-18

Obwohl einige Studien darauf hinweisen, dass IL-12 die IFN-γ-Produktion von T-Zellen reguliert (Kobayashi et al. 1989, Chan et al. 1992, Trinchieri 1993) zeigten unserer Ergebnisse nur eine geringe IL-12 induzierte IFN-γ-Produktion (Abb. 13 -15).
IL-18 konnte weder im PB noch im NSB eine signifikante IFN-γ-Produktion hervorrufen (Abb. 13 -15). Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass für eine optimale IL-18 induzierte IFN-γ-Produktion erst eine Aufregulation von IL-18-Rezeptoren durch IL-12 erfolgen muss (Dinarello 1999, Yoshimoto et al. 1998). Unter Berücksichtigung, dass IL-18 ohne vorherige Hochregulation seiner Rezeptoren durch IL-12 eine T_H2-Antwort induziert (Nakanishi et al. 2001a und 2001b), könnte IL-18 eine Schlüsselrolle in der T-Zelldichotomie zukommen.
Sowohl IL-12 als auch IL-18 sind isoliert nicht in der Lage eine optimale IFN-γ-Produktion zu induzieren, sondern nur die Kombination von IL-12 und IL-18 (Abb. 13-15; Barbulescu et al. 1998, Tominaga et al. 2000). Dieser Synergismus scheint spezifisch auf T_H1-Zellen zu wirken und T_H2-Zellen unbeeinflusst zu lassen (Kohno et al. 1997).

Bei näherer Betrachtung des Signaltransduktionsweges lässt sich der Synergismus von IL-12 und IL-18 bezüglich der IFN-γ-Induktion erklären.
Indem IL-12 an seinen Rezeptor auf der T-Zelloberfläche bindet, induziert es die Phosphorylierung der Tyrosinkinase STAT-3 und STAT-4, die daraufhin im Zellkern an Promotorregionen binden, unter anderem auch die für IFN-γ (Jacobson et al. 1995, Thierfelder et al. 1996). Hierbei scheint vor allem STAT-4 eine entscheidende Rolle zu spielen, da T-Zellen, denen die STAT-4 Kinase

fehlt, kein IFN-γ produzieren und der Phänotyp IL-12(p40)-defizienter Mäuse dem von STAT-4-defizienten Mäusen ähnelt (Thierfelder et al. 1996, Kaplan et al. 1996, Magram et al. 1996).
IL-18 hingegen scheint keinen Einfluss auf die STAT-4-Kinase zu haben, sondern eine Signalkaskade über die IL-1R-assoziierte-Kinase (IRAK), die den Transkriptionsfaktor NF-κB im Zellkern aktiviert, in Gang zu setzten (Robinson et al. 1997). Die Aktivierung der IFN-γ Genexpression resultiert aus einer synergistischen Interaktion der Signaltransduktionswege von IL-12 und IL-18 über STAT-4 und NF-κB (Robinson et al. 1997, Yoshimoto et al. 1998, Barbulescu et al. 1998, Yang et al. 1999), da die IFN-γ Promotorregien sowohl Bindungsstellen besitzt, die durch die IL-12-Signaltransduktionskaskade (Xu et al. 1996), als auch solche, die durch die IL-18 Kaskade aktiviert werden (Adachi et al. 1998, Okamura et al. 1998, Akira 2000, Kanakaraj et al. 1999, Thomas et al. 1999, Kojima et al. 1999). Barbulescu et al. (1998) zeigten, dass Mutationen oder Deletionen an Bindungsstrukturen der Signaltransduktionswege dazu führen, dass $CD4^+$ Zellen kein IFN-γ mehr produzieren können.
Im NSB war die IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 signifikant niedriger als im PB (Abb. 13-15). Diese Ergebnisse stimmten mit denen von Nomura et al. (2001) überein.

Wurden die Zellen zusätzlich mit anti-CD3 stimuliert, war die resultierende IFN-γ-Produktion nicht höher als bei Stimulation mit IL-12 und IL-18 (Abb. 15). Diese Beobachtung stimmt mit Versuchsergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, welche zeigten, dass eine Kombination von IL-12 und IL-18 die IFN-γ-Produktion von T-Zellen synergistisch steigert, ohne dass dazu eine Aktivierung des T-Zellrezeptors erforderlich ist (Yoshimoto et al. 1997, Ahn et al. 1997, Yang et al. 1999, Tominaga et al. 2000) und eine zusätzliche anti-CD3-Zugabe sogar einen hemmenden Effekt auf die IFN-γ-Produktion hat (Yoshimoto et al. 1998).

5.2.5 IL-10

IL-10 ist ein Zytokin, das eine T_H2-Antwort triggert und die Produktion von T_H1-Zytokinen und damit von IFN-γ inhibiert (Abb. 1 und 7). Ein möglicher Grund der verringerten IFN-γ-Produktion und -Wirkung im NSB könnte ein Überwiegen von T_H2-Zytokinen sein. Obwohl die T_H2-Lastigkeit in vielen *in vitro*-Bedingungen nachgewiesen wurde (Zhao et al. 2002, Langrish et al. 2002), wird ihre funktionelle Bedeutung kontrovers diskutiert (Matzinger 2001). Unsere Ergebnisse sprechen gegen eine generelle T_H2-Lastigkeit im Nabelschnurblut, gemessen an der IL-10-Produktion.
Wie der Abbildung 16 zu entnehmen ist, war die IL-10-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3 im NSB niedriger als im PB. Nach Zugabe von IFN-γ war weder im PB noch im NSB IL-10 messbar, was den hemmenden Effekt von IFN-γ auf die IL-10-Produktion zeigte (Abb. 1).
Splawski et al. (1998) zeigten, dass $CD4^+$ T-Zellen aus dem NSB weniger IL-10 produzieren als solche von Erwachsenen. Auch die Untersuchungen von Chheda et al. (1996) unterstützen unsere Ergebnisse einer verringerten IL-10-Produktion im NSB nach T-Zellstimulation.
Hingegen zeigte sich bei den Versuchen von Rainsford & Reen (2002), die die IL-10-Produktion naiver T-Zellen im Vergleich zwischen NSB und PB untersuchten, dass selbige im NSB größer war. Allerdings gab es im Vergleich zu der von uns verwendeten Methode einige, für die verschiedenen Ergebnisse möglicherweise ursächliche, Unterschiede. Die Arbeitsgruppe um Rainsford verwendete aufgereinigte naive T-Zellen in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen und stimulierte sie neben anti-CD3 zusätzlich mit IL-2 und maß die Zytokinproduktion erst nach 6 Tagen.

Nach einer Stimulation der Makrophagen mit LPS zeigte sich im PB eine signifikant höhere IL-10-Produktion als im NSB (Abb. 17). Langrish et al. (2002) wiesen bei dendritischen Zellen im NSB nach Stimulation mit LPS ebenfalls eine verminderte IL-10-Produktion im Vergleich zum Erwachsenen nach.

Andere Studien stehen mit unseren Ergebnissen im Widerspruch. So konnten Chipeta et al. (2000) und Goriely et al. (2001) vergleichbare Level von IL-10 nach LPS-Stimulation im PB und NSB messen. Karlsson et al. (2002) verglichen die Zytokinproduktion von $CD14^+$ Zellen im PB und NSB nach Stimulation mit verschiedenen gram+ und gram- Bakterien (*S. mitis*, *E. coli* u.a.) und fanden eine vergleichbare IL-10-Produktion im NSB und PB. Sie wiesen jedoch auf eine deutliche individuelle Variation der Zytokinproduktion nach Stimulation mit bakteriellem Antigen hin.

5.3 Zytokineffekte auf den Makrophagenphänotyp, die T-Zellproliferation und die Blastenbildung

Bei Makrophagen von erwachsenen Spendern wird die CD80 und CD86 Rezeptorexpression durch IFN-γ induziert (Freedman et al. 1991, Hathcock et al. 1994), was auch in dieser Arbeit nachgewiesen wurde (Abb. 18 und 19). Neonatale Makrophagen zeigten ein deutlich vermindertes Ansprechen auf IFN-γ und anti-CD3 in Form einer geringeren Expression von CD86 und CD80 Rezeptoren (Abb. 18 und 19), obwohl die IFN-γ-Rezeptordichte und -Affinität für den spezifischen Liganden auf neonatalen und adulten Makrophagen vergleichbar sind (Maródi et al. 1994). Die Bindung von IFN-γ an seinen Rezeptor verursacht eine Phosphorylierung von STAT-1 (Darnell et al. 1994, O´Shea 1997, Decker & Kovarik 2000). Maródi et al. (2001) berichteten über eine schlechtere Phosphorylierung von STAT-1 in neonatalen Makrophagen im Vergleich zu adulten Makrophagen als Antwort auf IFN-γ. Dies kann eine mögliche Ursache für die verminderte Wirkung von IFN-γ auf die Makrophagenaktivierung im Sinne einer geringeren Expression kostimulatorischer Moleküle sein. Auch nach Stimulation mit IL-12 war die dosisabhängige Zunahme der Rezeptorexpression auf neonatalen Makrophagen signifikant geringer ausgeprägt (Abb. 20 und 21). Bei der Aktivierung von T-Zellen wirkt IL-12 über die Phosphorylierung von STAT-3 und STAT-4 (Jacobson et al. 1995, Thierfelder et

al. 1996). Möglicherweise gibt es auch hier beim Neugeborenen Defizite in der Fähigkeit zur Phosphorylierung dieser Kinasen.
Mit steigender IL-18-Konzentration nahm die Rezeptordichte auf den Makrophagen zu und zeigte im Gegensatz zu den durch IFN-γ- und IL-12-induzierten Effekten keinen signifikanter Unterschied zwischen neonatalen und erwachsenen Makrophagen. Dies könnte darauf hindeuten, dass IL-18 ein wichtiger Faktor für die kostimulatorische Fähigkeit neonataler Makrophagen ist.

Besteht ein Mangel an kostimulatorischen Signalen, führt dies zur Anergie oder Apoptose von T-Zellen (Schwartz 1992, Janeway & Bottomly 1994). Wang et al. (1998) und Orlikowsky et al. (1999) zeigten, dass die Aktivierung von T-Zellen über anti-CD3 von der Anzahl von Makrophagen und der Fähigkeit zur Hochregulation von B7 Molekülen abhängt.
Nach Zugabe von anti-CD3 fiel die Zahl der T-Zellen sowohl im PB als auch im NSB durch aktivierungsinduzierten Zelltod zunächst stark ab. Im PB stieg sie durch klonale Expansion anders als bei neonatalen T-Zellen ab 48h wieder an. Bei gleichzeitiger Gabe von IFN-γ hatte dies im PB eine protektive Wirkung auf die T-Zellen bei gleichzeitig vermehrter Expression von CD80 und CD86 (Abb. 18, 19 und 24). Die Blastenbildung war nach IFN-γ-Zugabe im NSB ebenfalls niedriger als im PB (Abb. 24).
Papadogiannakis et al. (1986) wiesen einen signifikant geringeren mitogenen Effekt von anti-CD3 auf NSB T-Lymphozyten im Gegensatz zu PB T-Lymphozyten nach und zeigten, dass neonatale Marophagen einen direkt hemmenden Effekt auf die anti-CD3-vermittelte Lymphozytenproliferation haben.
Hunt et al. (1994) und Matthews et al. (2000) zeigten, dass neonatale T-Zellen, die mit neonatalen DC stimuliert wurden, nur gering proliferierten, jedoch eine ebenso starke Proliferation wie erwachsene T-Zellen zeigten, wenn sie mit erwachsenen DC stimuliert wurden. Auch die IFN-γ-Produktion neonataler T-Zellen ließ sich verbessern, wenn sie mit erwachsenen APC kultiviert wurden (Taylor & Bryson 1985, Trivedi et al. 1997, Delespesse et al. 1998).

Die Kombinationen von anti-CD3 und IFN-γ (Abb. 24) sowie von anti-CD3 und IL-12 (Abb. 25) induzierten, nach anfänglicher Deletion, bereits nach 24h eine zunehmende T-Zellproliferation im PB und eine deutliche Steigerung der Blastenbildung. Diese Effekte waren im NSB signifikant geringer ausgeprägt.
IL-18 hatte einen deutlich aktivierenden Effekt auf neonatale T-Zellen. Sowohl die anfängliche Deletion und anschließende Proliferation der T-Zellen als auch die Blastenzahlen unterschieden sich im PB und NSB nicht signifikant (Abb. 26). Eine Substitution von IL-18 beim Neugeborenen könnte damit zu einer Verbesserung der T-Zellaktivierung und -funktion beitragen.

5.4 mRNA-Produktion der Zytokine IFN-γ, IL-12, IL-18 und IL-10

Analog zur im Vergleich zum PB verminderten Proteinsekretion von IL-12, IL-18 und IL-10 im NSB, war im NSB die mRNA-Produktion nach Stimulation mit LPS geringer als im PB (Abb. 27 - 30).
Zur Bestimmung der Zytokin-mRNA von IFN-γ, IL-12, IL-18 und IL-10 wurden drei Versuche durchgeführt, die tendenziell dieselbe Aussage zuließen. Von ihnen wurde ein repräsentativer Versuch dargestellt (Abb. 27-30). Unsere Ergebnisse weisen auf eine Regulation auf Transkriptionsebene hin. Allerdings bedarf es zur Klärung dieser Fragestellung noch weiterer Untersuchungen.
Lee et al. (1996) bestimmten mittels Northern Blot die IL-12(p40)-mRNA-Expression nach LPS-Stimulation, die im NSB signifikant geringer war als im PB. Joyner et al. (2000) untersuchten die IL-12(p40)- und IFN-γ-mRNA-Expression nach Stimulation gemischter Mononukleärer Zellen mit den gram+ B Streptokokken. Nach 4h und 6h war im NSB mehr IL-12(p40)-mRNA messbar, nach 12h und 18h verhielt es sich umgekehrt. Die IFN-γ-mRNA-Expression war im PB nach 18h größer als im NSB. Schultz et al. (2004) maßen in LPS-stimulierten Vollblutkulturen weniger IL-10-mRNA und IL-10-Protein im Blut Neugeborener als im Blut Erwachsener, was unsere Ergebnisse stützt.
Da sich bereits auf Transkriptionsebene ein deutlicher Unterschied in der Produktion der Zytokin-mRNA zwischen PB und NSB zeigt, kann vermutet werden,

dass die Ursache der unterschiedlichen Zytokinproduktion auf oder vor der Transkriptionsebene, z. B. im Bereich der Signaltransduktion, liegt.

5.5. Zytokine im klinischen Zusammenhang

Aufgrund der im Vergleich zum Erwachsenen erhöhten Infektanfälligkeit des Neu- und Frühgeborenen bezeichneten Burgio et al. (1987) die Neugeborenenzeit auch als Zeit der „physiologischen Immundefizienz".
Während der Schwangerschaft regulieren Zytokine die Hämatopoese, schützen den Fetus vor Abstoßung durch die Mutter, modulieren die Immunabwehr bei Infektionen und dienen als extra-hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Slayton 2000).
Ein Teil der mütterlichen Immuntoleranz gegenüber dem Feten während der Schwangerschaft resultiert in einem IFN-γ-Mangel des Neugeborenen (Nesin & Cunningham-Rundles 2000). Die Überproduktion von T_H2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 während der Schwangerschaft beeinflusst das mütterliche Immunsystem, indem die zelluläre Immunantwort unterdrückt wird, um eine Abstoßung des Feten zu verhindern (Lin et al. 1993).
Ein Überwiegen von T_H2-Zytokinen ist charakteristisch für eine normale Schwangerschaft, während eine Imbalance zugunsten von T_H1-Zytokinen in pathologischen Schwangerschaften beobachtet wurde (Wegmann et al. 1993, Marzi et al. 1996).

Die neonatale Sepsis mit ihren Folgen stellt nach wie vor eine der Haupttodesursachen von Frühgeborenen dar und bestimmt maßgeblich über das Outcome von Kindern mit sehr geringem Geburtsgewicht (Martinot et al. 1997, Stoll et al. 1996). Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass dieser Entzündungsprozess wesentlich von bestimmten Zytokinen gesteuert wird (Gomez et al. 1998, Dammann & Leviton 1997, Sáez-Llorens & McCracken 1993).
Proinflammatorische Zytokine führen zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort und werden von nachfolgend produzierten antiinflammatorischen

Zytokinen (z. B. IL-10 und IL-13) reguliert, indem diese die Produktion von Makrophagen hemmen (Slayton 2000). Dieser Mechanismus dient der Vermeidung von Hyperinflammationsreaktionen, die im Fall einer Imbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen während einer Entzündungsreaktion zu schweren Krankheiten des Neugeborenen führen können. So kann beispielsweise eine überschießende Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 und IFN-γ) in der Neugeborenenperiode zu intravasalen Koagulopathien, hämorrhagischen Nekrosen und zum Tod durch Schock führen (Bone et al. 1997, Powell 2000).
Halpern et al. (2003) beschrieben einen zytokingesteuerten Rückkopplungsmechanismus zwischen Leber und Darm bei der Entstehung und dem Fortschreiten einer Nekrotisierenden Enterokolitis im Neugeborenenorganismus. Hierbei wurde vor allem ein Überwiegen proinflammatorischer Zytokine wie IL-12, IL-18 und TNF-α hervorgehoben.
Möglicherweise ist aber nicht nur ein Überwiegen proinflammatorischer Zytokine eine mögliche Ursache von Inflammation, sondern auch ein gleichzeitiger Mangel an antiinflammatorischen Zytokinen. Die Ergebnisse unserer Versuche, nämlich die von uns gemessene verringerte IL-10-Produktion im NSB (Abb. 16 und 17), könnten in diese Richtung deuten.

Die Gewebsverhältnisse in vivo werden sowohl durch Zeitpunkt und Muster der sezernierten Zytokine, als auch durch die Empfindlichkeit des jeweiligen Gewebes bestimmt. Eine eventuelle Zytokindysbalance könnte durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit des umliegenden Gewebes möglicherweise wieder ausgeglichen werden.
Zusammengefasst fügen sich unsere Ergebnisse in folgendes Denkmodell ein, welches derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen ist:
Im neonatalen Immunsystem liegt keine primäre Dysbalance vor, sondern eine, im Vergleich zum Erwachsenen, eingeschränkte Modulationsfähigkeit zur proinflammatorischen Seite – gemessen an der Produktion und Wirkung von IL-12, IL-18 und IFN-γ – sowie zur antiinflammatorischen Seite – gemessen an der IL-10-Produktion und –Wirkung.

Unter teleologischen Gesichtspunkten könnte man die hier vorgestellten Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass sie mit folgender Hypothese kompatibel sind: Beim Feten und auch noch beim Neugeborenen wird eine eingeschränkte Reaktion gegenüber Fremdeiweißen in Kauf genommen, um einen Schutz des eigenen Gewebe bzw. die Verhinderung einer Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem zu ermöglichen.

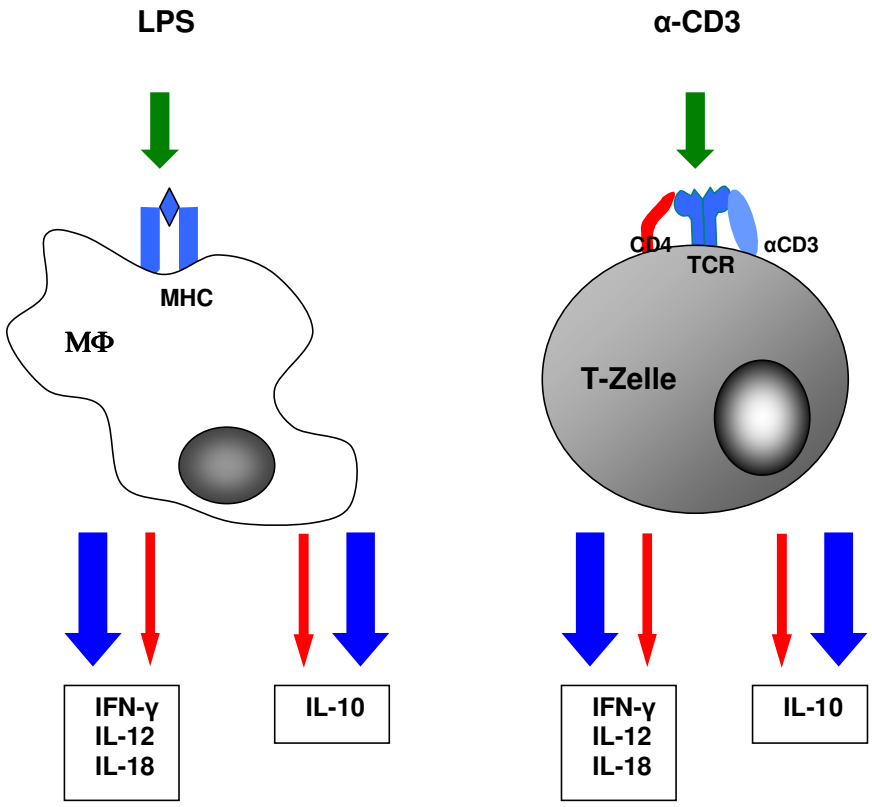

Abb. 31: Vergleich der Zytokinproduktion von neonatalen (rote Pfeile) und adulten (blaue Pfeile) Immunzellen

5.6 Methodenkritik

5.6.1 Heterogenität des Spenderkollektivs

Die freiwilligen erwachsenen Spender waren Mitarbeiter der Universitätskinderklinik und wurden zufällig ausgewählt. Vorraussetzung war das gesunde Befinden; ein serologischer Ausschluss einer gegebenenfalls chronischen Infektion erfolgte nicht.
Zum Geburtszeitpunkt nicht infizierte gesunde Reifgeborene wurden im Verlauf nicht weiter kontrolliert.
Das Nabelschnurblut wurde nach der Geburt durch Punktion der Nabelvene entnommen. Dabei wurde kein Unterschied nach dem Geburtsmodus gemacht. Brown et al. (2003) untersuchten, ob sich der Geburtsmodus - Vaginale Entbindung im Vergleich zur Sectio – auf die Zytokinproduktion der anschließend aus dem Blut isolierten mononukleären Zellen auswirkt. Die LPS induzierten IFN-γ- und IL-12-Produktionen waren bei vaginaler Entbindung signifikant höher als bei Entbindung durch Sectio. Allerdings wurden die MNC lediglich von 16 Probanden untersucht, wobei 8 vaginal entbunden wurden und 8 durch Sectio.
Aufgrund der Ergebnisse von Brown et al. ließen sich Einflüsse der verschiedenen Geburtsmodi auf das NSB nicht ausschließen. Sie waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und bedürfen einer separaten Untersuchung.

5.6.2 Suspensionszellkultur für die Zytokinbestimmung

Die aus dem Blut isolierten MNC wurden für die Zellkulturen nicht weiter in ihre Subpopulationen Makrophagen, T-Helferzellen, NK-Zellen getrennt. Für die Zytokinbestimmung mittels EIA wurde die Gesamtproduktion aller Subpopulationen betrachtet. Es konnte keine Aussage darüber gemacht werden, welche Population den quantitativ höchsten Anteil zur Produktion beitrug.

5.6.3 Enzymimmunoassay

Mittels Enzymimmunoassay wurde die IL-12(p40)-Produktion gemessen und nicht die des biologisch aktiven IL-12(p70). Lee et al. (1996) zeigten, dass die Halbwertszeit der p40-mRNA stimulierter MNC aus dem NSB geringer ist als im PB.

Die Sensitivität des IFN-γ-EIA lag bei 4,7 pg/ml. Die mitgeführte Standardverdünnungsreihe bestand aus Konzentrationen zwischen 4,7 pg/ml und 300 pg/ml. Da die Konzentration der Proben teilweise über 30000 pg/ml lag, erforderte dies große Verdünnungen, was eine mögliche Fehlerquelle mit sich brachte.

Die Sensitivität der IL-18 Enzymimmunoassays lag bei 55 pg/ml. Im NSB konnte kein IL-18 gemessen werden, was möglicherweise an der geringen Sensitivität des IL-18-EIA lag.

6. Zusammenfassung

Neonatale T-Zellen lassen sich im Vergleich zu denen Erwachsener schlechter aktivieren. Eine wesentliche klinische Beobachtung ist die im Vergleich zum Erwachsenen deutlich erhöhte Disposition des Neugeborenen für infektiöse Erkrankungen, bei denen die aktivierte T-Zelle eine pathophysiologische Rolle spielt.
Die Ursachen für die schlechtere Aktivierbarkeit sind vielfältig und liegen neben intrinsischen Charakteristika neonataler T-Zellen in unterschiedlicher Produktion und Sensitivität gegenüber Zytokinen.
IL-12 und IL-18 sind die wichtigsten IFN-γ induzierenden Zytokine *in vivo* und *in vitro*. Eine mögliche Ursache für eine schlechtere T-Zellaktivierbarkeit im Nabelschnurblut könnte eine herabgesetzte Wirkung von IL-12 und/oder IL-18 auf kostimulatorische Moleküle des Makrophagen bzw. auf T-Zellen sein.

Die Arbeit untersuchte die Produktion von IFN-γ, IL-12, IL-18 und IL-10 nach Stimulation mit dem T-Zellmitogen anti-CD3 und dem Bakterientoxin Lipopolysaccharid (LPS) auf Protein- und Transkriptionsebene. Danach wurde die Zytokinwirkung auf die Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 des Makrophagen untersucht und die funktionelle Auswirkung auf die T-Zellantwort gemessen.

Aus Nabelschnurblut und Blut gesunder Erwachsener wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation Mononukleäre Zellen gewonnen, die als Ausgangsmaterial für Zellkulturen dienten und mit verschiedenen Substanzen inkubiert wurden. Die Quantifizierung von Zytokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mit einem Enzymimmunoassay (EIA). Phänotypisierung der Makrophagen sowie Ermittlung der T-Zellzahl und Blastenbildung wurden mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Zur Messung der Zytokin-mRNA wurde analog der Methode von Löffler et al. (2003) eine RT-PCR verwendet.

Die IFN-γ-induzierte IL-12(p40)-Produktion und die IL-12-induzierte IFN-γ-Produktion waren im NSB gegenüber dem PB auf Transkriptions- und Proteinebene vermindert (Abb. 8, 13, 27 und 28). Die IFN-γ-Produktion nach einer Stimulation mit IL-12 und IL-18 war im NSB geringer als im PB ($p<0,05$; Abb. 13 und 14). Neonatale mit anti-CD3 stimulierte T-Zellen produzierten weniger IL-12-, IL-18- und IFN-γ-mRNA und Protein als T-Zellen von gesunden Erwachsenen (Abb.7, 8, 9, 27, 28 und 29).
Sowohl IL-10 als auch die IL-10-mRNA waren im NSB durch anti-CD3 und LPS schlechter induzierbar als im PB (Abb. 16, 17 und 30).
IL-12, anti-CD3 und IFN-γ hatten signifikant geringere Effekte auf die Expression kostimulatorischer Rezeptoren neonataler Makrophagen und die T-Zellfunktion als auf Zellen von gesunden Erwachsenen (Abb. 18 - 21, 24 und 25). Die Effekte von IL-18 bezüglich der Expression kostimulatorischer Rezeptoren sowie der T-Zellfunktion waren im PB und NSB ähnlich (Abb. 22, 23 und 26).

Die Ergebnisse unserer Versuche können im Sinne einer im Vergleich zum Erwachsenen eingeschränkten Modulationsfähigkeit des neonatalen Immunsystems sowohl auf der pro- als auch auf der antiinflammatorischen Seite interpretiert werden.
Unter teleologischen Gesichtspunkten könnte man die hier vorgestellten Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass sie mit folgender Hypothese kompatibel sind: Beim Feten und auch noch beim Neugeborenen wird eine eingeschränkte Reaktion gegenüber Fremdeiweißen in Kauf genommen, um einen Schutz des eigenen Gewebe bzw. die Verhinderung einer Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem zu ermöglichen.

7. Literatur

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996; **383:** 787-793

2. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S: Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. Immunity 1998; **9:** 143-150

3. Adkins B: T-cell function in newborn mice and humans. Immunol Today 1999; **20:** 330-335

4. Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka T, Nakanishi K, Clark S, Kurimoto M, Okamura H, Fujiwara H: A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducingfactor in enhaced production of IFN-gamma. J Immunol 1997; **159:** 2125-2131

5. Akira S: The role of IL-18 in innate immunity. Curr Opin Immunol 2000; **12:** 59-63

6. Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001; **2:** 675-680

7. Appleman LJ, Boussiotis VA: T cell anergy and costimulation. Immunol Rew 2003; **192:** 161-180

8. Avrameas S, Guilbert B: Dosage enzymoimmunologique de protéines à l`aide d`immunoadsorbants et d`antigènes marqués aux enzymes. C R Acad Sci 1971; **273:** 2705-2707

9. Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF: Cutting Edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promotor in primary CD4+ T lymphocytes. J Immunol 1998; **160:** 3642-3647

10. Berner R, Welter P, Brandis M: Cytokine Expression of Cord and Adult Blood Mononuclear Cells in Respnse to Streptococcus agalactiae. Pediatr Res 2002; **51:** 304-309

11. Bluestone JA: Cell fate in the immune system: decisions, decisions, decisions. Immunol Rev 1998; **165:** 5-12

12. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC: Cellular responses to interferon-gamma. Annu. Rev. Immunol. 1997; **15**: 749-795

13. Boehmer H v: T cell development and selection in the thymus. Bone Marrow Transpl 1992; **9 Suppl. 1:** 46-48

14. Böyum A: Isolation of momonuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968; **21 Suppl. 97**: 77-89

15. Böyum A: Separation of lymphocyte subgroups and monocytes: a review. Lymphology 1977; **10:** 71-76

16. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C: Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med 1991; **174:** 1549-1555

17. Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, Heesemann J, Autenrieth IB: IL-18 (IFN-y-inducing factor) regulates early cytokine production in and promotes resolution of bacterial infection in mice. J Immunol 1998; **160:** 299-307

18. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA: Sepsis a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest 1997; **112:** 235-243

19. Brown MA, Parmis YR, Halonen MJ: Method of birth alters interferon-gamma and interleukin-12 production by cord blood mononuclear cells. Pediatr Allergy Immunol 2003; **14:**106-111

20. Bryson YJ, Winter HS, Gard SE, Fisher TJ, Stiehm ER: Deficiency of immune interferon production by leukocytes of normal newborn. Cell Immunol 1980; **55:** 191-200

21. Burgio GR, Hanson LA, Ugazio AG (Eds.): Immunology of the neonate. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1987; V-VI

22. Cairo MS: Neonatal neutrophil host defense. Prospects for immunologic enhancement during neonatal sepsis. Am J Dis Child 1989; **143:** 40-46

23. Cameron LA, Taha RA, Tsicopoulos A, Kurimoto M, Olivenstein R, Wallert B, Minshall EM, Hamid QA: Airway epithelium expresses interleukin-18. Eur Respir J 1999; **14:** 553-559

24. Carra G, Gerosa F, Trinchieri G: Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. J Immunol 2000; **164:** 4752-4761

25. Carreno MB, Collins M: The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulaiton and inhibition of immune responses. Annu Rev Immmuol 2002; **20:** 29-53

26. Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G: Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. J Immunol 1992; **148:** 92-98

27. Cher DJ, Mosmann TR: Two types of murine helper T cell clone. J Immunol 1987; **138:** 3688-3694

28. Chheda S, Palkowetz KH, Garofalo R, Rassin DK, Goldman AS: Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to decreased production and expression of tumor necrosis factor-α and its receptors. Pediatr Res 1996; **40:** 475-483

29. Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M: Neonatal (cord blood) T cells can competenly raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. Cell Immunol 2000; **205:** 110-119

30. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P: Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. J Exp Med 1993; **177:** 523-527

31. Dammann O, Leviton A: Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. Pediatr Res 1997; **42:** 1-8

32. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signalling proteins. Science 1994; **264:** 1415-1421

33. Decker T, Kovarik P: Serine phosporylation of STATs. Oncogene 2000; **15:** 2628-2637

34. Delespesse GL, Yang P, Oshima Y, Demeure C, Shu U, Byun DG, Sarfati M: Maturation of human neonatal CD4+ and CD8+ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors. Vaccine 1998; **16:** 1415-1419

35. Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M: Overview of Interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. J Leukoc Biol 1998; **63:** 658-664

36. Dinarello CA: Interleukin-18. Methods 1999; **19:** 121-132

37. Ding L, Shevach EM: IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory finction. J Immunol 1992; **148:** 313-3139

38. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM: IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J Immunol 1993; **151:** 1224-1258

39. Dudhane A, Wang ZQ, Orlikowsky T, Gupta A, Wormser GP, Horowitz H, Kufer P, Hoffmann MK: AIDS patient monocytes target CD4 T cells for cellular conjugate formation and deletion through the membrane expression of HIV-1 envelope molecules. AIDS Res Hum Retroviruses 1996; **12:** 893-899

40. Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobin G. Immunochem 1971; **8:** 871-874

41. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingston DJ, Dinarello CA: Interleukin-18 regulation of interferon-y production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. Blood 1998; **91:** 2118-2125

42. Fantuzzi G, Dinarello CA: Interleukin-18 and interleukin-1beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). J Clin Immunol 1999; **19:** 1-11

43. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV.Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med 1989; **170:** 2081-2095

44. Fiorentino DF, Zlotnick A, Vieira P, Mosmann TR, Howard H, Morre KW O´Garra A: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol 1991a; **146:** 3444-3451

45. Fiorentino DF, Zlotnick A, Mosmann TR, Howard M, O´Garra A:IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 1991b; **147:** 3815-3822

46. Fleer A, Gerhards LJ, Verhoef J: Host defence to bacterial infection in the neonate. J Hosp Infect 1988; **11 Suppl. A:** 320-327

47. Fountoulakis M, Zulauf M, Lustig A, Garotta G: Stochiometry of interaction between interferon-y and its receptor. Eur J Biochem 1992; **209:** 781-787

48. Freedman AS, Freeman GJ, Rhynhart K, Nadler LM: Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. Cell Immunol 1991; **137:** 429-437

49. Freeman AS, Freeman G, Horowitz JC, Daley J, Nadler LM: B7, a B cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. J Immunol 1987; **139:** 3260-3267

50. Freeman GJ, Freeman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM: B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. J Immunol 1989; **143:** 2714-2722

51. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA: Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. Science 1993; **262:** 909-911

52. Frenkel L, Bryson YJ: Ontogeny of phytohemagglutinin-induced gamma interferon by leukocytes of healthy infants and children: evidence for decreased production in infants younger than 2 months of age. J Pediatr 1987; **111:** 97-100

53. Fukao T, Matsuda S, Koyasu S: Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-y production by dendritic cells. J Immunol 2000; **164:** 64-71

54. Gately M, Wilson D, Wong H: Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL 2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses *in vitro*. J Immunol 1986; **136:** 1274-1281

55. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH: The Interleukin-12/Interleukin-12-Receptor System. Role in normal and pathologic immune responses. Annu Rev Immunol 1998; **16:** 495-521

56. Gaunt G, Ramin K: Immunological tolerance of the human fetus. Am J Perinatol 2001; **18(6):** 299-312

57. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A: IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-y-activated macrophages. J Immunol 1992; **148:** 1792-1796

58. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Allen H: Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. Nature 1997; **386:** 619-623

59. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M: Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. J Exp Med 1990; **172:** 1625-1631

60. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM: The fetal inflammatory response syndrome. Am J Obstet Gynecol 1998; **179:** 194-202

61. Goriely S, Vincat B, Stordeur P, Vekemans J, Willems F, Goldman M, De Wit D: Deficient IL-12(p35) gene expression ba dendritic cells derived from neonatal monocytes. J Immunol 2001; **166:** 2141-2146

62. Greenlund AC, Wenner CA, Schreiber RD: Analysis of IFN-y receptor binding to IFN-y. J Interferon Res (Abstr.)1992; **12:** 103

63. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MSS: Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. Science 1997; **275:** 206-209

64. Halpern MD, Holubec H, Dominguez JA, Meza YG, Williams CS, Ruth MC, McCuskey RS, Dvorak B: Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; **284:** G695-G702

65. Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Olson GB, DeLuca D, Shenker L, Bard J, Boyse EA: Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1992; **89:** 10006-10010

66. Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ: Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costiulatory ligands: expression and function. J Exp Med 1994; **180:** 631-640

67. Hoshino T, Wiltrout RH, Young HA: IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. J Immunol 1999; **162:** 5070-5077

68. Howard M, O´Garra A: Biological properties of interleukin 10. Immunol Today 1992; **13:** 198-200

69. Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE: Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. Blood 1994; **84:** 4333-4343

70. Inaba K, Steinman RM: Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. J Exp Med 1984; **160:** 1717-1735

71. Inaba K, Kitaura M, Kato T, Watanabe Y, Kawade Y, Muramatsu S: Contrasting effects of alpha/beta- and gamma-interferons on expression of macrophage Ia antigens. J Exp Med 1986; **163:** 1030-1035

72. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr, Murphy KM: Interleukin 12 signalling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (stat)3 and (stat)4. J Exp Med 1995; **181:** 1755-1762

73. Janeway CA Jr, Bottomly K: Signals and signs for lymphocyte responses. Cell 1994; **76:** 275-285

74. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunology. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2002, 22

75. Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. Annu Rev Immunol 2002; **20:** 197-216

76. Joyner JL, Augustine NH, Taylor KA, La Pine TR, Hill HR: Effects of group B streptococci on cord blood and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion. J Infect Dis 2000; **182:** 974-977

77. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML: IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naïve T helper cells. J Immunol 1997; **159:** 28-35

78. Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, Angulo A, Ghazal P, Harris CA, Siekierka JJ, Peterson PA, Fung-Leung WP: Defective Interleukin (IL)-18-mediated Natural Killer and T Helper Cell Type 1 Responses in IL-1 Teceptor-associated Kinase (IRAK)-deficient Mice. J Exp Med 1999; **7:** 1129-1138

79. Kaplan MH, Sun Y, Hoey T, Grusby MJ: Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. Nature 1996; **382:** 174-177

80. Karlsson H, Hessle C, Rudin A: Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. Infect Immun 2002; **70:** 6688-6696

81. Kitaura M, Kato T, Inaba K, Watanabe Y, Kawade Y, Muramatsu S: Ontogeny of “macrophage” function. VI. Down-regulation for Ia-expression of newborn mouse macrophages by endogenous beta-interferon. Dev Comp Immunol 1988; **12:** 645-655

82. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick R, Clark S, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussian B, Trinchieri G: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. J Exp Med 1989; **170:** 827-845

83. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M: IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. J Immunol 1997; **158:** 1541-1550

84. Kojima H, Aizawa Y, Yanai Y, Nagaoka K, Takeuchi M, Ohta T, Ikegami H, Ikeda M, Kurimoto M: An essential role for NF-kappaB in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells. J Immunol 1999; **162:** 5063-5069

85. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH: B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell 1995; **80:** 707-718

86. Kummerle-Deschner JB, Hoffmann MK, Niethammer D, Dannecker GE: Pediatric rheumatology: autoimmune mechanisms and therapeutic strategies. Immunol Today 1998; **19:** 250-253

87. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D: Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. Clin Exp Immunol 2002; **128:** 118-123

88. La Pine TR, Joyner JL, Augustine NH, Kwak SD, Hill HR: Defective Production of L-18 and IL-12 by Cord Blood Mononuclear Cells Influences the T Helper-1 Interferon Gamma Response to Group B Streptococci. Pediatr Res 2003; **54:** 1-6

89. Lebel-Binay S, Berger A, Zinzindohoue F, Cugnenc P, Thiounn N, Fridman WH, Pages F: Interleukin-18: biological properties and clinical implications. Eur Cytokine Netw 2000; **11:** 15-26

90. Lederer JA, Perez VL, DesRoches L, Kim M, Abbas AK, Lichtman AH: Cytokine transcriptionl events druring helper T cell subset differentiation. J Exp Med 1996; **184:** 397-406

91. Lee SM, Chang L, Bruner V, Qian J, Indes J, Knoppel E, Ven Cvd, Cairo MS: Decreased Interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of Interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. Blood 1996; **88:** 945-954

92. Liew FY: T_H1 and T_H2 cells: a historical perspective. Nature Rev Immunol 2002; **2:** 55-60

93. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG: Synthesis of T helper 2 typecytokines at the maternal-fetal interface. J Immunol 1993; **151:** 4562-4573

94. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R: Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. Immunity 1994; **1:** 793-801

95. Löffler J, Swatoch P, Akhawi-Araghi D, Hebart H, Einsele H: Automated RNA Extraction by MagNA Pure Followed by Rapid Quantification of Cytokine and Chemokine Gene Expression with Use of Flourescence Resonance Energy Transfer. Clin Chem 2003; **49:** 955-958

96. Lu CY, Calamai EG, Unanue ER: A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. Nature 1979; **282:** 327-329

97. MacNeil IA, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnick A: IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. J Immunol 1990; **145:** 4167-4173

98. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S: Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. J Immunol 1992; **148:** 2142-2147

99. Magram J, Connaughton SE, Warrier RR, Carvajal D, Wu C, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK: IL-12-deficient mice are defective in IFN-gamma production and type 1 cytokine responses. Immunity 1996; **4:** 471-481

100. Manigold T, Böcker U, Traber P, Dong-Si T, Kurimoto M, Hanck C, Singer MV, Rossol S: Lipopolysaccharide/Endotoxin Induces IL-18 Via CD14 In Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in vitro*. Cytokine 2000; **12:** 1788-1792

101. Maródi L, Káposzta R, Campbell DE, Polin RA, Csongor J, Johnston RB Jr: Candidacidal mechanisms in the human neonate: impaired IFN-y activation in newborn infants. J Immunol 1994; **153:** 5642-5649

102. Maródi L, Goda K, Palicz A, Szabo G: Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-y. Clin Exp Immunol 2001; **126:** 456-460

103. Maródi L: Deficient Interferon-gamma receptor-mediated signalling in neonatal macrophages. Acta Paediatr 2002; **91:** 117-119

104. Marshall JD, Aste-Amzaga M, Chemhimi SS, Murphey M, Olsen H, Trinchieri G: Regulation of Human IL-18 mRNA. Clin Immunol 1999; **90:** 15-21

105. Martinot A, Leclerc F, Cremer R, Leteurtre S, Fourier C, Hue V: Sepsis in neonates and children: definitions, epidemiology, and outcome. Pediatr Emerg Care 1997; **13:** 277-281

106. Marzi M, Vigano A, Trbattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, Clerici M: Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. Clin Exp Immunol 1996; **106:** 127-133

107. Matthews NC, Wadhwa M, Bird C, Borras FE, Navarrete CV: Sustained expression of CD154 (CD40L) and proinflammatory cytokine production by alloantigen-stimulated umbilical cord blood T cells. J Immunol 2000; **164:** 6206-6212

108. Matzinger P: The Danger Model in Its Historical Context. Scand J Immunol 2001; **54:** 4-9

109. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; **136:** 2348-2357

110. Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989; **7:** 145-173

111. Nabavi N, Freeman GJ, Gault A, Godfrey D, Nadler LM, Glimcher LH: Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. Nature 1992; **360:** 266-268

112. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H: Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine Growth Factor Rev 2001a; **12:** 53-72

113. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H: Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. Annu Rev Immunol 2001b; **19:** 423-474

114. Nesin M, Cunningham-Rundles S: Cytokines and Neonates American J Perinatol 2000; **17(8):** 393-404

115. Nomura A, Takada H, Jin CH, Tanaka T, Ohga S, Hara T: Functional analyses of cord blood natural killer cells and T cells: A distinctive interleukin-18 response. Exp Hematol 2001; **29:** 1169-1176

116. Okamura H, Nagat K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S, Kurimoto M: A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxin shock. Infect Immun 1995a; **63:** 3966-3972

117. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi J, Fukuda S, Kurimoto M: Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. Nature 1995b; **378:** 88-91

118. Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K: Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. Curr Opin Immunol 1998; **10:** 259-264

119. Orlikowsky TW, Wang ZQ, Dudhane A, Horowitz H, Riethmüller G, Hoffmann MK: Cytotoxic monocytes in the blood of HIV type 1-infected subjects destroy targeted T cells in a CD95-dependent fashion. AIDS Res Hum Retroviruses 1997; **13(11):** 953-960

120. Orlikowsky TW, Dannecker GE, Wang ZQ, Horowitz H, Niethammer D, Hoffmann MK: Activation or destruction of T cells via macrophages. Pathobiol 1999; **67:** 298-301

121. Orlikowsky TW, Spring B, Dannecker GE, Niethammer D, Poets CF, Hoffmann MK: Expression and regulation of B7 family molecules on macrophages in preterm and term neonatal cord blood and peripheral blood of adults. Cytometry 2003; **53B:** 40-47

122. O´Shea JJ: Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation. Immunity 1997; **7:** 1-11

123. Papadogiannakis N, Johnsen SA, Olding LB: Monocyte-regulated Hyporesponsiveness of Human Cord Blood Lymphocytes to OKT3-monoclonal-antibody-induced Mitogenesis. Scand J Immunol 1986; **23:** 91-99

124. Perussia B: Lymphokine activated killer cells, natural killer cells and cytokines. Curr Opin Immunol 1991; **3(1):** 49-55

125. Powell KR: Sepsis and Shock. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000: 747-751

126. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA: Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. Proc Natl Acad Sci USA 1999; **96:** 2256-2261

127. Quie PG: Antimicrobial defenses in the neonate. Semin Perinatol 1990; **14:** 2-9

128. Rainsford E, Reen DJ: Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation. British J Haematol 2002; **116:** 702-709

129. Revel M, Chebath J: Interferon-activated genes. Trends Biochem Sci 1986; **11:** 147-200

130. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F, O`Garra A: IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. Immunity 1997; **7:** 571-581

131. Romagnani S: Th1 and Th2 in human diseases. Clin Immunol Immunopathol 1996; **80:** 225-235

132. Rosa FM, Cochet MM, Fellous M: Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation? Interferon 1986; **7:** 48-87

133. Rousset F, Garcia E, DeFrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J: Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1992; **89:** 1890-1893

134. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR: Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. Immunity 1995; **2:** 271-279

135. Sáez-Llorens X, McCracken GH: Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: current concepts of terminology, pathophysiology, and management. J Pediatr 1993; **123:** 497-508

136. Salomon B, Bluestone JA: Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. Annu Rev Immunol 2001; **19:** 225-252

137. Sanchez-Bueno A, Verkhusha V, Tanaka Y, Takikawa O, Yoshida R: Interferon-y-dependent expressionof inducible nitric oxide synthase, interleukin-12 and interferon-y-inducing factor in macrophages elicited by allograft tumor cells. Biochem Biophys Res Commun 1996; **224:** 555-563

138. Schelonka RL, Infante AJ: Neonatal immunology. Semin Perinatol 1998; **22:** 2-14

139. Schulzt C, Temming P, Bucsky P, Göpel W, Strunk T, Härtel C: Immature anti-inflammatory response in neonates. Clin Exo Immunol 2004; **135:** 130-136

140. Schwarz RH, Mueller DL, Jenkins MK, Quill H: T cell clonal anergy. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1989; **54:** 605-610

141. Schwartz RH: Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in IL-2 production and immunotherapy. Cell 1992; **71:** 1065-1068

142. Scott ME, Kubin M, Kohl S: High level interleukin-12 production, but diminished interferon-gamma production, by cord blood mononuclear cells. Pediatr Res 1997; **41:** 547-553

143. Seder RA, Paul WE: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. Annu Rev Immunol 1994; **12:** 635-673

144. Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, Justice JP, Van SM, Myrvik QN, Metzger WJ: Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-y-inducing by enhances NK cell production of IFN-y. J Immunol 1998; **161:** 4283-4288

145. Slayton W: Development of the immune system in the fetus. In: Christensen RD, ed. Hematologic Problems of the Neonate. Philadelphi: WB Saunders; 2000: 21-41

146. Splawski JB, Yamamoto K, Lipsky PE: Deficient interleukin-10 production by neonatal T cells does not explain their ineffectiveness at promoting neonatal B cell differentiation. Eur J Immunol 1998; **28:** 4248-4256

147. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK: Purification to homogenety and partial characterization of cytoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990; **87:** 6808-6812

148. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donova EF, Of W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL: Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Reserch Networks. J Pediatr 1996; **129:** 63-71

149. Stoll S, Müller G, Kurimoto M, Saloga M, Tanimoto T, Yamauchi H, Okamura H, Knop J, Enk AH: Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. J Immunol 1997; **159:** 298-302

150. Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Muller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH: Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. Eur J Immunol 1998; **28:** 3231-3239

151. Takeuchi M, Nishizaki Y, Sano O, Ohta T, Ikeda M, Kurimoto M: Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-y inducing factor (interleukin-18) in mouse intestinal epithelial cells. Cell Tissue Res 1997; **289:** 499-507

152. Taylor S, Bryson YJ: Impaired production of gamma-interferon by newborn cells *in vitro* is due to a functionally immature macrophage. J Immunol 1985; **134:** 1493-1497

153. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN: Requirement for STAT4 in interleukin-12-mediated response of natural killer and T cells. Nature 1996; **382:** 171-174

154. Thomas JA, Allen JL, Tsen M, Dubicnoff T, Danao J, Liao XC, Cao Z, Wasserman SA: Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptorassociated kinase. J Immunol 1999; **163:** 978-984

155. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM: Interleukin-10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. J Exp Med 1991; **173(2):** 507-510

156. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K: IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. Int Immunol 2000; **12:** 151-160

157. Trinchieri G: Production of natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med 1992; **176:** 1387-1398

158. Trinchieri G: Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. Immunol Today 1993; **14:** 355-358

159. Trinchieri G: Interleukin-12: a proinflamatory cytokine with immunregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific and adaptive immunity. Ann Rev Immunol 1995; **13:** 251-276

160. Trinchieri G: Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). Curr Opin Immunol 1997; **9:** 17-23

161. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nature Reviews 2003; **3:** 133-146

162. Trivedi HN, HayGlass KT, Gangur V, Allardice JG, Embree JE, Plummer FA: Analysis of neonatal T cell and antigen presenting cell functions. Hum Immunol 1997; **57:** 69-79

163. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, Matsui K, Kashiwamura SI, Hada T, Akira S, Yagita H, Okamura H, Nakanishi K: Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. Immunity 1999; **11:** 359-367

164. Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K: Pathophysiological roles of interleukin-18 for inflammatory liver diseases. Immunol Rev 2000; **174:** 192-209

165. Ulevitch RJ, Tobias PS: Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol 1995; **13:** 437-457

166. Upham JW, Lee PT, Holt BJ, Heaton T, Prescott SL, Sharp MJ, Sly PD, Holt PG: Development of Interleukin-12-producing capacity throughout childhood. Infect Immun 2002; **70:** 6583-6588

167. Ushio S, Namba M, Takanori O, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukada S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M: Cloning of cDNA for human IFN-y-inducing-factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biological activities of the protein. J Immunol 1996; **156:** 4274-4279

168. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, Manger D, Zuckermann S, Golosubow A, Nieter B: Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease – predictive value and new therapeutic approaches. Behring Instit Mitt 1991; **88:** 208-215

169. Wakasugi N, Virelizier JL: Defective IFN-γ production in the human neonate. J Immunol 1985; **134:** 167-171

170. Wang ZQ, Orlikowsky T, Dudhane A, Trejo V, Hoffmann MK: Macrophages may activate or destroy T cells with which they form antigen- or coreceptor-mediated cellular conjugates. Cell Immunol 1998; **189:** 74-82

171. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol Today 1993; **14:** 353-356

172. Wheelock EF: Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science 1965; **149:** 310-311

173. Wilson CB: Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. J Pediatr 1986; **108:** 1-12

174. Wilson CB, Westall J, Johnston L, Lewis DB, Dower SK, Alpert AR: Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. J Clin Invest 1986; **77:** 860-867

175. Wilson CB, Lewis DB: Basis and implications of selectively diminished cytokine production in neonatal susceptibility to infection. Rev Infec Dis 1990; **12:** S410-S420

176. Wong HL, Wilson DE, Jenson J, Familletti P, Stremlo D, Gately MK: Characterization of a factor(s) which synergizes with recombinant interleukin 2 in promoting allogeneic human cytolytic T-lymphocyte responses *in vitro*. Cell Immunol 1988; **111:** 39-54

177. Xu X, Sun YL, Hoey T: Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by STAT amino-terminal domain. Science 1996; **273:** 794-797

178. Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, McInnes IB, Liew FY: IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. Eur J Immunol 2000; **30:** 3147-3156

179. Yang J, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM: Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: Evidence for two distinct pathways for promoter activation. Eur J Immunol 1999; **29:** 548-555

180. Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO: IFN-y induces IL-12 mRNA expression by murine macrophage cell line, J774. Biochem Biophys Res Commun 1994; **198**: 857-861

181. Yoshimoto S, Okamura H, Tagawa Y, Iwakura Y, Nakanishi K: Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. Proc Natl Acad Sci USA 1997; **94:** 3948-3953

182. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K: IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. J Immunol 1998; **161:** 3400-3407

183. Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K: IL-18, although anti-allergic when administrated with IL-12 stimulates IL-4 and histamine release by basophiles. Proc Natl Acad Sci USA 1999; **96:** 13962-13966

184. Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE, Nakanishi K: IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. Nat Immunol 2000; **1:** 132-137

185. Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncorolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, de Vries JE: IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. J Immunol 1992; **149:** 2378-2384

186. Zeh HJ, Tahara H, Lotze MT: Interleukin-12. The Cytokine Handbook. 2nd ed. 1994; 239-256

187. Zhao Y, Dai ZP, Lv P, Gao XM: Phenotypic and functional analysis of human T lymphocytes in early second- and third-trimester fetuses. Clin Exp Immunol 2002; **129:** 302-308

188. Zinkernagel RM, Doherty PC: Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a synergenic or semiallogenic system. Nature 1974; **248:** 701-702

189. Zinkernagel RM, Doherty PC: H-2 compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. J Exp Med 1975; **141:** 1427-1436

8. Anhang

8.1 Verzeichnis der Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zelle
AK	Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	cluster of differentiation (Oberflächenrezeptoren)
DC	Dendritische Zelle
E.coli	Escherischia coli (gramnegatives Bakterium)
EIA	Enzyme Immuno Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward scatter
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompativility complex (Gewebsantigen)
mRNA	messenger RNA
NK	Natürliche Killerzelle (Subtyp des T-Lymphozyten)
NSB	Nabelschnurblut
PB	peripheres Blut Erwachsener
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
RPMI	Zellkulturmedium
RT-PCR	real time Polymerase Kettenreaktion
SSC	side scatter
TCR	T-Zellrezeptor
TMB	3, 3´,5,5´Tetramethylbenzidin
VLE RPMI	Very Low Endotoxin, Roswell Park Memorial Inst.

8.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Zytokinabhängige T-Zelldifferenzierung 4

Abb. 2: Zytokinabhängige Makrophagendifferenzierung..... 6

Abb. 3: T-Zellaktivierung ohne zweites Signal 8

Abb. 4: T-Zellaktivierung mit zweitem Signal 8

Abb. 5: Prinzip eines EIA 22

Abb. 6: Beispiel für ein Scattergramm 27

Abb. 7: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IL-10, anti-CD3 + IL-10 und LPS nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=5) 34

Abb. 8: IL-12(p40)-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IFN-γ, anti-CD3 + IFN-γ und anti-CD3 + IL-10 im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4) 35

Abb. 9: IL-18-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IFN-γ, anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4)..... 36

Abb. 10: IL-12(p40)- und IL-18-Produktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4) 37

Abb. 11: IL-12(p40)-Produktion nach Stimulation mit IL-18 (10 ng/ml, 100 ng/ml), anti-CD3 und IL-18 + anti-CD3 nach 48h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3) 38

Abb. 12: IL-18-Produktion nach Stimulation mit IL-12 (10 ng/ml, 100 ng/ml), anti-CD3 und IL-12 + anti-CD3 nach 48h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)..... 39

Abb. 13: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 nach 24h und 48h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)..... 41

Abb. 14: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 unterschiedlicher Konzentrationen nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)..... 42

Abb. 15: IFN-γ-Produktion nach Stimulation mit IL-12, IL-18 und anti-CD3 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB (n=3)..... 43

Abb. 16: IL-10-Produktion nach Stimulation mit anti-CD3, IFN-γ und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=5) 45

Abb. 17: IL-10-Produktion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=4)..... 46

Abb. 18: CD80$^+$ Makrophagen nach Stimulation mit IFN-γ, anti-CD3 und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3) 47

Abb. 19: CD86 Rezeptoren nach Stimulation mit IFN-γ, anti-CD3 und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3) 48

Abb. 20: CD80$^+$ Makrophagen nach Stimulation mit IL-12 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)..... 49

Abb. 21: CD86 Rezeptoren nach Stimulation mit IL-12 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)..... 50

Abb. 22: CD80$^+$ Makrophagen nach Stimulation mit IL-18 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)..... 51

Abb. 23: CD86 Rezeptoren nach Stimulation mit IL-18 (1 ng/ml – 100 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3)..... 52

Abb. 24: T-Zellzahl und Blastenbildung nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD3 + IFN-γ im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3) 53

Abb. 25: T-Zellzahl und Blastenbildung nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD3 + IL-12 (10 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3) 54

Abb. 26: T-Zellzahl und Blastenbildung nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD3 + IL-18 (10 ng/ml) im Vergleich zwischen PB (A.) und NSB (B.; n=3) 55

Abb. 27: IFN-γ-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IL-12 und IL-18 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB 57

Abb. 28: IL-12(p40)-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IFN-γ und IL-18 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB 58

Abb. 29: IL-18-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IFN-γ und IL-12 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB 59

Abb. 30: IL-10-mRNA-Kopienzahl/10^6 Zellen nach Stimulation mit LPS, anti-CD3, IFN-γ, IL-18 und IL-12 nach 24h im Vergleich zwischen PB und NSB 60

Abb. 31: Vergleich der Zytokinproduktion von neonatalen (rote Pfeile) und adulten (blaue Pfeile) Immunzellen 73

8.3 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Immunologische Besonderheiten des Neugeborenen 2

Tab. 2: Untersuchte Zytokine 10

Tab. 3: Charakteristika von IFN-γ 10

Tab. 4: Charakteristika von IL-12 11

Tab. 5: Charakteristika von IL-18 12

Tab. 6: Charakteristika von IL-10 13

Proceedings report:

- Tewes L, Spring B, Löffler J, Dannecker GE, Poets CF, Hoffmann MK, Orlikowsky Th: Defective production and effect of IL-18, IL-12, and IFN-γ by cord blood cells influences CD80 and CD86 expression on macrophages**.** Proceedings of 6th world congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis. Medimont 2004 167 – 171

Abstracts:

- Tewes L, Spring B, Löffler J, Dannecker GE, Poets CF, Hoffmann MK, Orlikowsky Th. Defective production and effect of IL-18, IL-12, and IFN-γ by cord blood cells influences CD80 and CD86 expression on macrophages**.** Shock 2004; 21: 32

- Orlikowsky Th, Tewes L, Spring B, Dannecker GE, Hoffmann MK, Poets CF. Wirkungen von IL-12 und IL-18 auf die T-Zellaktivierung: Vergleich zwischen Nabelschnurblut und Blut von gesunden Erwachsenen. Z Geburtsh Neonatol 2003; 207: 16

- Orlikowsky Th, Spring B, Tewes L, Dannecker GE, Poets ChF, Hoffmann MK. Effects of interleukin-12 and interleukin-18 on the anti-CD3 response: Comparison of cord blood and peripheral blood of healthy adults. Immunobiology 2002; 206: 85

Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich hier von Herzen danken möchte.

Vor allen anderen gilt mein Dank Herrn Prof. Christian F. Poets für die Betreuung des Themas. Seine philosophische Unbestechlichkeit und seine stets wohlwollende Kritik haben mich immer wieder dazu angehalten, den Horizont zu erweitern.

Herrn Dr. Orlikowsky danke ich für die Betreuung und das Vertrauen bei diesem interessanten und schwierigen Thema. Aufgrund seiner leidenschaftlichen Begeisterung für die Immunologie hat er mir so viele Türen geöffnet und mich gefördert.

Herrn Dr. Jürgen Löffler und seinem Team danke ich für die komplikationslose Kooperation bei der mRNA-Bestimmung.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Bärbel Spring, die mich mit der Arbeit im Labor vertraut machte und durch deren Hartnäckigkeit und Kreativität die Lösung vieler methodischer Probleme möglich wurde. Ich danke ihr für den kompromisslosen Rückhalt, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Dr. Christian Gille danke ich für die Anregungen und die Motivation auf den letzten Metern, für Diskussionen, kritisches Hinterfragen und Ermutigungen.

Meiner Schwester Anne danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die vielen stundenlangen Telefonate und den Gedankenaustausch.

Das Beseitigen von Computerproblemen verdanke ich meinem Bruder Christoph.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben. Durch ihre Förderung, Anerkennung und das in mich gesetzte Vertrauen haben sie mich ermutigt, der Mensch zu werden, der ich bin.

Lebenslauf

Name	Lena Johanna Tewes
Geburtsdatum	02.08.1979
Geburtsort	Herdecke an der Ruhr
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1986 - 1990	Maximilian-Kolbe-Grundschule in Schermbeck
1990 - 1992	St. Ursula-Gymnasium in Dorsten
1992 - 1999	Lise-Meitner-Gymnasium in Remseck am Neckar

Studium

1999 - 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität in Leipzig
2000	Fortsetzung des Studiums an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
2001	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
2001	Beginn der Promotionsarbeit unter Anleitung von Herrn Dr. Th. W. Orlikowsky
2002	Erste ärztliche Prüfung in Tübingen
2004	Zweite ärztliche Prüfung in Tübingen
22.11.2005	Dritte ärztliche Prüfung in Tübingen