

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. Egbert Herting

**Untersuchung zur Rolle regulatorischer T-Zellen im Zusammenhang
mit der bronchopulmonalen Dysplasie bei unreifen Frühgeborenen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Jonathan Olbertz
aus Malchin

Lübeck 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Härtel

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Jan Rupp

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Daniel Drömann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. November 2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06. November 2023

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	6
Frühgeborene	6
Bronchopulmonale Dysplasie	8
Definition und Epidemiologie	8
Pathophysiologie	12
Klinische Risikofaktoren	15
Neonatales Immunsystem	16
Allgemeines	16
Immunologische Besonderheiten des Frühgeborenen	18
Regulatorische T-Zellen	19
Allgemeines	19
Rolle im Rahmen von Schwangerschaft und Frühgeburtlichkeit	22
Fragestellung	24
Material und Methoden	25
Material	25
Reagenzien	25
Antikörper	25
Laborwerkzeuge- und hilfsmittel	27
Geräte	28
Software	28
Methoden	28
Definitionen	28
Studienkohorte	31
Quantitative Bestimmung regulatorischer T-Zellen in Vollblutproben Frühgeborener mittels Durchflusszytometrie	32
Statistische Auswertung	34
Etablierung eines Antikörperpanels zur phänotypischen Charakterisierung regulatorischer T-Zellen in Vollblutproben Frühgeborener mittels Durchflusszytometrie	35
Ergebnisse	40
Charakterisierung der klinischen Kohorte	40
Assoziation der relativen Anteile regulatorischer T-Zellen mit der späteren Diagnosestellung einer Bronchopulmonalen Dysplasie	43
Etablierung eines Multicolor-Panels zur Phänotypisierung regulatorischer T-Zellen	43
Diskussion	50
Zusammenfassung	62
Literaturverzeichnis	63
Anhänge	81
Abbildungen	81
Ethikvotum	84
Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

AIS	Amnioninfektionssyndrom
AUC	area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL20	CC-Chemokinligand 20
CCR6	C-C-Chemokinrezeptor Typ 6
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CPAP	continuous positive airway pressure
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
EOS	Early-onset Sepsis, Auftreten innerhalb der ersten 72 h nach Geburt
FEV ₁	Einsekundenkapazität
FIP	fokale intestinale Perforation
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
FMO	Fluorescence Minus One, Kontrollfärbung unter Auslassung eines Farbstoffes
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN β	Interferon- β
IFN γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
MDSC	myeloid-derived suppressor cells, myeloide Vorläuferzellen
MHC	major histocompatibility complex
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NIH	National Institutes of Health
LBW	low birthweight infant, Geburtsgewicht <2500 g
LOS	late-onset Sepsis, Auftreten später als 72 h nach Geburt
LT	Lebenstag
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PMA	postmenstruelles Alter
PPV	positive pressure ventilation

RSV	respiratorisches Synzytial-Virus
RCF	relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung
SGA	small for gestational age, Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile bezogen auf das jeweilige Gestationsalter und Geschlecht
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
SSW	Schwangerschaftswoche
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
V.a.	Verdacht auf
VLBW	very low birthweight infant, Geburtsgewicht <1500 g
WHO	World Health Organization

Einleitung

Frühgeborene

Definitionsgemäß handelt es sich bei Frühgeborenen um Kinder mit einem Gestationsalter von unter 37 Schwangerschaftswochen bei Geburt. Die Schwangerschaftsdauer wird ab dem ersten Tag der letzten Regelblutung der Schwangeren berechnet (Herting, 2019).

Laut der WHO kommen weltweit jedes Jahr ca. 15 Millionen Kinder als Frühgeborene auf die Welt. Der Anteil der Frühgeburten an der Gesamtzahl der Geburten schwankt dabei zwischen einzelnen Ländern von 5% bis zu 18%. Für Industrieländer liegt er im Mittel bei 8,6% (March of Dimes et al., 2012). In Deutschland wurden im Jahr 2020 7,73% der Kinder zu früh geboren (IQTIG, 2021).

Häufig ist die Frühgeburt Folge einer vorzeitigen Wehentätigkeit, eines vorzeitigen Blasensprungs oder der vorzeitigen Beendigung der Schwangerschaft durch medikamentöse Einleitung von Wehen oder einen Kaiserschnitt aufgrund einer mütterlichen oder kindlichen Indikation. Als mütterliche Indikation sind z.B. die Präeklampsie bzw. Eklampsie zu nennen. Eine intrauterine Wachstumsretardierung des Kindes kann eine ärztlich induzierte Frühgeburt rechtfertigen (Goldenberg et al., 2008). Es besteht eine Assoziation der Frühgeburtslichkeit zu vorherigen Frühgeburten in der Anamnese sowie einem niedrigen sozioökonomischen Status der Mutter, einem Alter der Mutter unter 18 Jahren, mütterlichem Rauchen und Alleinerziehendenstatus (Berger et al., 2019; Tucker und McGuire, 2004). Auch ein Einfluss mütterlicher wie kindlicher genetischer Faktoren ist anzunehmen (York et al., 2014). Frauen afroamerikanischer Herkunft haben ein erhöhtes Risiko einer Frühgeburt. Gleiches gilt z.B. bei Mehrlingsschwangerschaften oder einem erniedrigtem BMI der Mutter (Goldenberg et al., 2008). Besonders hervorzuheben ist die Rolle von Infektionen und inflammatorischen Prozessen in der uteroplazentaren Einheit. So sind eine bakterielle Vaginose und eine asymptomatische Bakteriurie bekannte Risikofaktoren für eine Frühgeburt (Berger et al., 2019; Holst et al., 1994). Bei etwa 32,4% der Patientinnen mit vorzeitigem Blasensprung lässt sich intraamniotisch ein Erreger nachweisen (Romero et al., 2001). Umfangreiche Fortschritte in der Behandlung von Schwangeren und Frühgeborenen führten in den vergangenen Jahrzehnten zu verbesserten Überlebensraten der Kinder (Field et al., 2008). Dennoch ist die perinatale Sterblichkeit insbesondere sehr unreifer Frühgeborener weiter insgesamt hoch. So lag diese z.B. in Deutschland im Jahr

2020 bei ca. 36,4% für Kinder unter 28 SSW und bei ca. 9,0% für Kinder zwischen 28 SSW und 31 SSW (IQTIG, 2021).

Diese Patienten trifft neben gehäuft und verstärkt auftretenden initialen Anpassungsstörungen nach der Geburt auch ein deutlich erhöhtes Risiko von akuten und chronischen Erkrankungen im weiteren klinischen Verlauf. Ursache hierfür ist die Unreife der Organsysteme in Struktur und Funktion. Betroffen sind neben Lunge, Herz-Kreislauf-System, Gastrointestinaltrakt, dem zentralen Nervensystem und anderem auch das Immunsystem (Herting, 2019).

So sind Frühgeborene hochgradig anfällig für akute Infektionen, die einen potenziell lebensbedrohlichen Verlauf nehmen können.

Daten des German Neonatal Network, einer Multicenter-Kohortenstudie VLBW-Frühgeborener aus insgesamt 60 neonatologischen Intensivstationen in Deutschland, zeigen, dass im Jahr 2016 insgesamt 25,6% der VLBW-Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 32 Schwangerschaftswochen im Verlauf eine klinische Sepsis entwickelten. Die Sepsis stellte bei verstorbenen VLBW-Frühgeborenen mit 15,8% die zweithäufigste Todesursache nach dem Atemnotsyndrom dar (Köstlin-Gille et al., 2021).

Generell sind Erkrankungen mit großer entzündlicher pathophysiologischer Komponente, wie die Sepsis, die bronchopulmonale Dysplasie oder die nekrotisierende Enterokolitis, mit Sterblichkeit assoziiert (Stichtenoth et al., 2012).

Bronchopulmonale Dysplasie

Definition und Epidemiologie

Die aktuell hauptsächlich verwendete Definition der bronchopulmonalen Dysplasie entspricht im Wesentlichen dem Ergebnis der NIH Konsensuskonferenz aus dem Jahr 2000.

Hierbei wird eine milde, moderate und schwere BPD unterschieden (vgl. Tabelle 1) (A. H. Jobe und Bancalari, 2001).

Gestationsalter	< 32 Wochen	≥ 32 Wochen
Untersuchungszeitpunkt	36 Wochen PMA oder Entlassung aus Krankenhaus (früherer Zeitpunkt wird gewählt)	Lebensalter > 28 Tage und < 56 Tage oder Krankenhausentlassung (früherer Zeitpunkt wird gewählt)
FiO ₂ > 21% über mindestens 28 Tage plus		
Milde BPD	keine Notwendigkeit zur Sauerstofftherapie zum Untersuchungszeitpunkt	keine Notwendigkeit zur Sauerstofftherapie im Lebensalter von 56 Tagen oder bei Krankenhausentlassung (früherer Zeitpunkt wird gewählt)
Moderate BPD	Notwendigkeit zur Sauerstofftherapie mit FiO ₂ < 30% zum Untersuchungszeitpunkt	Notwendigkeit zur Sauerstofftherapie mit FiO ₂ < 30% im Lebensalter von 56 Tagen oder bei Krankenhausentlassung (früherer Zeitpunkt wird gewählt)
Schwere BPD	Notwendigkeit zur Sauerstofftherapie mit FiO ₂ ≥ 30% und/oder nasaler CPAP bzw. PAP zum Untersuchungszeitpunkt	Notwendigkeit zur Sauerstofftherapie mit FiO ₂ ≥ 30% und/oder nasaler CPAP bzw. PAP im Lebensalter von 56 Tagen oder bei Krankenhausentlassung (früherer Zeitpunkt wird gewählt)

Tabelle 1: BPD-Diagnosekriterien gemäß NIH Konsensuskonferenz 2000 (modifiziert nach Jobe und Bancalari, 2001)

Die Diagnosestellung einer BPD erfolgt im Alter von 36 Wochen PMA für Frühgeborene eines Gestationsalters unter 32 SSW bzw. im Lebenstag 29 bis maximal 55 bei einem Gestationsalter gleich oder größer 32 SSW. Voraussetzung ist die Notwendigkeit der Sauerstofftherapie über mindestens 28 Tage in Summe. Anhand des Sauerstoffbedarfes bzw. der Notwendigkeit einer Atemhilfe zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wird die BPD als mild, moderat oder schwer klassifiziert.

Zudem existieren weitere Definitionen einer BPD (Jensen et al., 2019). Bedeutsam ist hier unter anderem auch die von Walsh et al publizierte „physiologische“ Definition einer BPD. Hierbei werden Frühgeborene im postmenstruellen Alter von 36 SSW mit einem FiO₂ Wert < 30% bei SpO₂-Werten von 90-96% sowie diejenigen

mit einem FiO_2 Wert $\geq 30\%$ bei SpO_2 Werten $>96\%$ einem Raumluftbelastungstest unterzogen. Werden über 30 Minuten SpO_2 -Werte $>90\%$ gehalten, wird die Diagnose einer BPD abgelehnt, wohingegen alle anderen Kinder der BPD-Gruppe zugeordnet werden. Im Falle einer Beatmung oder CPAP-Therapie sowie bei FiO_2 -Werten $\geq 30\%$ bei SpO_2 -Werten von $90-96\%$ erfolgt unmittelbar die Einordnung in die BPD-Gruppe ohne Durchführung des oben genannten Belastungstestes (Walsh et al., 2004).

Eine weitere häufig genutzte Definition stammt von Shennan et al. aus dem Jahre 1988 und besagt, dass eine BPD immer dann vorliegt, wenn im postmenstruellen Alter von 36 Wochen eine Notwendigkeit zur Sauerstoffsubstitution besteht. (Shennan et al., 1988).

Neben dem Verständnis der Pathophysiologie unterlagen auch klinische Diagnosekriterien der BPD in der Vergangenheit einem Wandel. Erstmals beschrieben wurde die BPD im Jahre 1967 durch Northway et al. als Phänomen, dass bei Frühgeborenen auftrat, die eine mechanische Beatmung sowie eine hochdosierte Sauerstofftherapie erhielten. Die Patienten zeigten initial ein Atemnotsyndrom gefolgt von einem chronischen Fortschreiten der Erkrankung. In histopathologischen Untersuchungen verstorbener Kinder konnten diffuse fibroproliferative Veränderungen sowie eine distale Inflammationsreaktion der Lunge nachgewiesen werden. Es zeigten sich zudem vaskuläre Umbauprozesse als Folge einer pulmonalen Hypertension (Abman et al., 2017 nach Northway et al., 1967).

Aufgrund der in den 80er Jahren eingeführten Surfactanttherapie ist die seinerzeit untersuchte Patientengruppe nicht mehr repräsentativ für die heute typischerweise an einer BPD erkrankenden Kinder. Das mittlere Gestationsalter der überlebenden Kinder in der Studie von Northway et al. betrug 34 SSW, das mittlere Geburtsgewicht 2311g. Die Mortalität dieser nach heutigen Gesichtspunkten eher reiferen Frühgeborenen war damals deutlich erhöht (Abman et al., 2017 nach Northway et al., 1967). Im Zuge des Fortschritts in der Neonatologie erkrankten Patienten dieses Gestationsalters heute deutlich seltener an einer BPD. Neuerungen wie die fetale Lungenreifeinduktion durch pränatale Glucocorticoid Therapie, die Surfactant-Behandlung und schonendere Beatmungsformen haben zu diesem Trend beigetragen (A. J. Jobe, 1999). Dennoch kam es insgesamt zu einer prozentualen Zunahme an BPD Erkrankungen Frühgeborener im Zusammenhang mit steigenden Überlebensraten auch deutlich unreiferer Frühgeborener (Stoll et al., 2015).

Die BPD stellt heute eine sehr häufige Komplikation bei der Betreuung besonders unreifer Frühgeborener dar. Der Zusammenhang zwischen niedrigem Gestationsalter und höherer BPD-Prävalenz konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Gortner et al., 2011; Klinger et al., 2013). In einer amerikanischen Untersuchung erkrankten in der Gruppe der Kinder mit einem Gestationsalter bis einschließlich 28 SSW etwa 42% der überlebenden Patienten im weiteren Verlauf an einer BPD. Die Prävalenz nahm hierbei mit sinkendem Gestationsalter zu. Bei Frühgeborenen von 28 SSW lag sie bei etwa 23%, wohingegen Frühgeborene von 24 SSW in etwa 69% der Fälle betroffen waren (Stoll et al., 2010).

In der Literatur zeigt sich weltweit eine große Spannweite der publizierten Prävalenzen der BPD (vgl. Tabelle 2).

Auch im innereuropäischen Vergleich zeigen sich Unterschiede in der Häufigkeit der BPD. Unterschiede in der klinischen Behandlung unreifer Frühgeborener sowie genetische Faktoren werden als Ursache hierfür diskutiert (Gortner et al., 2011).

Nach Entlassung aus der Klinik besteht für die an einer BPD erkrankten Frühgeborenen ein deutlich erhöhtes Risiko einer stationären Wiederaufnahme im ersten Lebensjahr. In einer retrospektiven Studie bei Frühgeborenen eines Gestationsalters unter 33 Wochen wurden 49% der an BPD erkrankten Kinder innerhalb eines Jahres erneut hospitalisiert, in der Gruppe der nicht an BPD erkrankten Kinder betrug diese Quote 23% (Smith et al., 2004).

Eine BPD erhöht insbesondere auch das Risiko Frühgeborener innerhalb des ersten Lebensjahres aufgrund einer Infektion mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) hospitalisiert zu werden. Zudem zeigen die Patienten deutlich schwerere Verläufe dieser Erkrankung (Chaw et al., 2020; Lee et al., 2015).

Das Risiko nach Entlassung innerhalb des ersten Lebensjahres zu versterben ist nach Diagnosestellung einer BPD ebenfalls erhöht. In einer VLBW Frühgeborenen-Kohorte betrug die Mortalität in diesem Zeitraum bei den an BPD Erkrankten etwa 2% im Gegensatz zu 0,6% bei den nicht betroffenen Kindern (Kugelman et al., 2007).

Bei an einer BPD erkrankten Kindern kann zudem am Ende des stationären Aufenthaltes die Notwendigkeit einer Entlassung mit Heimsauerstoff bestehen. Dies ist bei etwa 10-20% der Frühgeborenen mit einem Gestationsalter bis einschließlich 26 SSW der Fall. Besonders diese Kinder trifft eine nochmals deutlich erhöhte

Kohorte/Studie	Land	Einschlusskriterien	BPD-Prävalenz nach Definition		
			Definition NIH-Konferenz (Jobe und Bancalari, 2001)	Definition Sauerstoffsubstitution PMA 36 Wochen (Shennan et al., 1988)	Physiologische Definition (Walsh et al., 2004)
NICHD/(Stoll et al., 2010)	Vereinigte Staaten von Amerika	Frühgeborene ≤ 28 SSW	68%	42%	40%
NRNJ/(Isayama et al., 2012)	Japan	Geburtsgewicht < 1500 Gramm		14,6% (Definition Sauerstoffsubstitution im Alter PMA 36 Wochen und am Lebenstag 28)	
Canadian Neonatal Network/(Shah et al., 2012)	Kanada	Frühgeborene ≤ 28 SSW		46,1% (Definition Sauerstoffsubstitution oder Atemhilfe im Alter PMA 36 Wochen oder bei Verlegung in Level 2 Zentrum)	
Vermont Oxford Network/(Horbar et al., 2012)	Vereinigte Staaten von Amerika	Geburtsgewicht < 1500 Gramm		26,2%	
PBFT/(Su et al., 2015)	Taiwan	Frühgeborene ≤ 28 SSW, Geburtsgewicht < 1500 Gramm		56%	
(Lin et al., 2015)	China	Geburtsgewicht < 1000 Gramm	48,1%		
(Poindexter et al., 2015)	Vereinigte Staaten von Amerika	Frühgeborene ≤ 28 SSW	58,6%	40,8%	32,0%
CPQCC/(Lapcharoensap et al., 2015)	Vereinigte Staaten von Amerika	Frühgeborene ≤ 29 SSW, Geburtsgewicht 401-1500 Gramm		33,1% (Definition überlebende Kinder mit Sauerstoffsubstitution im Alter PMA 36 Wochen oder bei Entlassung)	
GNN/(Härtel et al., 2018)	Deutschland	Frühgeborene ≤ 28 SSW, Geburtsgewicht < 1500 Gramm		27,9% (Definition Sauerstoffsubstitution oder Atemhilfe im Alter PMA 36 Wochen)	
SNN/(Adams et al., 2018)	Schweiz	Geburtsgewicht 501-1500 Gramm		11,8% (Definition Sauerstoffsubstitution im Alter PMA 36 Wochen oder im Falle Verlegung im Alter PMA 34-35 Wochen)	
(Marques et al., 2019)	Portugal	Frühgeborene ≤ 28 SSW	41,0%		
KNN/(Lee et al., 2019)	Südkorea	Geburtsgewicht < 1500 Gramm		30%	

Tabelle 2: Auswahl von publizierten Prävalenzen der BPD in internationalen Kohortenstudien

Die Vergleichbarkeit der publizierten Prävalenzen der BPD in internationalen Kohortenstudien wird durch die Verwendung von unterschiedlichen Definitionen sowie von unterschiedlichen Einschlusskriterien der betrachteten Kohorten erschwert.

Sterblichkeit im weiteren Verlauf (Cristea et al., 2013).

Es zeigen sich zusätzlich weitere Langzeitfolgen. Die Diagnosestellung einer BPD geht mit einer eingeschränkten Lungenfunktion gemessen an der Einsekundenkapazität (FEV₁) im Schulalter einher. Des Weiteren klagen die Kinder häufiger über respiratorische Symptome wie z.B. belastungsinduzierte Bronchokonstriktion bzw. sie erhalten häufiger Antiasthmatica (Joshi et al., 2013; vom Hove et al., 2014).

Computertomographische Untersuchungen betroffener Kinder im Alter von 6 bis 8 Jahren zeigen vermehrt auffällige Befunde wie Fibrosierung, Emphysem, Verdickung der Bronchialwände und streifige Verschattungen. Eine daraus erwachsene mögliche Prädisposition der Kinder langfristig an einer COPD zu erkranken wird diskutiert (Broström et al., 2010).

Eine wichtige Komplikation der BPD im Langzeitverlauf ist die Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertension. Diese geht mit einer erhöhten Mortalität und komplizierteren klinischen Verläufen einher (Khemani et al., 2007; Kim et al., 2012). Bei Überlebenden zeigen sich eventuell auch Langzeitfolgen hinsichtlich der rechtsventrikulären Funktion (Kwon et al., 2016).

Zusätzlich ist ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer BPD und neurologischen Langzeitfolgen anzunehmen, was sowohl die motorische als auch die kognitive Entwicklung der Kinder einschließt (Cheong und Doyle, 2018).

So zeigten sich in einer Untersuchung aus den Niederlanden bei von einer BPD betroffenen Frühgeborenen < 30 SSW im Vergleich zu den nicht an einer BPD erkrankten Frühgeborenen eine deutlich erhöhte Rate entwicklungsneurologischer Defizite im korrigierten Alter von 2 Jahren und 5 Jahren. Hier war zudem eine Assoziation zwischen dem Schweregrad der BPD und dem Auftreten der entwicklungsneurologischen Defizite nachweisbar (Katz et al., 2022).

Pathophysiologie

Bei der bronchopulmonalen Dysplasie handelt es sich um eine erworbene chronische Erkrankung der Lunge von Frühgeborenen, die v.a. im Zusammenhang einer Sauerstofftherapie und mechanischer Beatmung auftritt (Christou und Brodsky, 2005). Nach heutigem Verständnis ist die Erkrankung multifaktoriell bedingt. In diesem Zusammenhang wird häufig in Abgrenzung zum seinerzeit von Northway et al. beschriebenen Krankheitsbild der Begriff „Neue BPD“ verwendet (A. J. Jobe, 1999).

Zusammenfassend stellt die „Neue BPD“ das klinische Syndrom der pulmonalen Unreife des Frühgeborenen verbunden mit einer Störung und folgenden diffusen Verminderung von Alveolarisierung und Mikrovaskularisierung dar, die als Konsequenz einer Lungenschädigung beobachtet wird. Die Folge ist eine Verminderung der zur Verfügung stehenden Gasaustauschfläche. Daneben sind Inflammation und Fibrosierung des Gewebes sowie eine Schädigung der Atemwege weitere Teilaspekte der Erkrankung (Baraldi und Filippone, 2007; Thébaud et al., 2019). Diese die Erkrankung kennzeichnenden Aspekte lassen sich in der pulmonalen Bildgebung sowie Histologie nachvollziehen.

In der Magnetresonanztomographie kann die Erkrankungen ein Mischbild aus unterschiedlichen Befunden zeigen. Zu diesen gehören u.a. eine generelle Überblähung sowie ein mosaikartiges Bild von Dichteunterschieden der Lunge. Es zeigen sich emphysematische Areale sowie auch fibrös interstitielle trianguläre pleuraständige Verschattungen. Ebenso können bronchovaskuläre Architekturstörungen auftreten (Higano et al., 2018).

Histopathologisch zeigen an BPD erkrankte und verstorbene Kinder eine simplifizierte Alveolenstruktur und eine generelle Erweiterung der distalen Lufträume der Lunge bzw. der Alveolen. Es lässt sich eine alveoläre septale Fibrosierung nachweisen. Gleichzeitig ist die interstitielle Kapillarisation der Lunge reduziert und es kommt zur Muskularisierung der kleinen Pulmonalarterien (Galambos et al., 2013; Husain et al., 1998). Zudem gibt es Hinweise auf das Auftreten intrapulmonaler Shunts durch arteriovenöse Anastomosen (Galambos et al., 2013).

Hinsichtlich der Pathogenese der Erkrankung wird angenommen, dass verschiedene schädigende Faktoren prä- und postnatal auf die sich in der Entwicklung befindende Lunge einwirken und das Krankheitsbild hervorrufen (Baraldi und Filippone, 2007; Herting, 2013; Shahzad et al., 2016). Zu den antenatalen Faktoren zählen u.a. eine intrauterine Wachstumsverzögerung und eine Chorioamnionitis, zu postnatalen Faktoren gehören beatmungsinduzierte Verletzungen der Lunge, oxidativer Stress, Surfactantmangel, Infektionen sowie ein Flüssigkeitsüberschuss in der Lunge und Ernährungsdefizite. Ante- und postnatale Exposition gegenüber Steroiden ist ebenfalls als ein möglicher Faktor zu betrachten (Baraldi und Filippone, 2007; Shahzad et al., 2016).

Im Rahmen der Frühgeburtlichkeit treffen diese Einflussfaktoren auf Lungengewebe, welches in diesem Zeitfenster normalerweise kritische fetale

Entwicklungsschritte vollzieht. Dies trifft insbesondere auf sehr unreife Frühgeborene zu, die einem erhöhten Risiko an einer BPD zu erkranken unterliegen. Mit Übergang von der kanalikulären in die sakkuläre Phase der Lungenentwicklung etwa um die 24. SSW herum beginnt eine weitergehende Septierung und Expansion der Lufträume und damit Vergrößerung der Oberflächen. Es kommt zur fortschreitenden Differenzierung von Typ I- und Typ II-Pneumozyten. Begleitend zur Alveolarisierung erfolgt die Gefäßreifung. Diese Prozesse schaffen bis zur Geburt die Voraussetzungen für einen effizienten Gasaustausch (Herting, 2013; Shahzad et al., 2016).

Besonders Infektion und Inflammation spielen im heutigen Verständnis der BPD eine wichtige Rolle und ein proinflammatorisches Milieu scheint ein fördernder Faktor ihrer Pathogenese zu sein.

Sowohl die Chorioamnionitis als auch die Sepsis des Frühgeborenen sind mit der späteren Entstehung einer BPD assoziiert (Ballard et al., 2016; Villamor-Martinez et al., 2019).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine perinatale Expression des inflammatorischen Zytokins IL-1 β in Epithelzellen der Lunge dort ein der BPD stark ähnelnden klinischen und histologischen Befund hervorruft (Bry et al., 2007). Des Weiteren konnte in einem Rhesus macaque Modell der pränatalen Chorioamnionitis durch pränatale Injektion von Lipopolysacchariden in die Amnionflüssigkeit eine perinatale pulmonale Inflammation erzeugt werden. Hierbei wurden gleichfalls stark der BPD ähnelnde histologische Befunde mit Störung der Alveolarisierung und Reduktion der Gasaustauschfläche bei den Feten hervorgerufen (Toth et al., 2022).

Passend zu diesen Tierstudien zeigen Kinder, bei denen später eine BPD diagnostiziert wird, im Vorfeld höhere Konzentrationen inflammatorischer Zytokine im untersuchten Atemwegssekret. Dies umfasst u.a. TNF α (Jónsson et al., 1997), IL-8 (D'Angio et al., 2002; Jónsson et al., 1997; Kotecha et al., 1995) und IL-6 (Choi et al., 2006; Jónsson et al., 1997). Dieser Zusammenhang gilt auch für weitere inflammatorische Zytokine (Baier et al., 2004).

Ebenso zeigen sich in solchen Proben vermehrt neutrophile Granulozyten sowie ICAM-1, welches ein für die Leukodiapedese bedeutsames Integrin darstellt (Kotecha et al., 1995; Todd et al., 1998). Des Weiteren sind Marker freier Sauerstoffradikale, wie sie im Rahmen einer Entzündungsreaktion entstehen, ebenfalls

signifikant erhöht (Contreras et al., 1996). Niedrigere Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Serum Frühgeborener 24 h nach der Geburt scheinen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an einer BPD zu erkranken einherzugehen (Mao et al., 2018). Es ist zu erwähnen, dass einige der im oberen Abschnitt zitierten Untersuchungen älteren Definitionskriterien der Bronchopulmonalen Dysplasie unterlagen.

Des Weiteren geben Daten aus Zwillingsstudien zudem Hinweise auf mögliche genetische Prädispositionsfaktoren (Bhandari et al., 2006; Lavoie et al., 2008).

Klinische Risikofaktoren

Für das Auftreten der BPD sind verschiedene prä- und postnatale klinische Risikofaktoren bekannt. Vor allem bedeutsam sind hier neben einem niedrigen Gestationsalter (s.o.) auch ein geringeres Geburtsgewicht bzw. eine intrauterine Wachstumsretardierung. So erkrankten in einer israelischen Untersuchung 13,7% der überlebenden Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g an einer BPD. Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1000 Gramm repräsentierten 70,7% dieser Gruppe, während Kinder mit einem Geburtsgewicht über 1000 g 75% der letztendlich nicht an BPD erkrankten Gruppe ausmachten. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Risikoerhöhung der BPD bei VLBW Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile (Klinger et al., 2013). Eine Assoziation zwischen intrauteriner Wachstumsretardierung und der BPD konnte auch an anderer Stelle bereits nachgewiesen werden (Bose et al., 2009; Gortner et al., 2011). Eine hochdosierte Sauerstofftherapie ist ebenfalls als Risikofaktor für die Entwicklung einer BPD anzusehen. So konnte in einer randomisierten Studie bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 24 bis 28 SSW die Reduktion der BPD Rate von 31,7% auf 15,4% nachgewiesen werden, wenn bei der Erstversorgung ein FiO_2 von 30% statt 90% verwendet wurde. Die insgesamt notwendigen Beatmungstage und die Dauer der Sauerstofftherapie verringerten sich durch diese Intervention ebenfalls signifikant (Vento et al., 2009). Des Weiteren spielen Traumata der Lunge durch eine mechanische Beatmung eine Rolle. Unter Verwendung schonenderer Beatmungs-Modi konnte eine Risikoreduzierung für die Entwicklung einer BPD nachgewiesen werden (Klingenberg et al., 2017). Gleiches gilt für die Behandlungsstrategien, die eine endotracheale Intubation und invasive Beatmung in Gänze vermeiden (Fischer und Bühner, 2013).

Ein weiterer Risikofaktor der BPD ist das männliche Geschlecht (Costeloe et al., 2012; Gortner et al., 2011; Klinger et al., 2013). Des Weiteren kommen Aspekten der Ernährung besondere Bedeutung zu und es ergeben sich Anhaltspunkte dafür, dass die Pathogenese der BPD auch ein nutritives Problem sein könnte. So war in mehreren Studien ein unzureichender enteraler Nahrungsaufbau mit dem Auftreten einer BPD bzw. deren Schweregrad assoziiert (Al-Jebawi et al., 2020; Malikiwi et al., 2019; Milanesi et al., 2021; Wemhöner et al., 2011). Gleiches gilt für eine Infusion zu hoher Flüssigkeitsmengen bei den Frühgeborenen (Al-Jebawi et al., 2020; Wemhöner et al., 2011). Konträr hierzu beschreibt eine Studie geringere Mengen infundierter Flüssigkeit bei von BPD betroffenen Frühgeborenen <28 SSW (Malikiwi et al., 2019). Zudem gibt es Hinweise, dass eine ausschließliche Ernährung der Frühgeborenen mit Muttermilch oder gespendeter Frauenmilch protektiv im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD wirkt (Hair et al., 2016; Spiegler et al., 2016).

Neonatales Immunsystem

Allgemeines

Das Immunsystem des Menschen dient der Erkennung und Eliminierung von Krankheitserregern sowie körperfremden potenziell schädlichen Proteinen und Strukturen. Gleichzeitig ist eine Eliminierung geschädigter Körperzellen- und -gewebe möglich. Eine zielsichere Unterscheidung in körpereigene und körperfremde Stoffe, Zellen und Gewebe verhindert Falschreaktionen des Immunsystems. Zugleich existieren das Immunsystem eingrenzende Faktoren, die Überreaktionen auf schädliche oder körperfremde Strukturen entgegenwirken. Es wird zwischen einer angeborenen und einer adaptiven Immunantwort unterschieden, welche jeweils auf zellulären und humoralen (löslichen) Bestandteilen fußt. Beide Systeme interagieren miteinander (Gulbins und Lang, 2019; Sedlacek, 2017 a).

Das Immunsystem des Neugeborenen weist im Gegensatz zur Immunität Erwachsener eine Ausrichtung in Richtung Antiinflammation auf. Die Folge ist, dass Neugeborene für das Auftreten von Infektionen mit z.T. schwerem Verlauf prädestiniert sind (Basha et al., 2014; Restori et al., 2018; Sedlacek, 2017 b). Auf der anderen Seite entspricht diese Prägung in Richtung Antiinflammation auch der physiologischen Notwendigkeit der immunologischen Toleranz des Fetus in der semi-allogenen Umgebung des Mutterleibes sowie der nachgeburtlichen Toleranz der

mikrobiellen kommensalen Besiedlung des Darmtraktes sowie weiterer Grenzflächen (Levy, 2007; Mold et al., 2008; Restori et al., 2018).

Ein entscheidender Aspekt bei Betrachtung des neonatalen Immunsystems ist die Defizienz der adaptiven Immunantwort, wodurch das Neugeborene in der Bekämpfung von Pathogenen vorrangig auf Mechanismen der angeborenen Immunantwort angewiesen ist (Basha et al., 2014; Lawrence et al., 2017; Levy, 2007). So sind aufgrund des geringen Antigenkontaktes in utero bei Geburt kaum Gedächtnis-B- und T-Zellen vorhanden (Dowling und Levy, 2014; Farber et al., 2014). Die dendritischen Zellen, die entscheidenden Anteil an der Initiierung der adaptiven Immunantwort haben, zeigen sich in ihrer Funktion unreif sowie in der Anzahl reduziert. Dies scheint ein Faktor in der eingeschränkten Fähigkeit des Neugeborenen zu sein, wirksame Gedächtniszellen der adaptiven Immunantwort zu bilden (Dowling und Levy, 2014; Upham et al., 2006).

Gleichzeitig zeigt sich im Neugeborenenalter eine deutliche Th2- und Th17-Polarisierung der adaptiven Immunantwort bei gleichzeitig reduzierter Th1-Antwort (Kollmann et al., 2012). Dies spiegelt sich u.a. auf zellulärer Ebene darin wider, dass aus Nabelschnurblut isolierte dendritische Zellen des Neugeborenen eine angelegte Tendenz in Richtung Induktion von Th2-Immunantworten haben (Naderi et al., 2009). Es besteht eine epigenetische Prägung der CD4⁺-Lymphozyten in Richtung der Produktion der vorrangig für eine Th2-Immunantwort stehenden Zytokine IL-4 und IL-13. IL-4 wiederum befördert die Apoptose von Th1 CD4⁺-Lymphozyten (Zaghouani et al., 2009).

Aspekte des angeborenen Immunsystems beim Neugeborenen, auf welches es bei der Abwehr von Pathogenen vorrangig angewiesen ist (s.o.), weisen im Vergleich zum Erwachsenen funktionelle Defizite auf, was zur Anfälligkeit für Infektionen beiträgt. Die betrifft u.a. auch neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (Guilmot et al., 2011; Lawrence et al., 2017).

Neuere Forschung unterstützt die Hypothese, dass das neonatale Immunsystem und insbesondere auch dessen adaptive Immunantwort einem gestaffelten Muster transienter Zellpopulationen entspricht, die im Rahmen von Entwicklungsschritten spezifische Aufgaben erfüllen (Dowling und Levy, 2014; Mold und McCune, 2011). Teil dieses Konzeptes sind hohe Zahlen von regulatorischen T-Zellen sowohl in der Fetalzeit sowie auch beim Neugeborenen, welche die in dieser Zeit notwendige immunologischen Toleranz des adaptiven Immunsystems mit vermitteln

(siehe hierzu auch den Abschnitt „Regulatorische T-Zellen – Rolle im Rahmen von Schwangerschaft und Frühgeburtlichkeit“).

Immunologische Besonderheiten des Frühgeborenen

Frühgeborene weisen in zahlreichen Teilaspekten der angeborenen und adaptiven Immunantwort weitere Besonderheiten auf, die sie möglicherweise im Vergleich zum Reifgeborenen zusätzlich für das Auftreten von Infektion oder inflammatorischen Phänomenen prädisponieren (Härtel et al., 2014; Melville und Moss, 2013). Aufgrund ihrer Mannigfaltigkeit kann hier nur beispielhaft auf diese eingegangen werden.

So finden wichtige Aspekte der Reifung der Haut als erste Barriere im letzten Drittel der Schwangerschaft statt und sind somit insbesondere bei unreifen Frühgeborenen zum Zeitpunkt der Geburt unzureichend erfolgt. Die Haut des Frühgeborenen ist dünner und die Verhornung des Stratum corneum reduziert, wodurch eine größere Permeabilität für Pathogene besteht (Narendran et al., 2010). Diese Barriere wird insbesondere auch durch notwendige invasive therapeutische Maßnahmen wie das Legen von Kathetern bei Frühgeborenen häufig zusätzlich eingeschränkt (Collins et al., 2018).

Des Weiteren bestehen auch funktionelle Unterschiede immunologischer Funktionen. So sind mit Blick auf die angeborene Immunantwort zum Beispiel die Rollen und die Adhäsion von Granulozyten, welche für deren Migration aus dem Gefäßsystem ins Gewebe im Falle einer Infektion entscheidende Prozesse sind, beim Frühgeborenen eingeschränkt (Nussbaum et al., 2013). Frühgeborene zeigen zudem im Rahmen der angeborenen Immunantwort eine abgeschwächte Zytokinausschüttung nach Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (Sharma et al., 2014).

Als weiteres Beispiel zu nennen ist, dass Neutrophile Granulozyten Frühgeborener wie auch Reifgeborener scheinbar nicht in der Lage sind, Neutrophil Extracellular Traps zu bilden, die normalerweise diesen Zellen als Mechanismus zur Unschädlichmachung extrazellulärer Pathogene zur Verfügung stehen (Yost et al., 2009). Kinder mit einem Geburtsgewicht von ≤ 1000 g oder einem Gestationsalter ≤ 28 Wochen zeigen in den ersten Lebenstagen signifikant niedrige Serumkonzentrationen von Mannose-bindendem Lektin, einem Protein, das Pathogene erkennen und das Komplementsystem aktivieren kann (Dzwonek et al., 2008).

Die Untersuchung von Nabelschnurblut ergibt bei Frühgeborenen ein deutlich proinflammatorisches Profil der Serumproteine mit z.B. erhöhten Werten für IL-8, CXCL11, CXCL1 und CD40, was insgesamt ein proinflammatorisches Milieu bei der Geburt der meisten Frühgeborenen nahelegt (Olin et al., 2018). Zudem ist beim Frühgeborenen eine signifikant reduzierte absolute Zellzahl fast aller immunologisch bedeutsamer Zellpopulationen im Vergleich zum Reifgeborenen feststellbar (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten). Es besteht eine positive Korrelation dieser Zellzahlen mit dem Gestationsalter. Bei Betrachtung der relativen Anteile haben Frühgeborene zudem deutlich weniger neutrophile Granulozyten, B-Zellen und Natürliche Killerzellen, während sich CD4⁺-T-Lymphozyten und CD8⁺-T-Lymphozyten erhöht zeigen (Correa-Rocha et al., 2012).

Interessanterweise handelt es sich bei den regulatorischen T-Zellen um die einzige immunologische Zellpopulation, die sich in der absoluten Zellzahl bei Frühgeborenen im Vergleich zu den Reifgeborenen nicht reduziert zeigt. Gleichzeitig ist ihr Anteil an den CD4⁺-T-Lymphozyten deutlich erhöht. Es besteht hierbei eine negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺-T-Lymphozyten und dem Gestationsalter (Correa-Rocha et al., 2012; Luciano et al., 2014; Rennó et al., 2016). Zu erwähnen ist jedoch, dass es inzwischen Hinweise gibt, dass Messungen im Nabelschnurblut möglicherweise nicht geeignet sind die postnatale Immunität des Neugeborenen zu evaluieren. Im Nabelschnurblut vermehrte immunsuppressive Zellpopulationen sind womöglich postnatal weniger bedeutsam für die Immunantwort (Olin et al., 2018).

Die absoluten und relativen Anteile der regulatorischen T-Zellen zeigen sich in der frühen Neonatalzeit im Vergleich zu Nabelschnurwerten noch deutlich erhöht und sinken dann zur späten Neonatalzeit hin ab (Hayakawa et al., 2017).

Bezüglich der regulatorischen T-Zellen konnte von unserer Arbeitsgruppe jedoch auch an peripherem Blut Frühgeborener eine negative Korrelation zwischen ihrem relativen Anteil regulatorischer T-Zellen und dem Gestationsalter nachgewiesen werden (Pagel et al., 2016).

Regulatorische T-Zellen

Allgemeines

Die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) gehören zur Gruppe der CD4⁺-T-Lymphozyten. Sie dienen dazu das Ausmaß einer T-Zell Immunreaktion einzugrenzen und

ermöglichen Toleranz gegenüber Antigenen. So wirken sie unter anderem der Entwicklung von Autoimmunität entgegen. Während naive T-Zellen erst nach ihrer Aktivierung CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) exprimieren, handelt es sich bei T_{reg} um Zellen, die dieses Antigen konstitutiv exprimieren. Sie besitzen daher im Gegensatz zu naiven T-Zellen, die bis zu ihrer Aktivierung die niedrigaffine Form des IL-2-Rezeptors aufweisen (β - und γ -Kette), dauerhaft dessen hochaffine Form (α -, β - und γ -Kette). IL-2 stabilisiert die T_{reg} nach deren Aktivierung, kann von diesen selbst aber nicht produziert werden. Es wird vor allem von naiven T-Zellen nach Aktivierung gebildet (Carbone et al., 2018).

Ein wichtiges Merkmal zur Identifikation von T_{reg} ist deren Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Carbone et al., 2018). Er ist entscheidend für die Entwicklung und Funktion der regulatorischen T-Zellen (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Illustriert wird dies unter anderem auch dadurch, dass Mutationen des FoxP3-Gens eine reduzierte Funktionalität der T_{reg} -Zellen und das schwere klinische Bild eines IPEX-Syndroms (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked) zur Folge haben (Bacchetta et al., 2006; Bennett et al., 2001).

T_{reg} -Zellen lassen sich weiter unterteilen in aus dem Thymus abgeleitete T_{reg} -Zellen (tT_{reg} , oder natürliche T_{reg} , nT_{reg}) und in der Peripherie abgeleitete T_{reg} -Zellen (pT_{reg} , oder induzierte T_{reg} , iT_{reg}), welche aus naiven $CD4^+$ -T-Zellen entstehen (Carbone et al., 2018; Sedlacek, 2017 c). Die pT_{reg} bilden sich in sekundären lymphatischen Organen, wenn naive T-Zellen unter Einfluss von TGF- β und IL-10, jedoch in Abwesenheit von IL-6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen, aktiviert werden. Somit wird durch sie einer überschießenden Immunantwort entgegengewirkt (Carbone et al., 2018; Sedlacek, 2017 c). Sie sind in ihren wesentlichen Merkmalen den tT_{reg} sehr ähnlich (Sedlacek, 2017 c).

Sowohl tT_{reg} wie auch pT_{reg} sind in der Lage die Zytokine TGF- β und IL-10 zu bilden, welche jeweils eine immuninhibitorische Wirkung entfalten. TGF- β führt zu geringerer Proliferation von T-Zellen und B-Zellen während IL-10 die Expression von MHC-Molekülen und weiteren kostimulatorischen Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen sowie die Funktion von Th1-Helferzellen einschränkt. Unter Einfluss von IL-10 werden zudem weniger proinflammatorische Zytokine durch antigenpräsentierende Zellen gebildet (Carbone et al., 2018; Sedlacek, 2017 c). Die

beiden Zytokine werden insbesondere nach Stimulation vermehrt ausgeschüttet (Nakamura et al., 2001).

Mittels der konstitutiven Expression von CD25 und damit des hochaffinen IL-2 Rezeptors sind T_{reg} zudem in der Lage IL-2 zu binden und somit das potenziell naive T-Zellen aktivierende IL-2 zu reduzieren (Carbone et al., 2018).

Die tT_{reg} exprimieren zudem den Rezeptor CTLA-4 (CD152) der an die B7-Moleküle antigenpräsentierender Zellen bindet und so deren kostimulierende Aktivität unterbindet (Carbone et al., 2018). Zudem wirkt CTLA-4 seinerseits costimulatorisch und verstärkt die Proliferation und die TGF- β Ausschüttung der regulatorischen T-Zellen nach deren Aktivierung (Nakamura et al., 2001). Hierbei ist CTLA-4 bei ruhenden T_{reg} vor allem in submembranösen Vesikeln zu finden, die nach Aktivierung vermehrt und schnell an die Zelloberfläche externalisiert werden. Auch nicht regulatorische T-Zellen besitzen intrazelluläres CTLA-4, jedoch in Golgi-Vesikeln, welches nach Aktivierung langsamer externalisiert wird und ebenfalls immunsuppressiv wirkt. (Tai et al., 2012). CTLA-4 wird auf regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert, auf konventionell T-Zellen hingegen nur nach Aktivierung (Walker, 2013).

Außerdem exprimieren T_{reg} die Ektonukleotidasen CD39 und CD73, welche in der Lage sind Adenosin aus extrazellulären Nukleotiden zu gewinnen. Über den Adenosin A2A-Rezeptor vermittelt das Adenosin dann eine hemmende Wirkung auf aktivierte T-Zellen (Deaglio et al., 2007). CD39 scheint von großer Bedeutung für die immunsuppressive Wirkung regulatorischer T-Zellen zu sein. So zeigen T_{reg} mit höherer Expression von CD39 eine höhere Stabilität und Funktionalität als die T_{reg} mit niedriger CD39 Expression. Hierdurch sind sie u.a. resistenter gegen ein inflammatorisches Zytokinmilieu (Gu et al., 2017).

Es wurde lange angenommen, dass der Transkriptionsfaktor Helios nur von tT_{reg} und nicht von pT_{reg} exprimiert wird und deshalb zur Unterscheidung beider Zellpopulation herangezogen werden könne (Thornton et al., 2010). Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass sich auch unter den tT_{reg} eine Helios negative Population identifizieren lässt. Helios⁺ und Helios⁻ tT_{reg} haben eine vergleichbare Expression von FoxP3 sowie von CTLA-4, HLA-DR und CD39 (Himmel et al., 2013). Zu der Frage, ob Helios⁺ T_{reg} eine höhere Suppressionskapazität aufweisen, wurden unterschiedliche Erkenntnisse publiziert (Himmel et al., 2013; Thornton et al., 2019). Das T-Zell-Rezeptor Repertoire sowie die Genexpressionsprofile von

Helios⁺ und Helios⁻ T_{reg} Populationen weisen große Unterschiede auf, sodass phänotypische und funktionelle Unterschiede anzunehmen sind (Thornton et al., 2019).

T_{reg} können unter anderem auch den Chemokinrezeptor CCR6 exprimieren, welcher auch auf weiteren T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen zu finden ist. Nicht vorhanden auf der T_{reg} Zelloberfläche ist aber dessen Ligand CCL20. CCR6 scheint durch Aktivierung bedeutsam in der Migration der T_{reg} zum Ort der Entzündung zu sein (Liao et al., 1999; Yamazaki et al., 2008). Bei den CCR6⁺ T_{reg} handelt es sich um sogenannte Gedächtniszellen nach bereits erfolgtem Antigenkontakt (Kleinewietfeld et al., 2005).

T_{reg} können mittels der Durchflusszytometrie nach entsprechender Bearbeitung von Vollblutproben identifiziert werden. Hierfür sind mehrere Gating-Strategien möglich, unter anderem CD4⁺ FoxP3⁺, CD4⁺ FoxP3⁺ CD127^{low/-}, CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-}, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, welche alle vergleichbar große Zellpopulationen identifizieren (Pagel et al., 2016; Rueda et al., 2015).

Ferner lassen sich ruhende bzw. naive CTLA-4^{low} Ki67⁻ CD45RA⁺ FoxP3^{low} T_{reg} von aktivierten CTLA-4^{high} Ki67⁺ CD45RA⁻ FoxP3^{high} T_{reg} unterscheiden. Bei Ki67 handelt es sich um ein intranukleäres Protein, das generell als Marker für die Proliferation von Zellen dient (Miyara et al., 2009).

Auch über die Untersuchung der Expression von HLA-DR auf T_{reg} lassen sich funktionell unterschiedliche Zellpopulation abgrenzen. So zeigt die HLA-DR⁺ Population eine größere Expression von FoxP3 und scheint die Suppression früh vor allem durch Zellkontakt zu bewerkstelligen, wohingegen die HLA-DR⁻ Population eine relativ niedrigere FoxP3 Expression mit einer frühen suppressiven Zytokinsekretion verbindet (Baecher-Allan et al., 2006).

Rolle im Rahmen von Schwangerschaft und Frühgeburtlichkeit

Die Anteile regulatorischer T-Zellen in fetalen Lymphknoten sind deutlich höher als in Lymphknoten Erwachsener. In Abwesenheit von T_{reg} zeigen sich fetale T-Zellen hoch reagibel auf Stimulation, was darauf hindeutet, dass T_{reg} ein entscheidender Faktor in der Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz in der Fetalzeit sind (Michaëlsson et al., 2006). Dies trifft wohl insbesondere auch auf die Toleranz gegenüber maternalen Antigenen zu. So gelangen mütterliche Zellen während der Schwangerschaft über die Plazenta in den kindlichen Organismus. Diese Zellen

sind in vitro prinzipiell in der Lage eine T-Zell Antwort zu induzieren, was jedoch durch fetale T_{reg} unterdrückt werden kann (Mold et al., 2008).

Neben den erhöhten relativen Anteilen regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut Früh- und Reifgeborener im Vergleich zu peripherem Blut Erwachsener, zeigen diese sich auch häufiger in einem CD45RA⁺ naiven Phänotyp. Insbesondere bei Frühgeborenen unter 34 SSW konnte auch eine verringerte CTLA-4 Expression der regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden (Rennó et al., 2016).

Es gibt zudem Hinweise, dass auch die maternale immunologische Toleranz gegenüber fetalen Antigenen im Rahmen der Schwangerschaft unter anderem durch regulatorische T-Zellen vermittelt wird (Kahn und Baltimore, 2010).

Eine Chorioamnionitis geht scheinbar bei sehr unreifen Frühgeborenen unter 28 SSW und einem Geburtsgewicht unter 1000 Gramm mit einem reduzierten Anteil regulatorischer T-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺-T-Zellen sowie einer verringerten Expression von Helios und CTLA-4 einher (Qazi et al., 2020). Zumindest in Bezug auf den relativen Anteil der T_{reg} an der Gesamtheit der CD4⁺-T-Zellen konnte unsere Arbeitsgruppe an Kohorten von Frühgeborenen unter 37 SSW diese Assoziation nicht nachweisen (Pagel et al., 2016 und Pagel et al., 2020). Dagegen zeigen Daten aus unserer Gruppe, dass die Frühgeborene, die eine Early-onset Sepsis entwickeln, an Lebenstag 1 und 3 erhöhte relative Anteile regulatorischer T-Zellen zeigen (Pagel et al., 2016).

Bei einer weiteren typischen Komplikation unreifer Frühgeborener, der nekrotisierenden Enterokolitis, zeigen sich in der Lamina propria des Ileums betroffener Kinder jeweils deutlich erniedrigte Verhältnisse von T_{reg} zu CD4⁺-T-Zellen bzw. zu CD8⁺-T-Zellen. Dieser Umstand könnte dem ausgeprägten inflammatorischen Geschehen im Rahmen dieser Erkrankung Vorschub leisten (Weitkamp et al., 2013).

Fragestellung

Die Bronchopulmonale Dysplasie ist eine chronische pulmonale Erkrankung besonders unreifer Frühgeborener, die wesentlich zu deren Morbidität und Mortalität beiträgt. Die inflammatorische Reaktion des unreifen Lungengewebes stellt einen wichtigen Teilaspekt der Pathogenese dar.

Die immunsuppressiv wirkenden regulatorischen T-Zellen kommen in hohen Anteilen bei Frühgeborenen vor und sind ein bedeutsamer Faktor ihrer Immunregulation. Die genaue Bedeutung der regulatorischen T-Zellen und ihrer Plastizität im Kontext der Entstehung einer BPD ist unklar. Insbesondere fehlen Daten zur quantitativen und phänotypischen Entwicklung der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut. Diese sind bei klinisch äußerst vulnerabilem Patientenkollektiv und nur niedrigen zur Verfügung stehenden Blutmengen schwer zu erheben. Laut Misra et al. zeigen diejenigen Frühgeborenen, die im weiteren Verlauf eine BPD entwickeln, zum Zeitpunkt der Geburt im Nabelschnurblut niedrigere absolute Mengen an regulatorischen und nicht regulatorischen T-Zellen (Misra et al., 2015). Es wurden daher folgende Hypothesen aufgestellt:

- Frühgeborene, die im weiteren klinischen Verlauf eine BPD entwickeln, weisen in den ersten Lebensstagen niedrigere relative Anteile regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺-T-Zellen auf.
- Unter Nutzung eines Durchflusszytometrie Multicolor-Panels bei Verwendung sehr geringer Mengen Vollbluts ist eine phänotypische Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen möglich, die eine weitere Untersuchung der Plastizität der regulatorischen T-Zellen bei Frühgeborenen erlaubt.

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zielsetzungen erarbeitet:

1. Untersuchung einer Assoziation der relativen Anteile regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺-T-Lymphozyten bei Frühgeborenen < 29+0 SSW zu unterschiedlichen Zeitpunkten des ersten Lebensmonats mit der späteren Diagnosestellung einer BPD
2. Ermöglichung weiterführender Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen und ihrer Plastizität im Kontext der Entstehung der BPD. Hierzu Etablierung eines umfangreichen Durchflusszytometrie Antikörperpanels inklusive inflammatorischer Marker zur phänotypischen Charakterisierung regulatorischer T-Zellen unter Nutzung sehr geringer Mengen Vollbluts Frühgeborener.

Material und Methoden

Material

Reagenzien

- eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
- eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
- eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
- eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)
- Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set (BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika)
- Anti-Rat Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set (BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika)
- PBS Puffer

Antikörper

- Panel quantitative Bestimmung T_{reg}:
 - FITC-konjugierter anti-human CD3 Antikörper, Maus IgG2a, Klon OKT3, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
 - PE-konjugierter anti-human CD4 Antikörper, Maus IgG1, Klon MT466, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
 - BV421-konjugierter anti-human CD25 Antikörper, Maus IgG1, Klon BC96, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - APC/eFluor 600-konjugierter anti-human FoxP3 Antikörper, Ratte IgG2a, Klon PCH101, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

- Panel phänotypische Charakterisierung T_{reg}:
 - FITC-konjugierter anti-human CD4 Antikörper, Maus IgG1, Klon RPA-T4, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - Alexa-Fluor® 700-konjugierter anti-human CD8a Antikörper, Maus IgG1, Klon RPA-T8, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - BV421-konjugierter anti-human CD25 Antikörper, Maus IgG1, Klon BC96, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - PE-konjugierter anti-human CD39 Antikörper, Maus IgG1, Klon A1, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - Brilliant Violet 711-konjugierter anti-human CD45RA Antikörper, Maus IgG2b, Klon HI100, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - Brilliant Violet 785-konjugierter anti-human CD127 Antikörper, Maus IgG1, Klon A019D5, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - PE/Dazzle 594-konjugierter anti-human CD152 (CTLA-4) Antikörper, Maus IgG2a, Klon BNI3, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - APC/eFluor 600-konjugierter anti-human FoxP3 Antikörper, Ratte IgG2a, Klon PCH101, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
 - PerCP-Cy5.5-konjugierter anti-human Helios Antikörper, Armenischer Hamster IgG, Klon 22F6, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - Brilliant Violet 510-konjugierter anti-human HLA-DR Antikörper, Maus IgG2a, Klon L243, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - PE/Cyanine7-konjugierter anti-human CCR6 (CD 196) Antikörper, Maus IgG2b, Klon G034E3, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
 - Brilliant Violet 605-konjugierter anti-human Ki67 Antikörper, Maus IgG1, Klon Ki67, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika

- Sonstiger im Rahmen der Erstellung der Kompensationsmatrix verwendeter Antikörper:
 - PerCP-Cy5.5-konjugierter anti-human CD 223 Antikörper, Maus IgG1, Klon 11C3C65, Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika (ausschließlich im Rahmen der Erstellung der FACS-Kompensation mittels Beads verwendet)

Laborwerkzeuge- und Hilfsmittel

- Pipetten Eppendorf Reference 1000/100/10 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Filterspitzen Biosphere® 0,5-20/2-100/100-1000 µl (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Serologische Pipetten CELLSTAR® 5/10/25 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Einmalhandschuhe Vinyl 2000 PF (Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland)
- Probenröhre geeignet für FACS 5 ml, 75x12 mm (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäß Multiply®-Pro 0,5 ml (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäß 1,5 ml (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Reagiergefäß SafeSeal 2 ml (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Schraubröhren 15 ml und 50 ml (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Blutentnahmegefäß Microvette® EDTA 500 µl (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Blutentnahmegefäß S-Monovette® EDTA 9 ml (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Parafilm (Bemis Flexible Packaging, Neenah, Vereinigte Staaten von Amerika)
- Universalstopfen für Probenröhren (SARSTEDT AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)

Geräte

- Zentrifuge Megafuge 2.0 R (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Zentrifuge 51417 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Schüttler REAX 2000 (Heidolph Instruments GmbH und CO. KG, Schwabach, Deutschland)
- Pipettierhelfer accu-jet[®] pro (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland)
- Pipettierhelfer Easypet[®] 3 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Blockthermostat PCH-2 (Grant Instruments Ltd, Shepreth, Vereinigtes Königreich)
- Kühlschrank 4 °C profi line (Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland)
- Gefrierschrank -20 °C (Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland)
- Durchflusszytometer BD LSR II (BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika), Arbeitsplatz ausgestattet mit BD FACSDIVA[™] Software (s.u.)

Software

- BD FACSDIVA[™] Software (BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika)
- FACS-Analysesoftware FlowJo Version 10 (BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika)
- Microsoft Access (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika)
- RStudio Version 3.5.2 (RStudio, Boston, Vereinigte Staaten von Amerika)
- R Package ggplot2 Version 3.2.1 (RStudio, Boston, Vereinigte Staaten von Amerika)

Methoden

Definitionen

BPD

Definition von Jobe und Bancalari, NIH-Konsensuskonferenz, vergleiche Tabelle 1

Gestationsalter	Angabe anhand geburtshilflicher Festlegung als postmenstruelles Alter auf Basis geburtshilflicher Untersuchung und pränataler Ultraschalluntersuchungen
SGA	Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile bezogen auf das jeweilige Gestationsalter und Geschlecht (Voigt et al., 2006)
EOS	<p>Sepsis innerhalb der ersten 72 h nach Geburt mit mindestens 5 Tagen antibiotischer Therapie aufgrund von ≥ 2 klinischer Entzündungszeichen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36.5^{\circ}\text{C}$ - Tachykardie $> 200/\text{min}$ - Beginn oder vermehrtes Auftreten von Bradykardien oder Apnoen - Hyperglykämie $> 140 \text{ mg/dl}$, - base excess $< -10 \text{ mmol/l}$, - graues Hautkolorit, - steigender Sauerstoffbedarf - auffälliger Laborparameter (CRP $> 5 \text{ mg/l}$, Thrombozyten $< 100/\text{nl}$, IT-Quotient (immature/total neutrophil ratio) > 0.2, Leukozyten $< 5/\text{nl}$)
LOS	<p>Sepsis mit Auftreten mindestens 72 h nach Geburt mit mindestens 5 Tagen antibiotischer Therapie aufgrund von ≥ 2 klinischer Entzündungszeichen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36.5^{\circ}\text{C}$ - Tachykardie $> 200/\text{min}$ - Beginn oder vermehrtes Auftreten von Bradykardien oder Apnoen

- Hyperglykämie > 140 mg/dl,
- base excess < -10 mmol/l,
- graues Hautkolorit,
- steigender Sauerstoffbedarf
- auffälliger Laborparameter (CRP > 5 mg/l, Thrombozyten < 100/nl, IT-Quotient (immature/total neutrophil ratio) > 0,2, Leukozyten < 5/nl)

V.a. AIS

Wehen mit oder ohne vorzeitigen Blasensprung sowie erhöhte maternale Entzündungsmarker ohne andere Ursache (CRP > 10 mg/l oder Leukozyten > 16/nl)

AIS

maternale Temperatur $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ohne andere Ursache und mindestens eines der folgenden klinischen Zeichen:

- erhöhte maternale Entzündungsmarker ohne andere Ursache (CRP > 10 mg/l oder Leukozyten > 16/nl)
- Wehen mit oder ohne vorzeitigen Blasensprung
- fetale oder maternale Tachykardie
- übelriechendes Fruchtwasser

NEC

operationspflichtige nekrotisierende Enterkolitis

FIP

operationspflichtige fokale intestinale Perforation

Präeklampsie

Angabe anhand geburtshilflicher Festlegung bei mütterlicher schwangerschaftsinduzierter Hypertonie, Ödemen und Proteinurie

Vorzeitige Wehentätigkeit

Wehentätigkeit vor < 37 SSW

Studienkohorte

Im Rahmen der Untersuchung wurden Vollblutproben von stationär in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck behandelten Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 23+0 bis 28+6 SSW untersucht. Die Datenerhebung durch unsere Arbeitsgruppe erfolgte im Zeitraum 1. Oktober 2014 bis 30. September 2018 von Montag bis Freitag und hierbei im Zeitraum 17. Oktober 2016 bis 26. Juni 2017 in Vollzeit durch den Verfasser dieser Arbeit.

Die Gewinnung der Proben fand im Rahmen ohnehin notwendiger regulärer Blutentnahmen aus medizinischer Indikation statt. Hierbei wurden durch die zuständigen Stationsärzte zusätzlich jeweils ca. 100-200 µl Vollblut in EDTA-Blutentnahmeröhren für die folgenden Untersuchungen asserviert. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils in den Zeiträumen Lebenstag 1-3, 4-10, 11-17, 18-24 und 25-31.

Ausschlusskriterien für diese Untersuchung waren letale Malformationen.

Gleichzeitig erfolgte die strukturierte Erfassung klinischer Daten der Frühgeborenen unter anderem auch im Hinblick auf die Entwicklung einer BPD in einer Datenbank. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Diagnostizierung einer BPD die Definition von Jobe und Bancalari zu Grunde gelegt (vgl. Tabelle 1) (A. H. Jobe und Bancalari, 2001).

Im Rahmen des Etablierungsprozesses des Antikörperpanels zur phänotypischen Charakterisierung regulatorischer T-Zellen (s.u.) wurden Vollblutproben erwachsener freiwilliger Blutspender sowie falls vorhanden Nabelschnurblutproben von Früh- und Reifgeborenen verwendet.

Für den Einschluss in die Untersuchungen wurde nach ausführlicher Aufklärung über deren Wesen und Ziele das schriftliche Einverständnis der Eltern oder gesetzlich Sorgeberechtigten der betreffenden Patienten sowie der erwachsenen Spender eingeholt.

Für die Durchführung der Untersuchungen lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor (Aktenzeichen 13-037, 15-304).

Quantitative Bestimmung regulatorischer T-Zellen in Vollblutproben Frühgeborener mittels Durchflusszytometrie

Probenverarbeitung

Die Weiterverarbeitung der Vollblutproben nach Blutentnahme erfolgte innerhalb von maximal 24 Stunden unter Lagerung der Probe bei Raumtemperatur. Durch Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnte eine ausreichende Vitalität der Zellen nach diesem Zeitintervall bestätigt werden. Die Probenverarbeitung erfolgte nach einem bereits etablierten und publizierten Protokoll unserer Arbeitsgruppe (Pagel et al., 2016).

Zu Beginn jeder Versuchsdurchführung wurde die notwendigen Permeabilisierungs- und Fixierungslösung für die intranukleäre Antigen-Färbung vorbereitet. Hierbei wurden entsprechend der Herstellerangaben die Lösungen des Reaktionskits „eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent“ in einer passenden Schraubröhre zusammengeführt. Pro Vollblutprobe wurden jeweils 1 ml der Permeabilisierungs- und Fixierungslösung zur intranukleären Färbung des FoxP3-Antigens benötigt.

Des Weiteren erfolgte vor der eigentlichen Versuchsdurchführung die Vorbereitung der Permeabilisierungs-Pufferlösung durch die Verdünnung des entsprechenden Konzentrats „eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X)“ nach Herstellerangaben mit destilliertem Wasser in einer Schraubröhre passender Größe. Pro Vollblutprobe wurden 4,5 ml Pufferlösung benötigt.

Im Anschluss wurden 100 µl der Vollblutprobe aus dem EDTA Blutentnahmegefäß in ein 2 ml fassendes Reagiergefäß überführt. Hiernach erfolgte die Zugabe der Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Färbung der Oberflächenantigene. Dies umfasste 5 µl des FITC-konjugierten anti-human CD3 Antikörpers, 10 µl des PE-konjugierten anti-human CD4 Antikörpers und 5 µl des BV421-konjugierten anti-human CD25 Antikörpers. Nach vorsichtiger Durchmischung der Probe auf dem Schüttler für 1 Sekunde, wurde die Probe für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Herauswaschen nicht gebundener Antikörper wurden der Probe in der Folge 1,5 ml der Pufferlösung „eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer“ zugeben. Nach Zentrifugation mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 300 RCF im „Soft“-Modus (verlangsamtes Anlaufen und Abbremsen der Zentrifuge) bei 22 °C für 5 Minuten wurde im Anschluss vorsichtig der Überstand über dem Zellpellet mit

einer Pipette abgenommen. Dieses wurde durch Zugabe von 1 ml der im Vorfeld vorbereiteten Permeabilisierungs- und Fixierungslösung (eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent) und anschließender Durchmischung der Probe für 2 Sekunden auf dem Schüttler resuspendiert. Die Probe wurde hiernach für 65 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.

Direkt im Anschluss wurde 1 ml der ebenfalls im Vorfeld vorbereitete Permeabilisierungs-Pufferlösung (eBioscience™ Permeabilization Buffer) zugegeben. Nach der folgenden Zentrifugation mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 300 RCF im „Soft“-Modus bei 22 °C für 5 Minuten wurde im Anschluss erneut vorsichtig der Überstand über dem Zellpellet mit einer Pipette abgenommen.

Es erfolgte nun die Zugabe von 5 µl des eFluor 600 (APC)-konjugierten anti-human FoxP3 Antikörpers. Nach vorsichtiger Durchmischung des Versuchsansatzes für etwa 1 Sekunde auf dem Schüttler wurde die Probe für weitere 75 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Zum erneuten Herauswaschen verbliebener ungebundener Antikörper wurden nun 1,5 ml der Permeabilisierungs-Pufferlösung (eBioscience™ Permeabilization Buffer) zugegeben gefolgt von einer Zentrifugation mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 300 RCF im „Soft“-Modus bei 22 °C für 5 Minuten mit anschließender Abnahme des Überstandes per Pipette. Es folgte eine Wiederholung dieses beschriebenen Waschschrittes.

Nun wurde das Zellpellet mit 300 µl der Pufferlösung „eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer“ resuspendiert. Hiernach wurde die Lösung auf dem Schüttler erneut durchmischt und in für die folgende Durchflusszytometrie geeignete Probenröhren überführt. Deren Öffnung wurde schließlich mit Parafilm abgedeckt und die Proben bis zur Durchführung der Durchflusszytometrie bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Durchflusszytometrie

Die Messungen am Durchflusszytometer erfolgten innerhalb von maximal 4 Tagen nach Probenverarbeitung. Hierbei wurde ein BD LSR II der Cell Analysis Core Facility des Instituts für Systemische Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck genutzt. Die Messungen wurden mit Hilfe der am dortigen Arbeitsplatz vorhandenen BD FACSDIVA™ Software durchgeführt und gesteuert. Die exakte

Auswertung der gemessenen Proben erfolgte separat unter Nutzung der FACS-Analysesoftware FlowJo Version 10.

Die gewählten Einstellungen der Kompensation wurden regelmäßig auf ihre Gültigkeit überprüft und bei Bedarf angepasst.

Regulatorische T-Zellen wurden als $CD3^+ CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ identifiziert (vgl. Abbildung 1). Es erfolgte hierdurch die Bestimmung des relativen Anteils der regulatorischen T-Zellen an den $CD4^+$ Lymphozyten. Nachfolgend wurden die erfassten relativen Anteile regulatorischer T-Zellen in die Datenbank unserer Arbeitsgruppe übertragen.

Die gewählte Gating-Strategie wurde mittels Fluorescence Minus One-Kontrollen geprüft (vgl. Abbildung Anhang A).

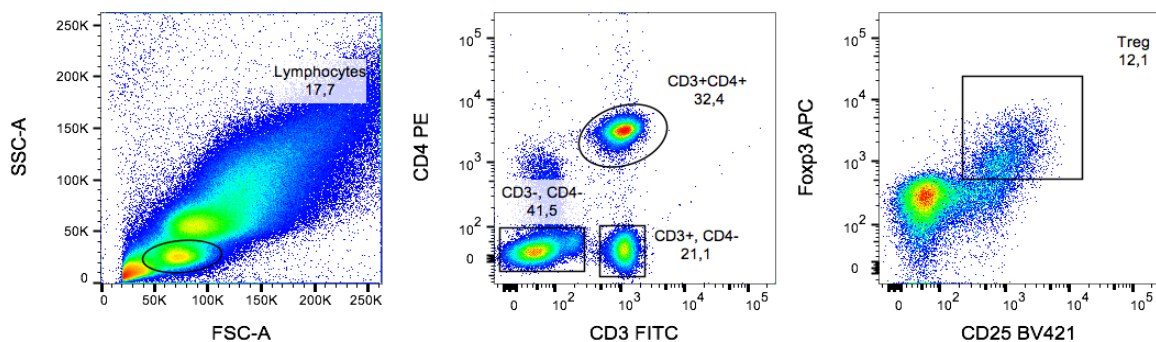


Abbildung 1: Bestimmung der relativen Menge regulatorischer T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

100 μ l einer Vollblutprobe wurden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt (CD3-FITC, CD4-PE, CD25-BV421 und FoxP3-eFluor 600). Der Beginn der Probenverarbeitung startete nicht später als 24 h nach Blutentnahme in ein EDTA Blutentnahmegefäß. Die Durchflusszytometrie erfolgte innerhalb von maximal 4 Tagen nach Probenverarbeitung. Regulatorische T-Zellen wurden als $CD3^+ CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ definiert. Die Gatingstrategie wurde mit Fluorescence Minus One-Kontrollen geprüft. Die Abbildung zeigt die Probe eines Frühgeborenen von 24 SSW am Lebenstag 36.

Statistische Auswertung

In der folgenden statistischen Auswertung wurden die relativen Anteile regulatorischer T-Zellen der Frühgeborenen < 29 SSW, die im Verlauf eine BPD entwickelten, mit denen derjenigen Frühgeborenen verglichen, die nicht an einer BPD erkrankten. Hierfür wurden, falls vorhanden, jeweils eine Probe aus den Zeiträumen Lebenstag 1-3, 4-10, 11-17, 18-24 und 25-31 in die Auswertung einbezogen. Falls möglich gingen in die Auswertung Proben der jeweils mittig im Zeitraum liegenden Lebenstage 7, 14, 21 und 28 ein. Für den Zeitraum der Lebenstage 1-3 wurden Proben des Lebenstages 1 bevorzugt. Standen zu den genannten Zeitpunkten

keine Proben zur Verfügung, wurden von jedem Frühgeborenen, falls vorhanden, Daten der jeweils nächstgelegenen ± 3 Lebenstage (bzw. + 2 Lebenstage für den Zeitraum Lebenstag 1-3) genutzt. Falls Daten zweier jeweils vom präferierten Lebenstag gleich weit entfernten Lebenstage vorhanden waren, so ging immer die Probe des jeweils niedrigeren Lebensstages stellvertretend für den gesamten Zeitraum in die Auswertung ein. Standen z.B. im Zeitraum Lebenstag 11-17 an Lebenstag 13 und 15 Proben zur Verfügung, so wurde die Probe von Lebenstag 13 in die weitere Datenauswertung einbezogen.

Proben, die einen unrealistisch niedrigen T_{reg} -Anteil $< 1\%$ an allen CD4+ Zellen zeigten, wurden in die Auswertung nicht einbezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte innerhalb unserer Arbeitsgruppe mit Unterstützung durch eine Diplom-Statistikerin. Es wurde hierfür die Software „RStudio“ Version 3.5.2 eingesetzt. Die Visualisierung der Daten wurde mittels der Software „R Package ggplot2“ Version 3.2.1 durchgeführt.

Die Daten stellten unverbundene Stichproben dar. Eine Auswertung erfolgte hinsichtlich zweier Stufen bzw. Gruppen (BPD betroffen/nicht betroffen) und zweier Variablen (Gruppierungsvariable BPD betroffen/nicht betroffen, abhängige Variable relativer T_{reg} -Anteil). Es lag keine Normalverteilung der in dieser Arbeit verglichenen Datensätze vor. Aufgrund der genannten Charakteristika der geplanten Auswertung wurde ein Mann-Whitney U-Test zum Vergleich der T_{reg} -Anteile in den jeweiligen Zeiträumen bei von einer BPD betroffenen und nicht betroffenen Frühgeborenen verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf p-Werte $< 0,05$ festgelegt.

Etablierung eines Antikörperpanels zur phänotypischen Charakterisierung regulatorischer T-Zellen in Vollblutproben Frühgeborener mittels Durchfluszytometrie

Die Planung, Durchführung und Auswertung der für die Etablierung des Antikörperpanels notwendigen Versuche erfolgte innerhalb unserer Arbeitsgruppe hauptsächlich durch den Verfasser dieser Arbeit. Unterstützt wurde der Prozess durch technisch-wissenschaftliche Ausbildung und Beratung durch Professor Claire Chougnet, PhD und Shibabrata Mukherjee, PhD aus der Division of Immunobiology des Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Der endgültige Etablierungsprozess erfolgte im Labor von Professor Dr. med. Jan Rupp aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie der Universität zu Lübeck.

Da zur Etablierung des Antikörperpanels inklusive von z.B. notwendigen Fluorescence Minus One-Kontrollen ca. 1-2 ml Vollblut pro Versuchsdurchführung notwendig waren, schied eine Verwendung von peripherem Blut Frühgeborener hierzu aus ethischen Gründen aus. Es wurde stattdessen auf die Blutproben erwachsener freiwilliger Spender sowie, falls vorhanden, auf Nabelschnurblutproben von Früh- und Reifgeborenen zurückgegriffen. Mit Blick auf die Vitalität der im Blut enthaltenen Zellen wurde eine Verarbeitung maximal 24 h nach der Blutentnahme durchgeführt.

Es wurde eine Färbung folgender Marker angestrebt: CD 4, CD 8, CD 25, CD 39, CD 45RA, CD 127, CD 152 (CTLA-4), FoxP3, Helios, HLA-DR, CCR6 und Ki67. Zudem wurde eine Vitalitätsprüfung der Zellen im Vollblut mittels eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 durchgeführt.

Als Ergebnis des Etablierungsprozesses wurde folgendes Protokoll erarbeitet: Analog zur Versuchsdurchführung im Rahmen des Antikörperpanels zur quantitativen Bestimmung regulatorischer T-Zellen (s.o.) erfolgte zu Beginn zunächst die Vorbereitung der notwendigen Permeabilisierungs- und Fixierungslösung für die intranukleäre Antigen-Färbung.

Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Lösungen des Reaktionskits „eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent“ in einer passenden Schraubröhre zusammengeführt. Pro Vollblutprobe wurden jeweils 1 ml der Permeabilisierungs- und Fixierungslösung zur intranukleären Färbung des FoxP3-Antigens sowie von Ki67 und Helios benötigt. Zusätzlich wurde auch die Permeabilisierungs-Pufferlösung durch die Verdünnung des entsprechenden Konzentrats „eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X)“ nach Herstellerangaben mit destilliertem Wasser in einer Schraubröhre passender Größe vorbereitet. Pro Vollblutprobe wurden 2,05 ml Pufferlösung benötigt. Zusätzlich wurde eine 1:100 Verdünnung des Farbstoffes zur Vitalitätsprüfung eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 hergestellt. Pro Probe wurden 5 µl der Verdünnungslösung benötigt.

Danach wurden 100 µl der Vollblutprobe aus dem EDTA Blutentnahmegefäß in eine für Durchflusszytometrie geeignete und 5 ml fassende Probenröhre überführt. Im Anschluss erfolgte zunächst die Zugabe von 5 µl der Verdünnungslösung des Farbstoffes zur Vitalitätsprüfung. Danach wurden die Fluorochrom-konjugierten Antikörper zur Färbung von Antigenen auf der Zelloberfläche der zu

untersuchenden Zellen zugegeben. Im Einzelnen waren dies 5 µl FITC-konjugierter anti-human CD4 Antikörper, 2 µl Alexa-Fluor® 700-konjugierter anti-human CD8a Antikörper, 5 µl BV421-konjugierter anti-human CD25 Antikörper, 5 µl PE-konjugierter anti-human CD39 Antikörper, 5 µl Brilliant Violet 711-konjugierter anti-human CD45RA Antikörper, Brilliant Violet 785-konjugierter anti-human CD127 Antikörper, 5 µl PE/Dazzle 594-konjugierter anti-human CD152 (CTLA-4) Antikörper, 5 µl Brilliant Violet 510-konjugierter anti-human HLA-DR Antikörper und 5 µl PE/Cyanine7-konjugierter anti-human CCR6 (CD 196) Antikörper. Nach Durchmischung der Probe auf dem Schüttler für 1 Sekunde, wurde diese im Anschluss für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde 1 ml PBS zugegeben und die Probe folgend mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem Zellpellet mittels vorsichtigen Abgießens dekantiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml der im Vorfeld vorbereiteten Permeabilisierungs- und Fixierungslösung (e-Bioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent) und die anschließende Resuspendierung des Zellpellets durch Durchmischung auf dem Schüttler für 2 Sekunden. Die Proben wurden daraufhin im Dunkeln bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde 1 ml der im Vorfeld vorbereiteten Permeabilisierungs-Pufferlösung (e-Bioscience™ Permeabilization Buffer) zugegeben und die Probe anschließend mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte ein erneutes Dekantieren des Überstandes über dem Zellpellet mittels vorsichtigen Abgießens sowie ein erneutes Resuspendieren des Zellpellets durch Hinzugabe von 50 µl Permeabilisierungs-Pufferlösung mit anschließender Inkubation über 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Antikörper zur Färbung der intranukleären Antigene ohne einen weiteren Waschschrift zugegeben. Es handelte sich hierbei um 5 µl des eFluor 600 (APC)-konjugierten anti-human FoxP3 Antikörpers, 5 µl des Brilliant Violet 605-konjugierten anti-human Ki67 Antikörpers und 5 µl des PerCP-Cy5.5-konjugierten anti-human Helios Antikörpers. Die Probe wurde hiernach für 1 Sekunde auf dem Schüttler durchmischt und dann für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde erneut 1 ml der Permeabilisierungs-Pufferlösung (eBioscience™ Permeabilization Buffer) zugegeben und die Probe anschließend mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem

Zellpellet wurde folgend erneut durch vorsichtiges Abgießen dekantiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift durch Zugabe von 1 ml PBS Puffer, nachfolgend die Zentrifugation mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten und anschließend das Dekantieren des Überstandes. Hiernach wurde das Zellpellet in 300 µl PBS Puffer resuspendiert. Die Probenröhre wurde schließlich mit Parafilm abgedeckt und die Proben bis zur Durchführung der Durchflusszytometrie bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Zur Erstellung einer korrekten Kompensationsmatrix für die jeweiligen Messungen am Durchflusszytometer wurden im Vorfeld Polystyrol Partikel mit den verwendeten Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden je nach Spezies der Fluorochrom-konjugierten Antikörper entsprechende Kits für Maus- und Rattenantikörper verwendet (Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set und Anti-Rat Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set). Diese enthalten jeweils Antikörper bindende und nicht-bindende Partikel.

Im Falle des PerCP-Cy5.5-konjugierten anti-human Helios Antikörpers, der vom Armenischen Hamster stammte, wurde ersatzweise ein mit demselben Fluorochrom beladener anti-human CD223 Antikörper der Maus verwendet.

Je Antikörper wurde ein separater Ansatz hergestellt.

Zu Beginn wurde jeweils ein Tropfen der Antikörper bindenden und ein Tropfen der Antikörper nicht-bindenden Partikellösung in eine für Durchflusszytometrie geeignete und 5 ml fassende Probenröhre überführt. Hiernach wurden jeweils 1 µl des entsprechenden Antikörpers hinzugegeben. Anschließend wurde 200 µl PBS Puffer hinzugefügt und die Probenröhren hiernach mit Parafilm verschlossen. Es erfolgte eine Lagerung der nun gefärbten Kompensationspartikel im Dunkeln bei 4 °C im Dunkeln bis zum Start der Durchflusszytometrie.

Im Falle der Vitalitätstestung mittels Fixable Viability Dye eFluor™ 780 wurden Einfach-Färbungen der Vollblut Zellen zur Erstellung der Kompensation angefertigt. Um ein ausreichendes Signal nicht vitaler Zellen zu erhalten, wurde entsprechend ein Teil der Zellen durch Hitze und Kälte getötet.

Zunächst wurden hierfür 100 µl Vollblut in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde dieses per Blockthermostat für 1 Minute bei 65 °C erhitzt. Direkt darauf wurde die Probe für 1 Minute auf Eis gelagert. Das Vollblut wurde anschließend in eine für Durchflusszytometrie geeignete und 5 ml fassende Probenröhre

überführt und dem Versuchsansatz noch zusätzlich unbehandelte 100 µl Vollblut beigefügt.

Nun erfolgte das Hinzufügen von 5 µl einer 1:100 Verdünnung des Farbstoffes zur Vitalitätsprüfung eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780.

Nach Durchmischung der Probe auf dem Schüttler für 1 Sekunde, wurde diese im Anschluss für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde 1 ml PBS zugegeben und die Probe folgend mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem Zellpellet mittels vorsichtigen Abgießens dekantiert. Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml der im Vorfeld vorbereiteten Permeabilisierungs- und Fixierungslösung (eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent) resuspendiert und der Versuchsansatz 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml der im Vorfeld vorbereiteten Permeabilisierungs-Pufferlösung (eBioscience™ Permeabilization Buffer) und die Probe wurde anschließend mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes über dem Zellpellet mittels vorsichtigen Abgießens wurde das Zellpellet durch Hinzugabe von 50 µl der Permeabilisierungs-Pufferlösung resuspendiert und anschließend über 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden erneut 1 ml Permeabilisierungs-Pufferlösung zugegeben und die Probe wurde anschließend mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Wiederholung des Dekantierens mittels vorsichtigen Abgießens wurde der Waschritt nun mit Resuspendierung des Zellpellets mit 1 ml PBS und anschließender Zentrifugation mit 1500 Umdrehungen pro Minute bei 22 °C für 5 Minuten wiederholt. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 300 µl PBS resuspendiert und die Probenröhre mit Parafilm verschlossen. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurde die bearbeitete Probe bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Ergebnisse

Charakterisierung der klinischen Kohorte

Für diese Arbeit wurde eine Subgruppe der Kohorte der IROn-Studie (Immunoregulation of the Newborn) der Klinik für Kinder und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck analysiert. Die Gesamtkohorte umfasste insgesamt 382 Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 23+0 bis 36+6 SSW, von der insgesamt 114 Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 29 SSW in die Untersuchung für die hier vorgelegte Arbeit eingeschlossen wurden. Begleitend wurden Daten zum klinischen Verlauf der Kinder systematisch durch unsere Arbeitsgruppe erhoben und in eine Access-Datenbank aufgenommen (vgl. Tabelle 3).

Das mittlere Gestationsalter der untersuchten klinischen Kohorte betrug 26+4 SSW. Das durchschnittliche Geburtsgewicht der untersuchten Frühgeborenen wurde mit 916 Gramm bestimmt. 41,2% der Kinder waren weiblich, 58,8% männlich. 11,4% zeigten ein Geburtsgewicht unter der 90. Perzentile (small for gestational age, SGA). In 78,6% lag eine vorzeitige Wehentätigkeit oder ein Amnioninfektionssyndrom als Ursache der Frühgeburt vor. Bei 6,25% hing die Frühgeburtlichkeit ätiologisch mit einer Präeklampsie zusammen. Der weit überwiegende Teil von 87,5% der Kinder kam im Rahmen eines elektiven Kaiserschnitts zu Welt, wohingegen jeweils 6,25% der Kinder als Spontangeburt oder bei einem Notfall-Kaiserschnitt das Licht der Welt erblickten (vgl. Tabelle 3).

Im Falle eines Frühgeborenen konnte keine Angabe darüber, ob die Diagnose einer BPD vorlag oder nicht, in unserer Datenbank erfasst werden. Nach Ausschluss dieses Falls wurden Untersuchungsergebnisse von 113 Frühgeborenen in die weitere Auswertung der Daten aufgenommen. Bei insgesamt 57 dieser Kinder wurde eine BPD festgestellt (50,4%), 56 Kinder erkrankten nicht (49,6%). Da die Blutentnahmen bei den untersuchten Kindern rein aus medizinischer Indikation stattfanden bzw. aus klinischen Gründen im Einzelfall auf eine zusätzliche Blutentnahme zu Forschungszwecken verzichtet wurde, stand nicht immer bei allen Kindern in jedem Zeitintervall ein Wert zur Verfügung. In den betrachteten Zeiträumen Lebenstag 1-3 sowie 18-24 war eine vergleichbare Anzahl von Proben in der von BPD betroffenen und der nicht von BPD betroffenen Gruppe verfügbar. In den Zeiträumen Lebenstag 4-10 und 11-17 sowie 25-31 standen in der von BPD betroffenen Gruppe Kinder jeweils mehr Proben zur Verfügung (vgl. Tabelle 4).

Gesamtzahl n	114
Gestationsalter	26+4 SSW ± 11 Tage
Geburtsgewicht in Gramm	916 ± 272 Gramm
SGA	13 (11,4%)
Geschlecht	weiblich 47 (41,2%), männlich 67 (58,8%)
BPD	
vorhanden	57 (50,4%)
nicht vorhanden	56 (49,6%)
nicht erfasst	1 (-)
Sonstige Erkrankungen (z.T. Mehrfachangabe)	
EOS	21 (18,4%)
LOS	30 (26,3%)
NEC	5 (4,4%)
FIP	8 (7,0%)
Mehrere	34 (29,8%)
Geburtsmodus	
spontan	7 (6,25%)
Kaiserschnitt elektiv	98 (87,5%)
Kaiserschnitt Notfall	7 (6,25%)
nicht erfasst	2 (-)
Grund der Frühgeburtlichkeit (z.T. Mehrfachangabe)	
Vorzeitige Wehentätigkeit oder V.a. AIS	88 (78,6%)
Präeklampsie	7 (6,3%)
pathologischer Doppler-Ultraschall	20 (17,9%)
andere	41 (36,6%)
nicht erfasst	2 (-)

Tabelle 3: Epidemiologische Daten der untersuchten Kohorte

Es wurden insgesamt 114 Frühgeborene < 29 SSW in die Untersuchung eingeschlossen. Bei 57 Kindern wurde im weiteren Verlauf eine BPD diagnostiziert, bei 56 Patienten trat diese nicht auf. Bei einem Patienten konnte hinsichtlich der Diagnosestellung einer BPD keine Angabe erfasst werden, sodass folgend Daten von insgesamt 113 Patienten in die weitere Datenauswertung einbezogen wurden. Die Darstellung der Daten erfolgt bezogen auf Gestationsalter und Geburtsgewicht als Mittelwert mit Standardabweichung, für die restlichen Werte als Absolutwert und relativen Anteil in Klammern.

	LT 1-3	LT 4-10	LT 11-17	LT 18-24	LT 25-31
Keine BPD (n=56)	42	35	38	34	32
BPD (n=57)	43	44	44	35	37

Tabelle 4: Anzahl untersuchter Proben pro Betrachtungszeitraum

Aufgeführt sind die jeweils pro betrachtetem Zeitraum vorliegende Zahl von Proben zur Bestimmung der relativen Anteile der regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺-T-Lymphozyten. Da die Probenentnahme rein aus medizinischer Indikationsstellung erfolgte, lagen pro eingeschlossenen Patienten nicht immer für jedes Zeitintervall eine untersuchte Blutprobe vor.

	1 BZ	2 BZ	3 BZ	4 BZ	5 BZ
Keine BPD (n=56)	4	10	16	21	5
BPD (n=57)	1	7	17	23	9
BPD nicht erfasst (n=1)	1	-	-	-	-

Tabelle 5: Anzahl eingeschlossener Patienten dargestellt nach Anzahl mit zugehörigen Proben abgedeckter Betrachtungszeiträume (BZ)

Aufgeführt sind die jeweiligen Zahlen eingeschlossener Patienten in Bezug auf die Anzahl der mit den zugehörigen untersuchten Proben abgedeckten Betrachtungszeiträume (LT 1-3, LT 4-10, LT 11-17, LT 18-24, LT 25-31). Da die Probenentnahme rein aus medizinischer Indikationsstellung erfolgte, lagen pro eingeschlossenen Patienten nicht für jedes Zeitintervall eine untersuchte Blutprobe vor.

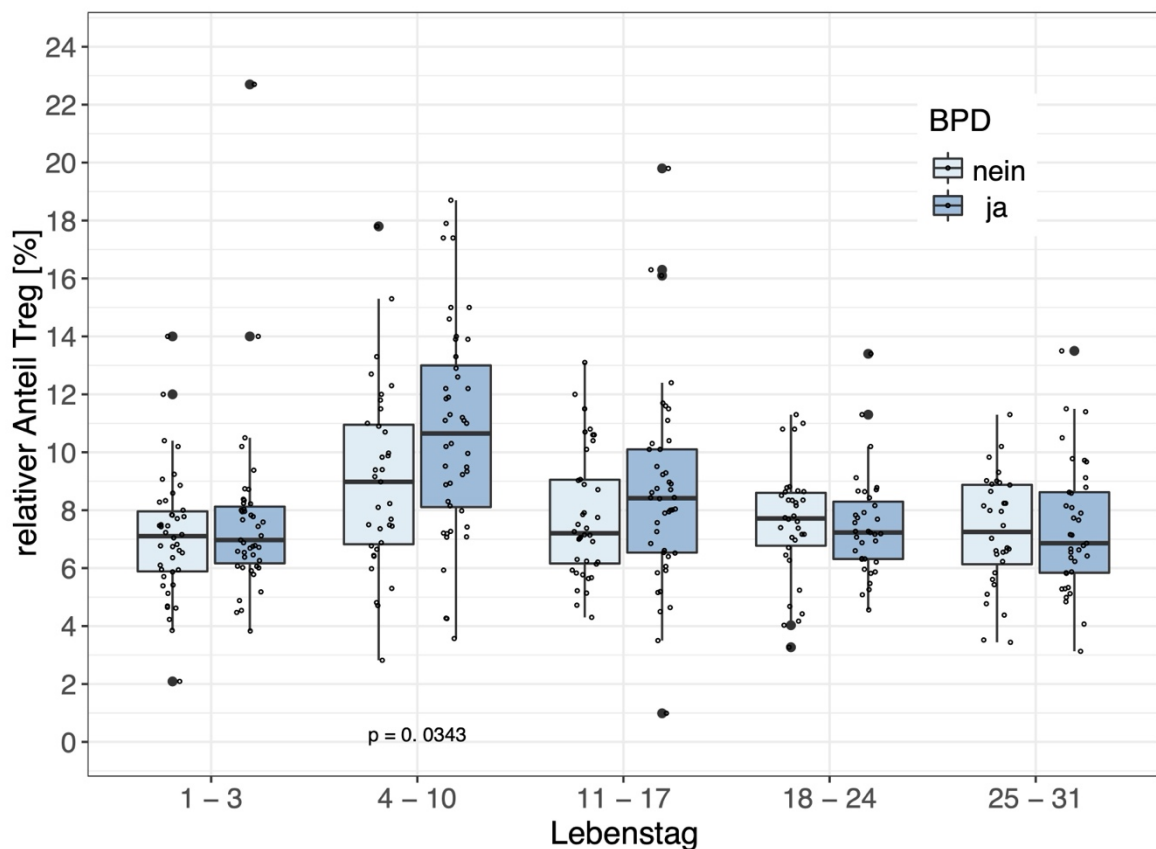


Abbildung 2: Anteile regulatorischer T-Zellen von an BPD erkrankten und nicht erkrankten Frühgeborenen < 29 SSW im ersten Lebensmonat

Die relativen Anteile der T_{reg} an den $CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden für die definierten Zeiträume Lebenstag 1-3, 4-10, 11-17, 18-24 und 25-31 von den an einer BPD erkrankten bzw. nicht erkrankten Frühgeborenen dargestellt. Jeder schwarze Kreis stellt den Messwert eines Frühgeborenen im jeweiligen Zeitraum dar. Die Daten sind als Box-Plots mit Median, oberem Quartil, unterem Quartil sowie 95%-Konfidenzintervall abgebildet. Außerhalb letzterem liegende ausreißende Wert sind als dicke schwarze Punkte dargestellt. Im Vergleich zeigten sich die relativen Anteile regulatorischer T-Zellen der im Verlauf an BPD erkrankten Frühgeborenen im Zeitraum Lebenstag 4-10 signifikant erhöht ($p=0,343$). In den restlichen betrachteten Zeiträumen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (LT 1-3: $p=0,592$; LT 11-17: $p=0,218$; LT 18-24: $p=0,475$; LT 25-31: $p=0,857$).

(Abbildung abgewandelt übernommen aus: Pagel, J., Twisselmann, N., Rausch, T. K., Waschina, S., Hartz, A., Steinbeis, M., Olbertz, J. et al. (2020). Increased Regulatory T Cells Precede the Development of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants. *Frontiers in Immunology*, 11, 565257)

Assoziation der relativen Anteile regulatorischer T-Zellen mit der späteren Diagnosestellung einer Bronchopulmonalen Dysplasie

In der statistischen Analyse konnte gezeigt werden, dass diejenigen Frühgeborenen der betrachteten Kohorte, die im weiteren klinischen Verlauf eine BPD entwickelten im Zeitraum Lebenstag 4 bis 10 signifikant höhere Anteile regulatorischer T-Zellen an den CD4+ T-Lymphozyten zeigten ($p=0,0343$). In den restlichen betrachteten Zeiträumen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 2). Insofern traf die ursprünglich aufgestellte Hypothese, dass sich die regulatorischen T-Zellen bei Kindern vor Entwicklung einer BPD eventuell verringert zeigen, nicht zu. Es konnte stattdessen eine entgegengesetzte Assoziation nachgewiesen werden.

Etablierung eines Multicolor-Panels zur Phänotypisierung regulatorischer T-Zellen

Im Rahmen des Etablierungsprozesses des Multicolor-Panels zur Phänotypisierung regulatorischer T-Zellen wurden verschiedene Marker von Interesse identifiziert und entsprechend eine Auswahl von geeigneten Fluorochrom-konjugierten Antikörpern getroffen. Für eine detaillierte Auflistung der verwendeten Fluorochrom-konjugierten Antikörper wird auf die unter Material auf Seite 25-27 dieser Arbeit aufgeführten Antikörper verwiesen.

Es wurden die Marker CD 4, CD 8, CD 25, CD 39, CD 127 und FoxP3 zur sicheren Identifikation der regulatorischen T-Zellen sowie der Marker CD 45RA zur Erkennung eines naiven Phänotyps einbezogen. Gleichsam wurden die Marker CD 152 (CTLA-4), Helios, HLA-DR, CCR6 und Ki67 zur Detektion eines inflammatorischen Phänotyps der regulatorischen T-Zellen zugefügt. Für weitere Informationen zu den Charakteristika der verwendeten Marker siehe Allgemeines unter Regulatorische T-Zellen auf Seite 20-22 dieser Arbeit.

Vor dem Hintergrund, dass die Fluorochrom-konjugierten Antikörper an kleinsten Mengen ständig wechselnder und nicht standardisierbarer Vollblutproben mit abweichenden Zellzahlen eingesetzt werden sollten, erschien eine Zählung der Zellen vor Versuchsbeginn und entsprechendes Titrieren der Antikörper nicht praktikabel. Insbesondere auch mit Blick auf die in unserer Arbeitsgruppe geplante größere Anzahl zu verarbeitender Proben pro Tag wäre dies nicht umsetzbar gewesen. Gleichzeitig hätte eine Entnahme von Vollblut aus der Probe zum Zählen der

Zellen deren ohnehin schon geringe Menge dezimiert. Aus diesem Grunde wurden bei der Probenbearbeitung im Wesentlichen den Herstellerempfehlungen zur Menge des eingesetzten Antikörpers bei Vollblut gefolgt.

Es fand eine kontinuierliche Optimierung des Versuchsablaufes statt. Der Verlust von Zellen insbesondere durch Waschschriffe wurde minimiert. Hierunter konnte gewährleistet werden, dass unter der geringen Menge verwendeten Vollbluts von 100 µl stets eine ausreichend große Zahl von Leukozyten inklusive der Zielpopulation von Interessen, der regulatorischen T-Zellen, gefärbt wurde.

Mit Blick auf die große Anzahl von verwendeten Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen mit sich zum Teil überlagernden Emissionsspektrums war mit Streuphänomenen in benachbarte Messkanäle zu rechnen. Deshalb kam der Erstellung einer suffizienten Kompensationsmatrix eine entscheidende Bedeutung zu. Diese erfolgte unter Verwendung von vorbereiteten und gefärbten Kompensationspartikeln sowie einer Einzelfärbung des Vitalitätsfarbstoffes an zum Teil im Vorfeld thermisch getöteten Zellen. Hierbei wurde noch am Durchflusszytometer mittels der BD FACSDIVA™ Software eine vorläufige Kompensationsmatrix generiert, welche im Anschluss nochmals manuell mit der FACS-Analysesoftware FlowJo Version 10 systematisch geprüft und korrigiert wurde.

Im Rahmen der Analyse der am Durchflusszytometer aufgezeichneten Signale wurde eine Gatingstrategie zur Identifizierung der regulatorischen T-Zellen entwickelt und angewendet.

Zunächst wurde durch Auftrennung im Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) die Lymphozytenpopulation identifiziert. Bei insgesamt hoher Gesamtzahl an aufgezeichneten Zellen wurde ein möglichst enger Gatingbereich hierfür angestrebt, um tote Zellen sowie Zellen, die nicht von Interesse sind, auszuschließen und hiermit die nachfolgende Analyse zu vereinfachen. Gleichzeitig sollte aber vermieden werden, dass durch zu enges Gating die am Ende relativ geringe Zahl der regulatorischen T-Zellen zusätzlich reduziert wird. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen sich durch den Fixierungs- und Permeabilisierungsprozess in Größe und Dichte verändert hatten. Aus den genannten Gründen wurden deshalb der Bereich des Gatings der Lymphozyten im FSC gegen SSC über Backgating von Einzelzellen und CD4⁺ Zellen genau bestimmt. Der hier ermittelte Gatingbereich wurde dann auf die FSC gegen SSC Darstellung angewendet.

An der nun ermittelten Zellpopulation wurden hiernach durch Darstellung nach FSC Höhe (FSC-H, forward scatter height) und FSC Fläche (FSC-A, forward scatter area) Zell-Dubletten ausgeschlossen.

Regulatorische T-Zellen wurden daraufhin als CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ identifiziert. Zunächst erfolgte ein Gating auf die CD4⁺ T-Lymphozyten. In dieser Zellpopulation wurde in der Darstellung CD25 gegen FoxP3 ein Gating auf die CD25⁺ FoxP3⁺ Zellen gelegt (vgl. Abbildung 3). Es konnte gezeigt werden, dass die so identifizierte Population regulatorischer T-Zellen überwiegend CD8⁻ und CD127^{low/-} ist, was den gewählten Gating-Ansatz zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen als sicher bestätigte.

Alle Marker zur phänotypischen Charakterisierung konnten regelhaft dargestellt werden. Über eine Vitalitätsprüfung wurde die Färbung toter Zellen ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 4). Die Funktionsprüfung der Färbung toter Zellen erfolgte begleitend zur Versuchsdurchführung (vgl. Abbildung 5). Die gewählte Gating-Strategie wurde anhand von Fluorescence Minus One-Kontrollen geprüft (vgl. Abbildung 6 und 7).

Weitere explorative Versuchsdurchführungen unter Verwendung des Multicolor-Panels finden sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Anhang Abbildung B Verwendung peripheres Blut Frühgeborene, Abbildung C Verwendung peripheres Blut erwachsene Spenderin).

Das entwickelte Antikörperpanel wurde nach Abschluss dieses Promotionsvorhabens routinemäßig in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt. Hiermit gewonnene Daten wurden zwischenzeitlich publiziert. Unter anderem konnte hierbei auch eine Plastizität der regulatorischen T-Zellen Frühgeborener zu einem passageren, inflammatorischen und aktivierten Phänotyp im Zeitraum Lebenstag 4-10 gezeigt werden (Pagel et al., 2020).

Zusammenfassend konnte die aufgestellte Hypothese, dass unter Nutzung eines Durchflusszytometrie Multicolor-Panels bei Verwendung sehr geringer Mengen Vollbluts eine phänotypische Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen möglich ist, bestätigt werden.

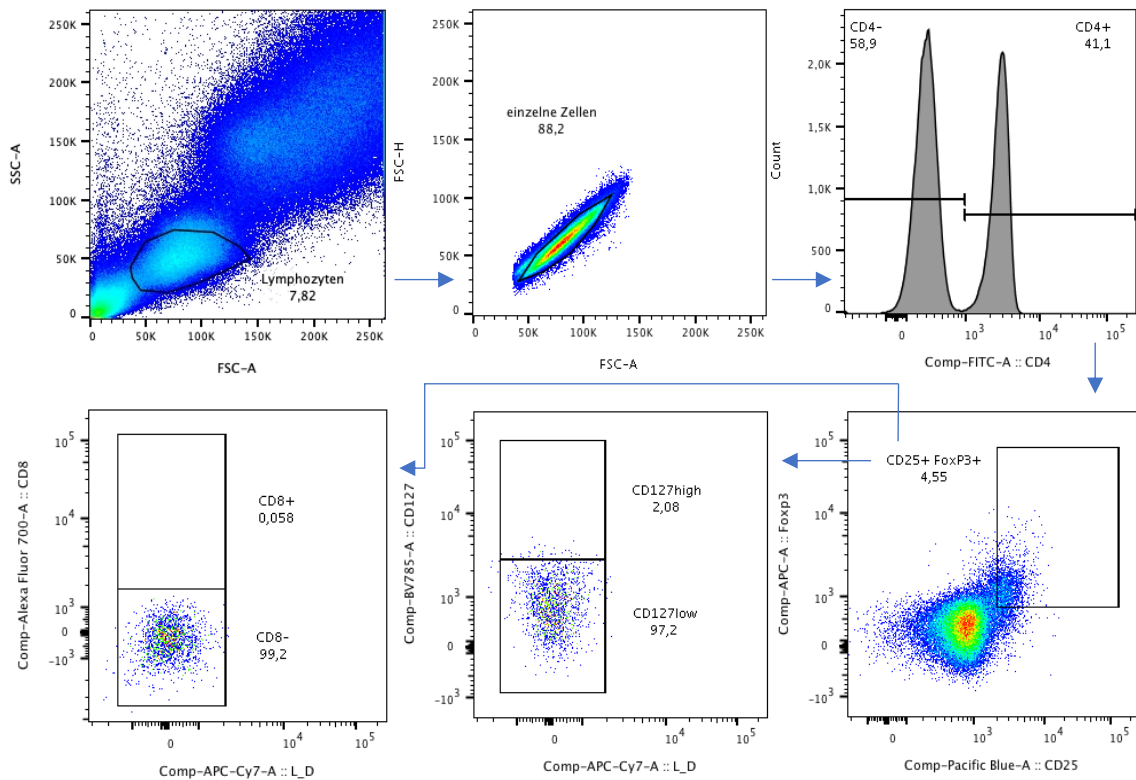


Abbildung 3: Gating zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wurden als $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ definiert. Die Gatinggrenzen für Lymphozyten in der Darstellung FSC gegen SSC wurden mittels Backgating $CD4^+$ Einzelzellen bestimmt. Es erfolgte ein Ausschluss von Zelldubletten. Die regulatorischen T-Zellen konnten mit dem gezeigten Gating identifiziert werden. Die resultierende Zellpopulation zeigte sich streng als $CD8^-$ und $CD127^{low}$ sowie lebend in der Vitalitätsfärbung. Die Abbildung zeigt eine Probe von Nabelschnurblut eines reifen Neugeborenen von 39+6 SSW.

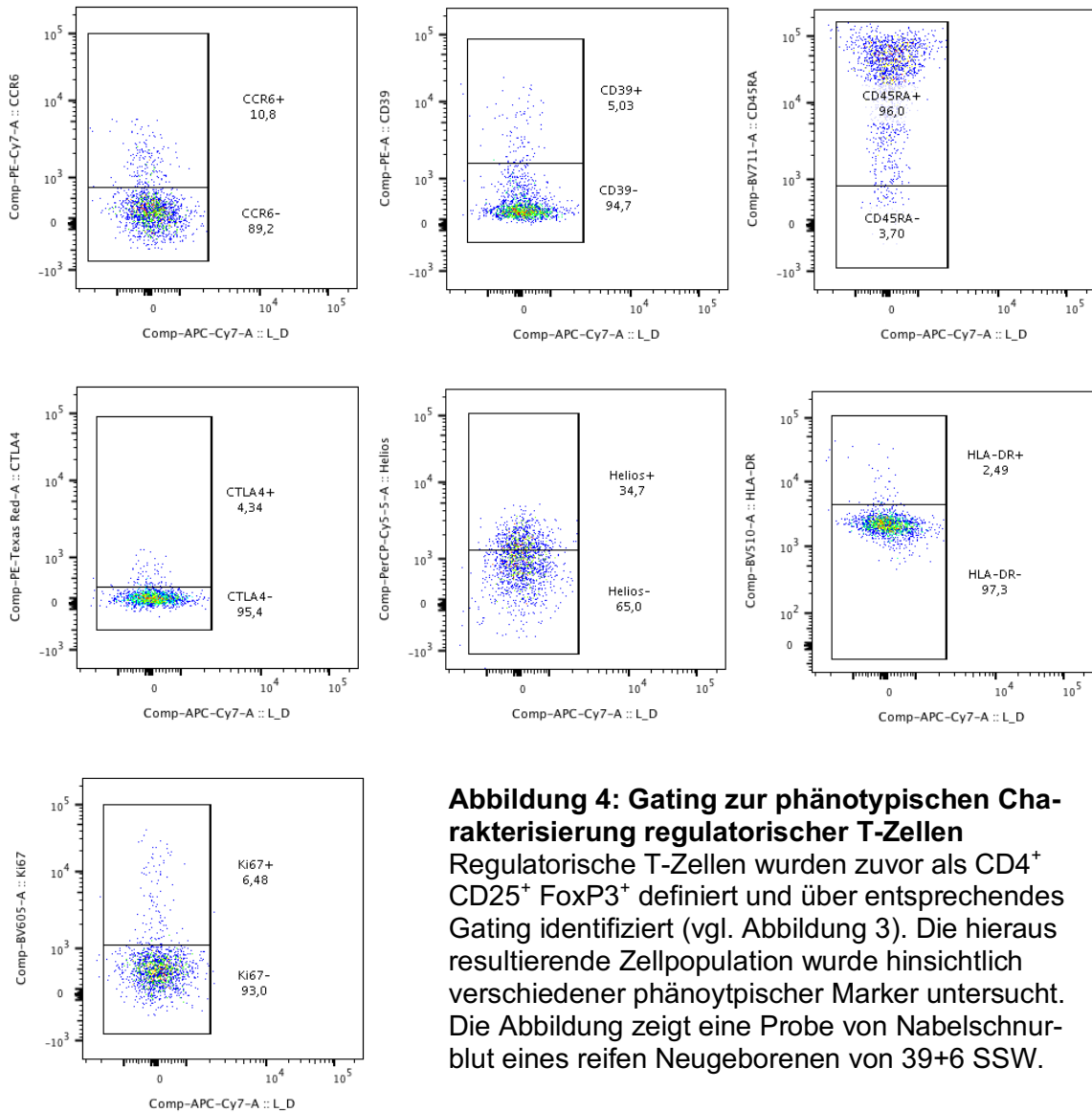


Abbildung 4: Gating zur phänotypischen Charakterisierung regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wurden zuvor als CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ definiert und über entsprechendes Gating identifiziert (vgl. Abbildung 3). Die hieraus resultierende Zellpopulation wurde hinsichtlich verschiedener phänotypischer Marker untersucht. Die Abbildung zeigt eine Probe von Nabelschnurblut eines reifen Neugeborenen von 39+6 SSW.

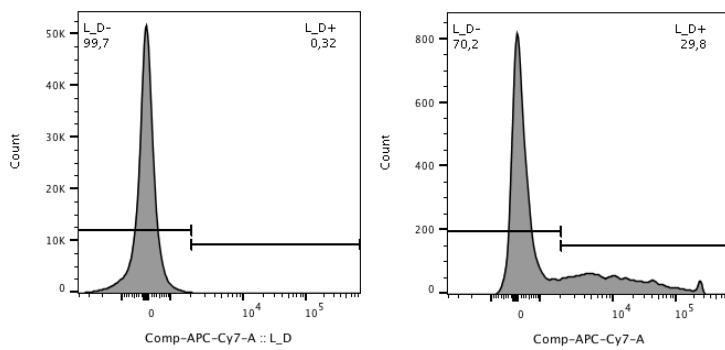


Abbildung 5: Funktionskontrolle der Vitalitätsprüfung

Verwendet wurde der Farbstoff Fixable Viability Dye e-Fluor™ 780 zur Prüfung der Vitalität.

Links abgebildet ist eine Färbung unbehandelter vitaler Zellen, anhand derer das Gating vitaler Zellen festgelegt wurde. Rechts wurden partiell thermisch getötete Zellen gefärbt.

Gezeigt wird die Nabelschnurblutprobe eines Reifgeborenen von 38+5 SSW.

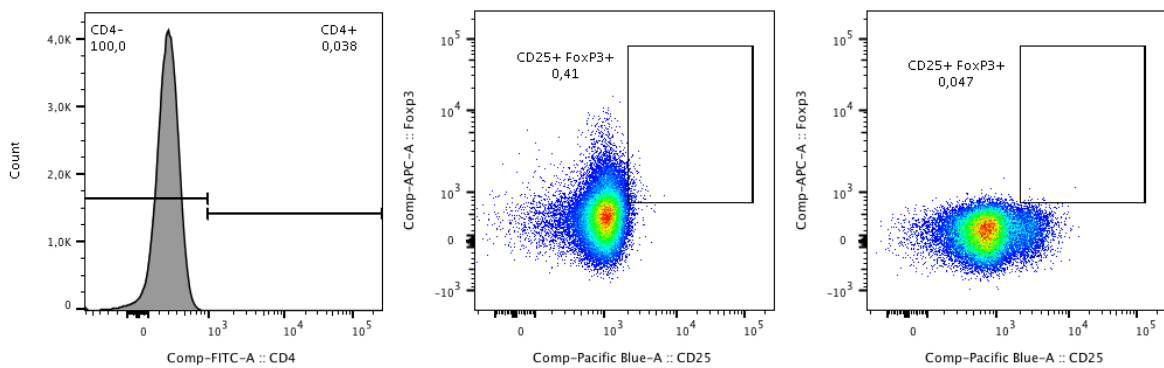


Abbildung 6: Fluorescence Minus One-Kontrolle des Gatings zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen

Links wurde abgebildet die CD4 FMO Kontrolle nach Gating auf die Lymphozyten und Einzelzellen.

Mittig ist abgebildet die CD25 FMO Kontrolle sowie rechts die FoxP3 FMO Kontrolle jeweils nach Gating auf die CD4⁺ T-Lymphozyten nach Ausschluss von Zeldubletten. Die jeweiligen Gatingbereiche wurden analog zur Abbildung 3 gewählt. Die Abbildung zeigt die Nabelschnurblutprobe desselben Neugeborenen von 39+6 SSW wie in Abbildung 3.

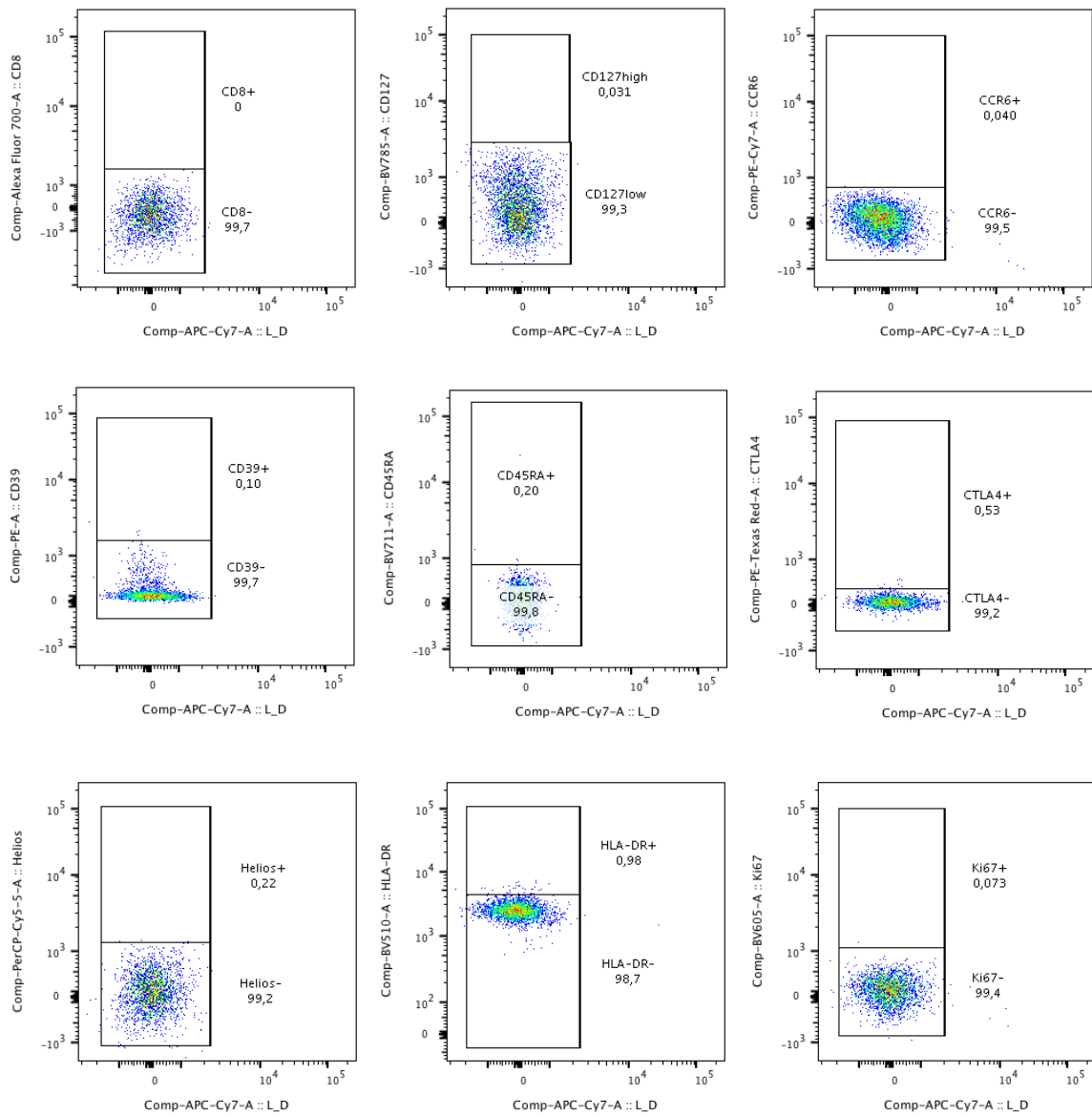


Abbildung 7: Fluorescence Minus One-Kontrolle des Gatings zur phänotypischen Charakterisierung regulatorischer Zellen

Abgebildet sind die jeweiligen FMO Kontrollen der Marker zur phänotypischen Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen nach Gating auf diese Zellpopulation wie in Abbildung 3 verdeutlicht. Die hier verwendeten Gatingbereiche entsprechen den in Abbildung 3 verwendeten Gatingbereichen. Die Abbildung zeigt die Nabelschnurblutprobe desselben Neugeborenen von 39+6 SSW wie in Abbildung 3.

Diskussion

In einer großen Population von für eine BPD besonders gefährdeten Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29+0 Schwangerschaftswochen führten wir eine Untersuchung der relativen Anteile regulatorischer T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im ersten Lebensmonat mittels Durchflusszytometrie durch. Unsere Hypothese lautete, dass sich die regulatorischen T-Zellen bei Kindern, die im weiteren klinischen Verlauf eine BPD entwickeln, im Vorfeld verringert zeigen. Diese Hypothese muss nach Durchführung der Untersuchung abgelehnt werden. Vielmehr zeigte sich, dass die Entwicklung einer BPD bei besonders unreifen Frühgeborenen < 29 SSW mit einem erhöhten Anteil der regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺-T-Lymphozyten im Zeitraum LT 4-10 assoziiert ist. Gleichsam konnte für die restlichen Zeiträume des ersten Lebensmonats eine statistisch signifikante Assoziation nicht nachgewiesen werden. Im Zeitraum 11-17 ergab sich allenfalls ein erhöhter Median des Anteils regulatorischer T-Zellen in der BPD Gruppe, jedoch ohne dass sich der Unterschied statistisch signifikant zeigte.

Die vorliegenden Daten suggerieren eine besondere Konstellation des immunregulatorischen Status der an BPD erkrankten Kinder innerhalb der ersten zwei Lebenswochen und dies lange bevor die Diagnose einer BPD gestellt werden kann. Die Ergebnisse dieser Studie legen außerdem nahe, dass spezifische Faktoren im Zusammenhang mit einer späteren Erkrankung an einer BPD auch auf die Konformation des immunregulatorischen Systems der Frühgeborenen Einfluss nehmen. Da in dieser Untersuchung keine quantitativen Bestimmungen der CD4⁺ T-Lymphozyten vorlagen, kommen als Mechanismus für das Resultat der Untersuchung sowohl eine Verringerung der Anzahl der Nicht-T_{reg} CD4⁺ T-Lymphozyten als auch eine Vermehrung der T_{reg} in Frage. Beide Vorgänge sind prinzipiell im Rahmen von inflammatorischen bzw. septischen Geschehen denkbar.

In einer schwedischen Untersuchung an Frühgeborenen unter 1000 g Geburtsgewicht zeigten diese eine Lymphopenie an LT 14 und 28 im Vergleich zu Reifgeborenen an LT 14 sowie hierbei auch reduzierte relative Anteile von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten an allen Lymphozyten. Die relativen Anteile regulatorischer T-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Lymphozyten zeigten sich hier jedoch jeweils ohne signifikanten Unterschied (Qazi et al., 2020). In einer Untersuchung aus den USA zeigten sich bei von BPD betroffenen Frühgeborenen innerhalb der ersten

beiden Lebenswochen reduzierte absolute Zahlen von CD4⁺ T-Lymphozyten (Ballabh et al., 2003).

Anhand der vorliegenden Daten könnte eine reflektorische Erhöhung der Anteile der regulatorischen T-Zellen als Folge einer Infektion gedeutet werden, wobei die Infektion dann als prädisponierender Faktor zur Entstehung einer BPD beitragen könnte. Die Erhöhung der T_{reg} wäre somit genauso Folge der Infektion wie die sich entwickelnde und später diagnostizierte BPD.

Gleichzeitig ist es genauso denkbar, dass initiale „Hits“ wie mechanische Schädigung des respiratorischen Systems durch Beatmung oder die Sauerstoffgabe eine inflammatorische Reaktion im unreifen Lungengewebe in Gang setzen. Diese spiegelt sich womöglich frühzeitig in quantitativen Veränderungen der CD4⁺ T-Lymphozyten und der T_{reg} wider und erzeugt dann im weiteren Verlauf das klinische Bild einer BPD. Die relative Erhöhung der T_{reg} könnte man in diesem Zusammenhang als Versuch des immunregulatorischen Systems deuten, der inflammatorischen Reaktion Herr zu werden.

Ein weiterer diskussionswürdiger Aspekt ist, dass die quantitativen Veränderungen der regulatorischen T-Zellen bei an BPD erkrankten Kindern eventuell auch die Folge einer reduzierten Funktionalität der Immunregulation sein könnten. Denkbar ist zum Beispiel, dass der generell festzustellende Anstieg des relativen Anteils der T_{reg} an LT 4-10 bei den später an BPD erkrankenden Kindern deshalb stärker ausfällt, weil bei diesen womöglich eine reduzierte immunregulatorische Kompetenz vorliegt. Dies könnte sowohl in einer verminderten immunregulatorischen Funktion der T_{reg} als auch in Defizienzen anderer Teilaspekte des Immunregulation begründet sei. Solche funktionellen Defizite würden auch Erklärungsansätze für die anhaltende entzündliche Reaktion des unreifen Lungengewebes bieten, welche die BPD kennzeichnet.

Im Rahmen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchung war auch unabhängig von der späteren Diagnosestellung einer BPD insgesamt eine Zunahme des relativen Anteils der T_{reg} im Zeitraum Lebenstag 4-10 bei der untersuchten Kohorte festzustellen. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe unter Nutzung des Multicolor-Panels bei Frühgeborenen, dessen Etablierungsprozess in dieser Arbeit beschrieben wird, konnten zeigen, dass dieser relative Anstieg der T_{reg} in diesem Zeitraum mit einem Wechsel zu einem eher inflammatorischen Phänotyp

einhergeht. Es zeigte sich hierbei zum einen ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg des relativen Anteils der T_{reg} im Zeitraum Lebensstag 4-10 im Vergleich zum Zeitraum Lebensstag 1-3. Die T_{reg} hatten zunächst nachgeburtlich einen naiven Phänotyp (Helios⁺, HLA-DR low, Ki67 low, CTLA-4 low). Im Zeitraum Lebensstag 4-10 zeigte sich dann ein passagerer Wechsel zu einem inflammatorischen und aktivierten Phänotyp (Ki67⁺, HLA-DR⁺, CCR6⁺) (Pagel et al., 2020).

Das Auftreten eines inflammatorischen Phänotyps bei regulatorischen T-Zellen ist ein in anderen Zusammenhängen in der Literatur bekanntes Phänomen.

Das mit unserer Arbeitsgruppe kooperierende Labor von Professor Claire Chougnnet des Cincinnati Children's Hospital Medical Center, welches ich im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Rahmen des Graduiertenkollegs International Research Training Group 1911 besuchen durfte, konnte ein Rhesus macaque Modell der Chorioamnionitis etablieren. Hier zeigten sich im Rahmen der pränatalen fetalen Inflammation „inflammatorische“ FoxP3⁺ T_{reg} , die proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-8, IL-17 und IFN γ produzierten und einen inflammatorischen Phänotyp mit Expression von RORc^{high/+} und Helios^{low/-} aufwiesen (Jackson et al., 2017; Rueda et al., 2016). Passend hierzu konnte in Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe in Nabelschnurblutproben von einer Chorioamnionitis betroffenen Frühgeborenen erhöhte Anteile an IL-17⁺ T_{reg} nachgewiesen werden (Rito et al., 2017).

Die Plastizität der T_{reg} mit Entwicklung funktioneller und phänotypischer Unterschiede ist ein zunehmend in den Fokus rückender Aspekt der Physiologie der T_{reg} . Im Wesentlichen zeigen sich hierbei T_{reg} Subtypen, die durch ihre Rezeptorausstattung und Zytokinproduktion entsprechenden bekannten Klassen der T-Helferzellen nahestehen. Gebildet werden sie durch spezifische inflammatorische Umgebungsbedingungen und folgende Aktivierung charakteristischer Transkriptionsfaktoren, die simultan auch die entsprechenden Entwicklungen der CD4⁺ T-Helferzellen steuern (u.a. T-BET für Th1, GATA3 für Th2, ROR γ t für Th17) (Duhon et al., 2012; Sjaastad et al., 2021). Es ist anzunehmen, dass eine parallele Entwicklung der CD4⁺ T-Helferzellen und der entsprechenden T_{reg} der spezialisierten Sicherstellung der adäquaten Immunregulation unter unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen dient (Duhon et al., 2012; Sjaastad et al., 2021).

Die Plastizität von T_{reg} ist zudem eine im Rahmen von Autoimmunerkrankungen bekannte Erscheinung. So zeigten sich die relativen Anteile von IFN γ ⁺ T_{reg} bei

Patienten mit Diabetes mellitus Typ I im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht (McClymont et al., 2011). Gleiches gilt für unbehandelte Patienten mit schubförmiger remittierender Multipler Sklerose. Interessanterweise war die signifikante Erhöhung der relativen Anteile von IFN γ ⁺ T_{reg} bei Patienten mit eingeleiteter Therapie mit IFN β nicht nachweisbar (Dominguez-Villar et al., 2011). Bei Kindern mit atopischem Asthma bronchiale konnte gezeigt werden, dass die T_{reg} vermehrt phänotypische Charakteristika der Th2 Zellen exprimieren, was möglicherweise einer geringeren Inhibition der Th2 Antwort und damit Ausprägung der allergischen Erkrankung Vorschub leistet (Jansen et al., 2022).

Auch im Rahmen der BPD kommt es möglicherweise zu einer dysregulierten Immunantwort durch T_{reg} mit proinflammatorischen Charakteristika. Diese Arbeit zeigte die Erhöhung des relativen Anteils der T_{reg} bei von einer BPD betroffenen Frühgeborenen im Zeitraum Lebensstag 4-10. Im selben Zeitraum bestätigte unsere Arbeitsgruppe die Entwicklung eines inflammatorischen Phänotypes der T_{reg} bei Frühgeborenen (Pagel et al., 2020).

Es ist zu diskutieren, dass die Plastizität der T_{reg} zu einem inflammatorischen Phänotyp bei Entzündungsprozessen das Korrelat physiologischer Mechanismen der Immunregulation sind. Möglicherweise können hierdurch Entzündungsmechanismen graduiert zugelassen werden, indem immunregulatorische Kapazität durch Anpassung der T_{reg} kalibriert eingeschränkt wird. Gegebenenfalls ist es dann genau diese Einschränkung der immunregulatorischen Kapazität, die bei der BPD zur anhaltenden dysregulierten Immunantwort beiträgt. Womöglich schaffen, wie oben diskutiert, initiale „Hits“ wie Beatmung oder die Sauerstoffgabe ein entsprechendes inflammatorisches Milieu im Lungengewebe der an BPD erkrankenden Kinder, was die Plastizität der regulatorischen T-Zellen auslöst. Eine systemische Infektion käme ebenso in Frage. Eventuell besteht auch unabhängig von den genannten auslösenden Faktoren bei den im Verlauf eine BPD entwickelnden Kindern eine Neigung in Richtung eines inflammatorischen Phänotyps der T_{reg}.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene quantitative Aspekt der Erhöhung des relativen Anteils der T_{reg} an den CD4⁺ T-Lymphozyten würde bei inflammatorischem Phänotyp der T_{reg}, die Entzündungsreaktion der BPD zusätzlich unterstützen.

Aufgrund der oben genannten Aspekte sollte die künftige Erforschung der Rolle der regulatorischen T-Zellen für die Entwicklung der BPD deshalb auch ihre Plastizität in den Blick nehmen. Insbesondere weitere Untersuchungen hinsichtlich der

Frage, welche spezifischen Faktoren und Zeiträume bei der Plastizität der T_{reg} beim Frühgeborenen mit und ohne BPD entscheidend sind, erscheinen sinnvoll. Unabhängig von der Plastizität der T_{reg} ist es auch denkbar, dass funktionelle Einschränkungen dieser Zellpopulation eventuell genetisch determiniert sind und somit ein anlagebedingter Aspekt einer Prädisposition für die Entwicklung der BPD besteht. Genomweite Assoziationsstudien zur Rolle genetischer Faktoren im Zusammenhang mit Funktion der T_{reg} und der Entwicklung einer BPD könnten hier weitere Hinweise ergeben.

Aus der nachgewiesenen Assoziation der Erhöhung des relativen Anteils der regulatorischen T-Zellen an den $CD4^+$ -T-Lymphozyten im Zeitraum LT 4-10 ergeben sich möglicherweise Ansatzpunkte für die Früherkennung der Erkrankung.

Bereits publizierte Modelle zur Prädiktion einer BPD nutzen klinische und laborchemische Parameter als Faktoren zur Risikoberechnung, wobei inflammatorische und immunologische Aspekte bisher eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Eine Review-Studie unterzog 26 solcher Prädiktionsmodelle einer externen Validierung. Hierbei erreichten nur 3 Modelle unter Zuhilfenahme multipler Imputation einen AUC-Wert von über 0,7, aber keines von über 0,8. Die untersuchten Prädiktionsmodelle nutzen vor allem klinische Parameter wie z.B. Gestationsalter, Geburtsgewicht, den Apgar-Score etc., sowie Parameter der Beatmungstherapie zur Risikoabschätzung. Nur wenige Modelle bezogen Laborparameter mit ein und diese bildeten dann überwiegend Aspekte der Blutgasanalyse ab. Drei Prädiktionsmodelle nutzen mit der Pneumonie sowie ein Modell mit der Sepsis Einflussfaktoren, die inflammatorische Phänomene abbilden (Onland et al., 2013).

Das National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Neonatal Research Network hat einen online verfügbaren Rechner zur Risikoabschätzung veröffentlicht. Dieser bezieht 6 Variablen zur Risikoberechnung ein: Gestationsalter, Geburtsgewicht, Ethnie, Geschlecht, Art der Atemunterstützung und FiO_2 . Ein Inflammation abbildender Parameter ist somit ebenfalls nicht enthalten. Das Prädiktionsmodell wurde anhand einer Kohorte von 3636 VLBW-Frühgeborenen zwischen 23 bis 30 SSW und 401 g -1250 g Geburtsgewicht erstellt. Es erreichte in der Studie einen AUC-Wert von 0,793 an Lebenstag 1, der sich bis zum Lebenstag 28 kontinuierlich auf einen Wert von 0,854 steigerte (Laughon et al., 2011).

Eine Multicenter Studie des Neocosur Neonatal Network aus Südamerika unter Einschluss von 16407 VLBW-Frühgeborenen entwickelte Risikoprädiktionsmodelle für die BPD an den Zeitpunkten Geburt sowie Lebenstag 3,7 und 14. Die AUC-Werte betragen für den Endpunkt moderate oder schwere BPD 0,788, 0,818, 0,827 und 0,894. Die inflammatorischen Phänomene EOS und LOS zeigten zwar in dieser Untersuchung eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten einer moderaten oder schweren BPD. Allerdings trugen sie nicht signifikant zur prädiktiven Aussagekraft der entwickelten Modelle bei, sodass sie wie auch andere inflammatorische Aspekte hinsichtlich Klinik und Labor nicht in diesen berücksichtigt wurden (Valenzuela-Stutman et al., 2019). Unter Einschluss von 4600 VLBW-Frühgeborenen des Korean Neonatal Network entwickelte BPD Risikoprädiktionsmodelle zum Zeitpunkt der ersten Lebensstunde ergaben einen AUC-Wert von 0,908 für die moderate BPD und 0,815 für die schwere BPD. Auch hier trugen Aspekte der Infektion und Inflammation nicht entscheidend zur Risikoprädiktion bei (Shim et al., 2021).

Die Messung des relativen Anteils der regulatorischen T-Zellen und gegebenenfalls auch deren phänotypische Charakterisierung in der BPD-Risikopopulation könnte womöglich ein zusätzlicher Baustein zur Risikoabschätzung in einem umfassenderen Prädiktionsmodell sein. Ein geeigneter Zeitpunkt zur diesbezüglichen Untersuchung der regulatorischen T-Zellen zum Zwecke der Risikoabschätzung der BPD ist hierbei möglicherweise der Zeitraum Lebenstag 4-10, in dem in dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung der relativen Anteile der regulatorischen T-Zellen im Blut der später an einer BPD erkrankten Frühgeborenen nachgewiesen wurde. Weitere prospektive Studien zum prädiktiven Wert der Untersuchung der regulatorischen T-Zellen zur Risikoabschätzung der BPD sind hierfür notwendig.

Vorausgesetzt der pathogenetische Zusammenhang zwischen Zunahme des Anteils des relativen Anteils der T_{reg} an $CD4^+$ T-Lymphozyten im Zeitraum Lebenstag 4-10 und gegebenenfalls auch ihrer Plastizität mit der Entstehung der BPD ließe sich zukünftig sicher herstellen, so ergäben sich hierbei auch Perspektiven für die therapeutische Prävention der Erkrankung. Nach Identifikation eines Risikopatienten könnte gegebenenfalls eine prophylaktische antiinflammatorische medikamentöse Therapie in den ersten Lebenswochen durchgeführt und ihre Wirksamkeit in der Prävention der BPD untersucht werden.

Zudem gibt es inzwischen in der Transplantationsmedizin sowie in der Therapie autoimmuner Erkrankungen wie dem Morbus Crohn und Diabetes mellitus Typ I Ansätze der Induktion von immunologischer Toleranz durch Gabe von spezifisch wirkenden regulatorischen T-Zellen an betroffene Patienten (Giganti et al., 2021; Romano et al., 2019). Auch die gentechnische Modifikation der T_{reg} vor Anwendung wird diskutiert und erforscht (Amini et al., 2021; Fritsche et al., 2020). Obgleich diese Therapien noch weit von der Routineanwendung entfernt sind, wäre eine Gabe von regulatorischen T-Zellen an BPD Risikopopulationen bei unreifen Frühgeborenen denkbar, zum Beispiel um die Plastizität der T_{reg} zu einem inflammatorischen Phänotyp oder ein sonstiges funktionelles Defizit der T_{reg} auszugleichen und folglich den inflammatorischen Prozess, der zur BPD führt, einzudämmen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung weist Limitationen hinsichtlich untersuchter Kohorte, Versuchsdurchführung und -auswertung sowie Aussagekraft der Daten auf. So handelte es sich um eine unizentrische Untersuchung, die per definitionem hinsichtlich der Repräsentativität einer Multizentrumsuntersuchung unterlegen ist.

Die per Durchflusszytometrie aufgezeichneten relativen Anteile regulatorischer T-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Lymphozyten bei unreifen Frühgeborenen unter 29 SSW lagen in ähnlicher Höhe zu denen von einer anderen Arbeitsgruppe erhobenen Daten einer vergleichbaren Kohorte, sodass hier von einer korrekten Bestimmung ausgegangen werden kann (Huenecke et al., 2016).

Obgleich die untersuchte Population in vielen Aspekten wie z.B. auch der BPD-Prävalenz vergleichbare Kenndaten zu anderen internationalen Studienpopulationen zeigte, so waren doch der Anteil männlicher Frühgeborener und SGA Frühgeborener im Vergleich etwas erhöht (Keller et al., 2017; Lin et al., 2015; Marques et al., 2019; Poindexter et al., 2015; Shah et al., 2012; Stoll et al., 2015).

Zugleich ist aber auch ein möglicher Selektionsbias dieser Studie, dass insbesondere die Kinder mit besonders hohem Morbiditätsrisiko nicht in die Studie eingeschlossen wurden. Des Weiteren wurde bei den Kindern, die im klinischen Verlauf eine schwere Komplikation entwickelten, teilweise aus Gründen der Patientensicherheit auf zusätzliche Blutasservierungen für Forschungszwecke verzichtet.

Die genannten Punkte schränken insgesamt die Repräsentativität der erhobenen Daten ein.

Auch stellt sich grundsätzlich die Frage, inwieweit die Bestimmung des systemischen Parameters des relativen Anteils der T_{reg} an den $CD4^+$ T-Lymphozyten im Vollblut geeignet ist, Aussagekraft über die lokalisiert im Lungengewebe der Frühgeborenen ablaufende Erkrankung BPD zu entfalten. Unter der Grundprämisse, dass systemische Abweichungen in der Verfassung des immunregulatorischen Systems inklusive der T_{reg} hier eine Rolle spielen, mag dies sinnvoll erscheinen. Gleichwohl ist es auch denkbar, dass die Verhältnisse im Vollblut nicht die lokalisiert am Ort der Erkrankung vorherrschende Situation immunregulatorischer Prozesse widerspiegeln bzw. mit diesen nur eingeschränkt in Zusammenhang stehen. Nichtsdestotrotz stellt die Untersuchung der eher niedrighschwellig im Rahmen von Routineblutentnahmen aus klinischer Indikation gewinnbaren Vollblutproben bei unreifen Frühgeborenen zur Untersuchung immunregulatorischer Zellen im Kontext der Pathogenese der BPD einen logischen und sinnvollen Schritt dar.

Die Wahl der Betrachtungszeiträume innerhalb des ersten Lebensmonates stellt einen näherungsweisen Versuch dar, den Zeitverlauf der relativen Anteile der T_{reg} an den $CD4^+$ Lymphozyten zu erfassen. Die in dieser Untersuchung gewählte eher breite Spannweite der Betrachtungszeiträume von 7 Tagen ermöglichte die Abbildung und Zusammenfassung von Daten möglichst vieler Frühgeborener in entsprechenden Betrachtungszeiträumen. Gleichwohl stellt sie eine Limitation der Versuchsauswertung dar, da die Vergleichbarkeit der relativen Anteile der T_{reg} innerhalb der 7 Tage Betrachtungszeitraum unklar ist. Weitere Untersuchung sollten eine zeitlich genauere Auftrennung des Verlaufs der relativen Anteile der T_{reg} anstreben.

Es ist zudem zu berücksichtigen, dass die in der hier vorliegenden Arbeit Messung des relativen Anteils der T_{reg} an den $CD4^+$ T-Lymphozyten im Vollblut keine Aussage über deren Funktionalität zulässt. Es gibt Hinweise, dass T_{reg} Frühgeborener im Vergleich zu Reifgeborenen eine reduzierte suppressive Wirksamkeit auf konventionelle T-Zellen zeigen – ein Effekt der sich nochmal verstärkt, wenn die Frühgeborenen im Mutterleib einer Chorioamnionitis ausgesetzt waren (Rueda et al., 2015). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe liefern konträre Ergebnisse, die eine höhere suppressive Wirkung der T_{reg} Frühgeborener nahelegen (Pagel et al., 2020).

Des Weiteren kann die dieser Arbeit zugrunde liegende Untersuchung keine Aussage darüber treffen, wie sich die hier gemessenen T_{reg} in aus dem Thymus abgeleitete T_{reg} -Zellen (tT_{reg}) und in der Peripherie aus naiven $CD4^+$ -T-Zellen gebildete T_{reg} -Zellen (pT_{reg}) aufteilen. Eine Unterscheidung dieser Zellpopulationen ist unter anderem über den Oberflächenmarker CD31 möglich. Daten aus einer Nabelschnurblutuntersuchung zeigen eine Tendenz zu höheren Anteilen von pT_{reg} ($CD31^-$) an der Gesamtheit der T_{reg} im Rahmen von Frühgeburtlichkeit und Inflammation (Luciano et al., 2014).

Die korrekte und zielführende Definition der BPD ist Gegenstand einer andauernden wissenschaftlichen Diskussion. Für die hier vorliegende Arbeit wurde die zurzeit gängige Definition der BPD, die aus der NIH-Konsensus Konferenz im Jahre 2001 hervorgegangen ist (A. H. Jobe und Bancalari, 2001), verwendet. Die prognostische Aussagekraft dieser Definition einer BPD für die pulmonale Morbidität nach Entlassung scheint jedoch fraglich (Cazzato et al., 2013; Keller et al., 2017). Probleme in der Klassifikation stationär betreuter Frühgeborener entstehen unter anderem auch durch die Notwendigkeit der exakten Bestimmung des FiO_2 -Wertes, was bei modernen und nicht invasiven Atemunterstützungssystemen nur schwerlich möglich ist. Zugleich ist unklar wie Kinder zu klassifizieren sind, die eine unterstützende High Flow Atemhilfe erhalten (Maitre et al., 2015; Sahni und Bhandari, 2020). Des Weiteren können Kinder nicht klassifiziert werden, die bereits vor dem Alter von 36 Wochen PMA, womöglich auch an einer sehr schweren BPD, versterben (Sahni und Bhandari, 2020; Thébaud et al., 2019).

Die weitere grundlagenwissenschaftliche und klinische Erforschung der BPD wird auch dadurch gehemmt, dass viele Studien unterschiedliche Definitionen der BPD zugrunde legen, was die Vergleichbarkeit einschränkt (Beam et al., 2014). Zudem werden behandelte Frühgeborene auch in relevantem Maß hinsichtlich einer BPD falsch klassifiziert (van Rossem et al., 2015).

Die NIH-Konsensus Definition wird deshalb diskutiert und es existieren inzwischen auch andere Ansätze (Jensen et al., 2019). Es ist jedoch auch hier fraglich, inwieweit diese Definitionen die spätere Morbidität der Patienten widerspiegeln (Poindexter et al., 2015). 2018 wurde eine novellierte Definition des National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) des NIH publiziert (Higgins et al.,

2018). Weitere Untersuchungen zur prognostischen Aussagekraft dieses Definitionsansatzes bleiben abzuwarten.

Als zusätzliche Limitation der hier vorgelegten Untersuchung ist zu erwähnen, dass keine Auswertung der Daten nach unterschiedlichen Schweregraden der BPD erfolgte und somit auch keine Aussagen über deren Einfluss auf die nachgewiesene Assoziation mit den relativen Anteilen der T_{reg} möglich sind.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen zur Rolle regulatorischer T-Zellen im Rahmen der Entstehung der BPD bei Frühgeborenen. So könnte eine quantitative Bestimmung der Gesamtzahl der $CD4^+$ T-Lymphozyten Aufschlüsse darüber geben inwieweit der gemessene höhere Anteil der regulatorischen T-Zellen im Zeitraum Lebenstag 4-10 von Frühgeborenen, die später eine BPD entwickeln, einen quantitativen Anstieg ebendieser oder eine Reduzierung der $CD4^+$ T-Lymphozyten widerspiegelt. Des Weiteren erscheinen weitere Untersuchungen sinnvoll, ob weitere auf das Frühgeborene in den ersten Lebenstagen einwirkende Faktoren gleichsam geeignet sind die beschriebene Erhöhung des relativen Anteils an regulatorischen T-Zellen und gegebenenfalls auch ihre Plastizität zu induzieren. Besonders zu erwähnen in diesem Kontext sind invasive Maßnahmen wie maschinelle Beatmung, hohe Druckniveaus im Rahmen der Beatmung, hohe Anteile von Sauerstoff in der Einatemluft, Anlage von Zugängen und Weiteres.

Neben quantitativen Untersuchungen sind auch weitere Forschungsvorhaben zu Aspekten des Phänotyps und der Plastizität sowie der Funktionalität der T_{reg} notwendig, um die Rolle der regulatorischen T-Zellen im Kontext der Entstehung einer BPD beim Frühgeborenen weiter zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde die Etablierung des Multicolor-Panels zur Phänotypisierung regulatorischer T-Zellen unter Nutzung kleinster Vollblutmengen, wie sie bei Frühgeborenen zur Verfügung stehen, im Rahmen dieses Promotionsprojektes vorangetrieben. Die aufgestellte Hypothese, dass die phänotypische Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen durch ein solches Panel möglich ist, konnte bestätigt werden. Hierbei konnte eine Probenverarbeitung und technische Auswertungsstrategie mittels Durchflusszytometrie ausgearbeitet werden, die in reproduzierbarer Weise

Daten nicht nur zum relativen Anteil der T_{reg} an den $CD4^+$ T-Lymphozyten, sondern auch zu zahlreichen Charakterisierungs- und Funktionsmarkern lieferte. Insofern wurde die aus einer Vollblutprobe gewonnene Datenmenge deutlich erhöht. Hierbei zeigten sich sowohl der Anteil der T_{reg} an den $CD4^+$ T-Lymphozyten wie auch die Marker CD39, CD45RA, HLA-DR im jeweils aus vorherigen Publikationen mit Untersuchung von Proben Früh- und Reifgeborener im zu erwartenden Bereich (Luciano et al., 2014; Ly et al., 2009; Pagel et al., 2016; Zahran et al., 2019). Vergleichbare Untersuchungen zu dieser Altersgruppe in Bezug auf die Marker CTLA-4, Helios, Ki67 und CCR6 konnten in der Literaturrecherche nicht identifiziert werden.

Das etablierte Antikörperpanel eröffnet auch Möglichkeiten im Rahmen weiterer Forschungsvorhaben die Rolle von T_{reg} im Rahmen weiterer Erkrankungen oder immunologischer Phänomene beim Frühgeborenen zu beleuchten.

Gleichwohl zeigen sich hier auch Limitationen. Es handelt es sich um eine zeit-, kosten- und ressourcenintensive Versuchsanordnung, vor allem bei Betrachtung von longitudinalen Verläufen der Anteile regulatorische T-Zellen an verschiedenen Zeitpunkten bei verschiedenen Individuen. Zugleich sind jeweils viele einzelne Versuchsschritte mit vielen Pipettier- und Dekantiervorgängen notwendig, was Fehler in der Versuchsdurchführung begünstigt. Unter anderem kann ein größerer Verlust zu untersuchender Zellen auftreten. In unseren Versuchsdurchführungen konnten regelhaft je Probe nach Verarbeitung über 10^6 Zellen untersucht werden. Vereinzelt betrug die Zellzahl in unseren Untersuchungen bis minimal ca. $0,6 \times 10^6$ Zellen, was jedoch weiter eine suffiziente Versuchsauswertung ermöglichte. Außerdem bergen der Einsatz vieler Antikörper mit den entsprechenden Fluorochromen Schwierigkeiten in der Erstellung einer Kompensationsmatrix am Durchflusszytometer, die regelmäßig auf ihre Passgenauigkeit überprüft werden muss. Zudem ergeben sich bei einer komplexeren Kompensationsmatrix bei Verwendung einer Vielzahl von Fluorochromen größere Risiken durch Unter- bzw. Überkompensation eine Verfälschung von relevanten Messparametern hervorzurufen.

Des Weiteren sind mit dem Antikörperpanel weiterhin nur Aussagen zum relativen Anteil der T_{reg} an den $CD4^+$ T-Lymphozyten möglich. Eine absolute quantitative Bestimmung ist nicht möglich.

Weitere Studien zu Zusammenhängen des immunregulatorischen Systems mit der Entstehung der BPD sollten ggf. auch weitere immunregulatorische Zellpopulationen in den Blick nehmen. Zu nennen sind hier beispielsweise wie die CD71⁺ erythroiden Vorläuferzellen und die myeloiden Suppressorzellen (MDSC).

Die CD71⁺ erythroiden Vorläuferzellen verwirklichen ihre immunsupprimierende Wirkung durch die Produktion des Enzyms Arginase-2. Sie scheinen bei Neugeborenen wichtige immunsupprimierende Akteure zu sein, die einerseits zu deren Empfänglichkeit für Infektionen beitragen, andererseits aber auch die bedeutsame Toleranz für kommensale Mikroorganismen in bestimmten Entwicklungsphasen vermitteln könnten (Elahi et al., 2013). Des Weiteren kommt den CD71⁺ erythroiden Vorläuferzellen, wie auch den T_{reg}, eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz in der Schwangerschaft zu (Delyea et al., 2018). Im Nabelschnurblut Frühgeborener zeigt sich im Vergleich zu Reifgeborenen ein deutlich erhöhter Anteil der CD71⁺ Zellen an den CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen (Podestà et al., 2015).

Die Anteile neutrophiler granulozytärer myeloider Suppressorzellen zeigen sich im Nabelschnurblut Früh- und Reifgeborener im Vergleich zum peripheren Blut von Kindern und Erwachsenen signifikant erhöht (Rieber et al., 2013; Schwarz et al., 2018). Sie sind auch noch im den ersten Lebensmonat im peripheren Blut in höheren Anteilen vorhanden (Gervassi et al., 2014; Schwarz et al., 2018) und wirken suppressiv auf die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen sowie auf die Funktion von natürlichen Killerzellen (Gervassi et al., 2014; Rieber et al., 2013). Granulozytäre myeloide Suppressorzellen zeigen sich zudem im peripheren Blut von Müttern während der Schwangerschaft erhöht, was ebenfalls eine Funktion dieser Zellpopulation im Rahmen der Sicherstellung der immunologischen fetomaternalen Toleranz nahelegt (Köstlin et al., 2014). Zugleich konnte gezeigt werden, dass sich die Anteile der granulozytären myeloiden Suppressorzellen bei Kindern mit Amnioninfektionssyndrom im Rahmen der Schwangerschaft und bei postnataler Sepsis erhöht zeigen. Zudem ist in diesen Fällen auch eine positive Korrelation mit dem CRP-Wert sowie der Leukozytenzahl im Blut nachweisbar (Schwarz et al., 2018).

Zusammenfassung

Bei der bronchopulmonalen Dysplasie handelt es sich um eine chronische pulmonale Erkrankung, die wesentlich zur Morbidität und Mortalität besonders unreifer Frühgeborener beiträgt. Obgleich verschiedene der Erkrankung zugehörige Risikofaktoren bekannt sind, ist ihre genaue Ätiologie ungeklärt. Einen wesentlichen Aspekt der Erkrankung stellt eine inflammatorische Reaktion in dem unreifen Lungengewebe als Ausdruck einer dysbalancierten Immunantwort dar. Wichtiger Bestandteil des immunregulatorischen Systems sind die immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen, welche bei Frühgeborenen in hohen Anteilen vorkommen.

Vor diesem Hintergrund wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

Hypothese 1: Frühgeborene, die im Verlauf eine bronchopulmonale Dysplasie entwickeln, weisen in den ersten Lebensstagen niedrigere relative Anteile regulatorischer T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺-T-Lymphozyten auf.

Hypothese 2: Unter Nutzung eines Durchflusszytometrie Multicolor-Panels ist bei Verwendung sehr geringer Mengen Vollbluts unreifer Frühgeborener eine phänotypische Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen möglich.

Es wurde eine Untersuchung der relativen Anteile regulatorischer T-Zellen im ersten Lebensmonat mittels Durchflusszytometrie bei 114 von für eine bronchopulmonale Dysplasie besonders gefährdeten Frühgeborenen mit einem Gestationsalter < 29+0 Schwangerschaftswochen durchgeführt. Bei den im Verlauf von einer bronchopulmonalen Dysplasie betroffenen Patienten konnte entgegen der Hypothese 1 ein signifikant erhöhter Anteil der regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺-T-Lymphozyten im Zeitraum Lebenstag 4-10 nachgewiesen werden. Diese Daten legen eine besondere Konstellation des immunregulatorischen Systems der im Verlauf an einer bronchopulmonalen Dysplasie erkrankenden Kinder innerhalb der ersten zwei Lebenswochen nahe. Es ist zu diskutieren, dass es hier gegebenenfalls neben der Erhöhung der Anteile auch zu einer funktionellen und phänotypischen Anpassung der regulatorischen T-Zellen im Rahmen ihrer Plastizität kommt. Um dies weiter untersuchen zu können, wurde eine Probenverarbeitung und technische Auswertung etabliert, die neben dem relativen Anteil der regulatorischen T-Zellen an den CD4⁺ T-Lymphozyten auch mehrere und unter anderen inflammatorische Charakterisierungs- und Funktionsmarker bestimmt (CD4, CD8, CD25, CD39, CD45RA, CD127, CTLA-4, HLA-DR, Ki67, FoxP3, CCR6, Helios, Vitalitätsprüfung). Hypothese 2 konnte somit bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

- Abman, S. H., Bancalari, E., und Jobe, A. (2017). The Evolution of Bronchopulmonary Dysplasia after 50 Years. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(4), 421–424.
- Adams, M., Bassler, D., Bucher, H. U., Roth-Kleiner, M., Berger, T. M., Braun, J., Puhon, M. A., Edwards, E., Soll, R., Von Wyl, V., und Network, for the S. N. N. and the V. O. (2018). Variability of Very Low Birth Weight Infant Outcome and Practice in Swiss and US Neonatal Units. *Pediatrics*, 141(5).
- Al-Jebawi, Y., Agarwal, N., Groh Wargo, S., Shekhawat, P., und Mhanna, M. J. (2020). Low caloric intake and high fluid intake during the first week of life are associated with the severity of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 13(2), 207–214.
- Amini, L., Greig, J., Schmueck-Henneresse, M., Volk, H.-D., Bézie, S., Reinke, P., Guillonnet, C., Wagner, D. L., und Anegon, I. (2021). Super-Treg: Toward a New Era of Adoptive Treg Therapy Enabled by Genetic Modifications. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S. E., Perroni, L., Dagna-Briccarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., Azzari, C., Ziegler, S. F., Levings, M. K., und Roncarolo, M. G. (2006, Juni 1). *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. American Society for Clinical Investigation.
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., und Hafler, D. A. (2006). MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 176(8), 4622–4631.
- Baier, R. J., Majid, A., Parupia, H., Loggins, J., und Kruger, T. E. (2004). CC chemokine concentrations increase in respiratory distress syndrome and correlate with development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonology*, 37(2), 137–148.
- Ballabh, P., Simm, M., Kumari, J., Krauss, A. N., Jain, A., Auld, P. A. M., und Cunningham-Rundles, S. (2003). Lymphocyte subpopulations in bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Perinatology*, 20(8), 465–475.
- Ballard, A. R., Mallett, L. H., Pruszyński, J. E., und Cantey, J. B. (2016). Chorioamnionitis and subsequent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth weight infants: A 25-year cohort. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 36(12), 1045–1048.
- Baraldi, E., und Filippone, M. (2007). Chronic Lung Disease after Premature Birth. *New*

England Journal of Medicine, 357(19), 1946–1955.

- Basha, S., Surendran, N., und Pichichero, M. (2014). Immune Responses in Neonates. *Expert review of clinical immunology*, 10(9), 1171–1184.
- Beam, K. S., Aliaga, S., Ahlfeld, S. K., Cohen-Wolkowicz, M., Smith, P. B., und Laughon, M. M. (2014). A systematic review of randomized controlled trials for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in infants. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 34(9), 705–710.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., und Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27(1), Article 1.
- Berger, R., Abele, H., Bahlmann, F., Bedei, I., Doubek, K., Felderhoff-Müser, U., Fluhr, H., Garnier, Y., Grylka-Baesclin, S., Helmer, H., Herting, E., Hoopmann, M., Hösli, I., Hoyme, U., Jendreizeck, A., Krentel, H., Kuon, R., Lütje, W., Mader, S., ... Surbek, D. (2019). Prevention and Therapy of Preterm Birth. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k Level, AWMF Registry Number 015/025, February 2019) – Part 1 with Recommendations on the Epidemiology, Etiology, Prediction, Primary and Secondary Prevention of Preterm Birth. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 79(08), 800–812.
- Bhandari, V., Bizzarro, M. J., Shetty, A., Zhong, X., Page, G. P., Zhang, H., Ment, L. R., Gruen, J. R., und Neonatal Genetics Study Group. (2006). Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics*, 117(6), 1901–1906.
- Bose, C., Van Marter, L. J., Laughon, M., O’Shea, T. M., Allred, E. N., Karna, P., Ehrenkranz, R. A., Boggess, K., und Leviton, A. (2009). Fetal growth restriction and risk of chronic lung disease among infants born before the 28th week of gestation. *Pediatrics*, 124(3), e450–e458.
- Broström, E. B., Thunqvist, P., Adenfelt, G., Borling, E., und Katz-Salamon, M. (2010). Obstructive lung disease in children with mild to severe BPD. *Respiratory Medicine*, 104(3), 362–370.
- Bry, K., Whitsett, J. A., und Lappalainen, U. (2007). IL-1beta disrupts postnatal lung morphogenesis in the mouse. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(1), 32–42.
- Carbone, F., Crotty, S., Heath, B., Jenkins, M, Rudensky, A., Sakaguchi, S. (2018). Das Priming von naiven T-Zellen durch dendritische Zellen, die von Krankheitserregern

- aktiviert wurden. In: Murphy, K. M. und Weaver, C. (Herausgeber): *Janeway Immunologie*. 9. Aufl., 471-489, Springer Spektrum, Berlin
- Cazzato, S., Ridolfi, L., Bernardi, F., Faldella, G., und Bertelli, L. (2013). Lung function outcome at school age in very low birth weight children. *Pediatric Pulmonology*, 48(8), 830–837.
- Chaw, P. S., Hua, L., Cunningham, S., Campbell, H., Mikolajczyk, R., Nair, H., und RESCEU Investigators. (2020). Respiratory Syncytial Virus-Associated Acute Lower Respiratory Infections in Children With Bronchopulmonary Dysplasia: Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 222 (7), 620–627.
- Cheong, J., und Doyle, L. (2018). An Update on Pulmonary and Neurodevelopmental Outcomes of Bronchopulmonary Dysplasia. *Seminars in Perinatology*, 42.
- Choi, C. W., Kim, B. I., Kim, H.-S., Park, J. D., Choi, J.-H., und Son, D. W. (2006). Increase of interleukin-6 in tracheal aspirate at birth: A predictor of subsequent bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Acta Paediatrica*, 95(1), 38–43.
- Christou, H., und Brodsky, D. (2005). Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *Journal of Intensive Care Medicine*, 20(2), 76–87.
- Collins, A., Weitkamp, J.-H., und Wynn, J. L. (2018). Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 103(4), F391–F394.
- Contreras, M., Hariharan, N., Lewandoski, J. R., Ciesielski, W., Kosciak, R., und Zimmerman, J. J. (1996). Bronchoalveolar oxyradical inflammatory elements herald bronchopulmonary dysplasia. *Critical Care Medicine*, 24(1), 29–37.
- Correa-Rocha, R., Pérez, A., Lorente, R., Ferrando-Martínez, S., Leal, M., Gurbindo, D., und Muñoz-Fernández, M. Á. (2012). Preterm neonates show marked leukopenia and lymphopenia that are associated with increased regulatory T-cell values and diminished IL-7. *Pediatric Research*, 71(5), 590–597.
- Costeloe, K. L., Hennessy, E. M., Haider, S., Stacey, F., Marlow, N., und Draper, E. S. (2012). Short term outcomes after extreme preterm birth in England: Comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 345, e7976.
- Cristea, A. I., Carroll, A. E., Davis, S. D., Swigonski, N. L., und Ackerman, V. L. (2013). Outcomes of Children With Severe Bronchopulmonary Dysplasia Who Were Ventilator Dependent at Home. *Pediatrics*, 132(3), e727–e734.
- D'Angio, C. T., Basavegowda, K., Avissar, N. E., Finkelstein, J. N., und Sinkin, R. A. (2002). Comparison of Tracheal Aspirate and Bronchoalveolar Lavage Specimens

from Premature Infants. *Neonatology*, 82(3), 145–149.

- Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., und Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1257–1265.
- Delyea, C., Bozorgmehr, N., Koleva, P., Dunsmore, G., Shahbaz, S., Huang, V., und Elahi, S. (2018). CD71+ Erythroid Suppressor Cells Promote Fetomaternal Tolerance through Arginase-2 and PDL-1. *The Journal of Immunology*, 200(12), 4044–4058.
- Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M., und Hafler, D. A. (2011). Identification of T helper type 1–like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nature Medicine*, 17(6), 673–675.
- Dowling, D. J., und Levy, O. (2014). Ontogeny of early life immunity. *Trends in Immunology*, 35(7), 299–310.
- Duhen, T., Duhen, R., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., und Campbell, D. J. (2012). Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*, 119(19), 4430–4440.
- Dzwonek, A. B., Neth, O. W., Thiébaud, R., Gulczynska, E., Chilton, M., Hellwig, T., Bajaj-Elliott, M., Hawdon, J., und Klein, N. J. (2008). The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatric Research*, 63(6), 680–685.
- Elahi, S., Ertelt, J. M., Kinder, J. M., Jiang, T. T., Zhang, X., Xin, L., Chaturvedi, V., Strong, B. S., Qualls, J. E., Steinbrecher, K. A., Kalfa, T. A., Shaaban, A. F., und Way, S. S. (2013). Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*, 504(7478), 158–162.
- Farber, D. L., Yudanin, N. A., und Restifo, N. P. (2014). Human memory T cells: Generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 24–35.
- Field, D. J., Dorling, J. S., Manktelow, B. N., und Draper, E. S. (2008). Survival of extremely premature babies in a geographically defined population: Prospective cohort study of 1994-9 compared with 2000-5. *BMJ*, 336(7655), 1221–1223.
- Fischer, H. S., und Bühner, C. (2013). Avoiding Endotracheal Ventilation to Prevent Bronchopulmonary Dysplasia: A Meta-analysis. *Pediatrics*, 132(5), e1351.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., und Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(4),

Article 4.

- Fritsche, E., Volk, H.-D., Reinke, P., und Abou-El-Enein, M. (2020). Toward an Optimized Process for Clinical Manufacturing of CAR-Treg Cell Therapy. *Trends in Biotechnology*, 38(10), 1099–1112.
- Galambos, C., Sims-Lucas, S., und Abman, S. H. (2013). Histologic Evidence of Intrapulmonary Anastomoses by Three-Dimensional Reconstruction in Severe Bronchopulmonary Dysplasia. *Annals of the American Thoracic Society*, 10(5), 474–481.
- Gervassi, A., Lejarcegui, N., Dross, S., Jacobson, A., Itaya, G., Kidzeru, E., Gantt, S., Japan, H., und Horton, H. (2014). Myeloid Derived Suppressor Cells Are Present at High Frequency in Neonates and Suppress In Vitro T Cell Responses. *PLOS ONE*, 9(9), e107816.
- Giganti, G., Atif, M., Mohseni, Y., Mastronicola, D., Grageda, N., Povoleri, G. A., Miyara, M., und Scottà, C. (2021). Treg cell therapy: How cell heterogeneity can make the difference. *European Journal of Immunology*, 51(1), 39–55.
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., und Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet (London, England)*, 371(9606), 75–84.
- Gortner, L., Gortner, L., Misselwitz, B., Milligan, D., Zeitlin, J., Kollée, L., Boerch, K., Agostino, R., Reempts, P. V., Chabernaude, J.-L., Bréart, G., Papiernik, E., Jarreau, P.-H., Carrapato, M., Gadzinowski, J., Draper, E., und Group, for the members of the M. R. (2011). Rates of Bronchopulmonary Dysplasia in Very Preterm Neonates in Europe: Results from the MOSAIC Cohort. *Neonatology*, 99(2), 112–117.
- Gu, J., Ni, X., Pan, X., Lu, H., Lu, Y., Zhao, J., Guo Zheng, S., Hippen, K. L., Wang, X., und Lu, L. (2017). Human CD39^{hi} regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. *Cellular and Molecular Immunology*, 14(6), Article 6.
- Guilmot, A., Hermann, E., Braud, V. M., Carlier, Y., und Truyens, C. (2011). Natural Killer Cell Responses to Infections in Early Life. *Journal of Innate Immunity*, 3(3), 280–288.
- Gulbins, E. und Lang, K. S. (2019) *Immunsystem*. In: Brandes, K. S., Lang, F., und Schmidt, R. F. (Herausgeber): *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. 32. Aufl., 312-323, Springer, Berlin
- Hair, A. B., Peluso, A. M., Hawthorne, K. M., Perez, J., Smith, D. P., Khan, J. Y., O'Donnell, A., Powers, R. J., Lee, M. L., und Abrams, S. A. (2016). Beyond Necrotizing Enterocolitis Prevention: Improving Outcomes with an Exclusive Human Milk-Based Diet. *Breastfeeding Medicine*, 11(2), 70–74.

- Härtel, C., Gille, C., und Orlikowsky, T. W. (2014). Kolonisation oder Infektion bei Früh- und Neugeborenen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 162(5), 394–402.
- Härtel, C., Paul, P., Hanke, K., Humberg, A., Kribs, A., Mehler, K., Vochem, M., Wieg, C., Roll, C., Herting, E., und Göpel, W. (2018). Less invasive surfactant administration and complications of preterm birth. *Scientific Reports*, 8(1), 8333.
- Hayakawa, S., Ohno, N., Okada, S., und Kobayashi, M. (2017). Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period. *Clinical and Experimental Immunology*, 190(2), 268–279.
- Herting, E. (2013). Bronchopulmonale Dysplasie (BPD). *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 161(5), 417–424.
- Herting, E. (2019). Frühgeborene. In: Hübler, A. und Jorch, G. (Herausgeber): Neonatologie: Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen. 2. Aufl., 108-114, Thieme, Stuttgart
- Higano, N. S., Spielberg, D. R., Fleck, R. J., Schapiro, A. H., Walkup, L. L., Hahn, A. D., Tkach, J. A., Kingma, P. S., Merhar, S. L., Fain, S. B., und Woods, J. C. (2018). Neonatal Pulmonary Magnetic Resonance Imaging of Bronchopulmonary Dysplasia Predicts Short-Term Clinical Outcomes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 198(10), 1302–1311.
- Higgins, R. D., Jobe, A. H., Koso-Thomas, M., Bancalari, E., Viscardi, R. M., Hartert, T. V., Ryan, R. M., Kallapur, S. G., Steinhorn, R. H., Konduri, G. G., Davis, S. D., Thebaud, B., Clyman, R. I., Collaco, J. M., Martin, C. R., Woods, J. C., Finer, N. N., und Raju, T. N. K. (2018). Bronchopulmonary Dysplasia: Executive Summary of a Workshop. *The Journal of pediatrics*, 197, 300–308.
- Himmel, M. E., MacDonald, K. G., Garcia, R. V., Steiner, T. S., und Levings, M. K. (2013). Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(5), 2001–2008.
- Holst, E., Goffeng, A. R., und Andersch, B. (1994). Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(1), 176–186.
- Horbar, J. D., Carpenter, J. H., Badger, G. J., Kenny, M. J., Soll, R. F., Morrow, K. A., und Buzas, J. S. (2012). Mortality and Neonatal Morbidity Among Infants 501 to 1500 Grams From 2000 to 2009. *Pediatrics*, 129(6), 1019–1026.
- Hori, S., Nomura, T., und Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*, 299(5609), 1057–1061.
- Huenecke, S., Fryns, E., Wittekindt, B., Buxmann, H., Königs, C., Quaiser, A., Fischer, D.,

- Bremm, M., Klingebiel, T., Koehl, U., et al. (2016). Percentiles of Lymphocyte Subsets in Preterm Infants According to Gestational Age Compared to Children and Adolescents. *Scand. J. Immunol.* 84, 291–298.
- Husain, A. N., Siddiqui, N. H., und Stocker, J. T. (1998). Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Human Pathology*, 29(7), 710–717. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(98\)90280-5](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(98)90280-5)
- IQTIG. (2021). Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2020 Geburtshilfe Qualitätsindikatoren und Kennzahlen. IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, Berlin, https://iqtig.org/downloads/auswertung/2020/16n1gebh/QSKH_16n1-GEBH_2020_BUAW_V01_2021-08-10.pdf (Tag des Zugriffs 28.03.2023)
- Isayama, T., Lee, S. K., Mori, R., Kusuda, S., Fujimura, M., Ye, X. Y., Shah, P. S., und the Canadian Neonatal Network and the Neonatal Research Network of Japan. (2012). Comparison of Mortality and Morbidity of Very Low Birth Weight Infants Between Canada and Japan. *Pediatrics*, 130(4), e957–e965.
- Jackson, C., Rueda, C. M., Presicce, P., Jobe, A. H., Kallapur, S. G., und Chougnet, C. A. (2017). Emergence of inflammatory Treg in premature fetal Rhesus macaques in a model of LPS-induced chorioamnionitis. *The Journal of Immunology*, 198(1 Supplement), 206.12-206.12.
- Jansen, K., Satitsuksanoa, P., Wirz, O. F., Schneider, S. R., van de Veen, W., Tan, G., Sokolowska, M., Message, S. D., Kebabze, T., Glanville, N., Mallia, P., Akdis, C. A., Moniuszko, M., Johnston, S. L., Nadeau, K., und Akdis, M. (2022). T regulatory cells from atopic asthmatic individuals show a Th2-like phenotype. *Allergy*, 77(4), 1320–1324.
- Jensen, E. A., Dysart, K., Gantz, M. G., McDonald, S., Bamat, N. A., Keszler, M., Kirpalani, H., Laughon, M. M., Poindexter, B. B., Duncan, A. F., Yoder, B. A., Eichenwald, E. C., und DeMauro, S. B. (2019). The Diagnosis of Bronchopulmonary Dysplasia in Very Preterm Infants. An Evidence-based Approach. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(6), 751–759.
- Jobe, A. H., und Bancalari, E. (2001). Bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7), 1723–1729.
- Jobe, A. J. (1999). The new BPD: An arrest of lung development. *Pediatric Research*, 46(6), 641–643.
- Jónsson, B., Tullus, K., Brauner, A., Lu, Y., und Noack, G. (1997). Early increase of TNF α and IL-6 in tracheobronchial aspirate fluid indicator of subsequent chronic lung

disease in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 77(3), F198–F201. <https://doi.org/10.1136/fn.77.3.F198>

- Joshi, S., Powell, T., Watkins, W. J., Drayton, M., Williams, E. M., und Kotecha, S. (2013). Exercise-induced bronchoconstriction in school-aged children who had chronic lung disease in infancy. *The Journal of Pediatrics*, 162(4), 813-818.e1.
- Kahn, D. A., und Baltimore, D. (2010). Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9299–9304.
- Katz, T. A., Vliegenthart, R. J. S., Aarnoudse-Moens, C. S. H., Leemhuis, A. G., Beuger, S., Blok, G. J., van Brakel, M. J. M., van den Heuvel, M. E. N., van Kempen, A. A. M. W., Lutterman, C., Rijpert, M., Schiering, I. A., Ran, N. C., Visser, F., Wilms, J., van Kaam, A. H., und Onland, W. (2022). Severity of Bronchopulmonary Dysplasia and Neurodevelopmental Outcome at 2 and 5 Years Corrected Age. *The Journal of Pediatrics*, 243, 40-46.e2.
- Keller, R. L., Feng, R., DeMauro, S. B., Ferkol, T., Hardie, W., Rogers, E. E., Stevens, T. P., Voynow, J. A., Bellamy, S. L., Shaw, P. A., Moore, P. E., und Prematurity and Respiratory Outcomes Program. (2017). Bronchopulmonary Dysplasia and Perinatal Characteristics Predict 1-Year Respiratory Outcomes in Newborns Born at Extremely Low Gestational Age: A Prospective Cohort Study. *The Journal of Pediatrics*, 187, 89-97.e3.
- Khemani, E., McElhinney, D. B., Rhein, L., Andrade, O., Lacro, R. V., Thomas, K. C., und Mullen, M. P. (2007). Pulmonary artery hypertension in formerly premature infants with bronchopulmonary dysplasia: Clinical features and outcomes in the surfactant era. *Pediatrics*, 120(6), 1260–1269.
- Kim, D.-H., Kim, D.-H., Kim, H.-S., Choi, C. W., Kim, E.-K., Kim, B. I., und Choi, J.-H. (2012). Risk Factors for Pulmonary Artery Hypertension in Preterm Infants with Moderate or Severe Bronchopulmonary Dysplasia. *Neonatology*, 101(1), 40–46.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Röttschke, O., und Falk, K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25+CD4+ T-cell subset. *Blood*, 105(7), 2877–2886.
- Klingenberg, C., Wheeler, K., McCallion, N., Morley, C., und Davis, P. (2017). Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10.
- Klinger, G., Sokolover, N., Boyko, V., Sirota, L., Lerner-Geva, L., Reichman, B., und Israel Neonatal Network. (2013). Perinatal risk factors for bronchopulmonary dysplasia in

- a national cohort of very-low-birthweight infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(2), 115.e1-9.
- Kollmann, T. R., Levy, O., Montgomery, R. R., und Goriely, S. (2012). Innate Immune Function by Toll-like Receptors: Distinct Responses in Newborns and the Elderly. *Immunity*, 37(5), 771–783.
- Köstlin, N., Kugel, H., Spring, B., Leiber, A., Marmé, A., Henes, M., Rieber, N., Hartl, D., Poets, C. F., und Gille, C. (2014). Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *European Journal of Immunology*, 44(9), 2582–2591.
- Köstlin-Gille, N., Härtel, C., Haug, C., Göpel, W., Zemlin, M., Müller, A., Poets, C. F., Herting, E., und Gille, C. (2021). Epidemiology of Early and Late Onset Neonatal Sepsis in Very Low Birthweight Infants: Data from the German Neonatal Network. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 40(3), 255–259.
- Kotecha, S., Chan, B., Azam, N., Silverman, M., und Shaw, R. J. (1995). Increase in interleukin-8 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in bronchoalveolar lavage fluid from premature infants who develop chronic lung disease. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 72(2), F90-96.
- Kugelman, A., Reichman, B., Chistyakov, I., Boyko, V., Levitski, O., Lerner-Geva, L., Riskin, A., und Bader, D. (2007). Postdischarge Infant Mortality Among Very Low Birth Weight Infants: A Population-Based Study. *Pediatrics*, 120(4), e788–e794.
- Kwon, H. W., Kim, H.-S., An, H. S., Kwon, B. S., Kim, G. B., Shin, S. H., Kim, E.-K., Bae, E. J., Noh, C. I., und Choi, J.-H. (2016). Long-Term Outcomes of Pulmonary Hypertension in Preterm Infants with Bronchopulmonary Dysplasia. *Neonatology*, 110(3), 181–189.
- Lapcharoensap, W., Gage, S. C., Kan, P., Profit, J., Shaw, G. M., Gould, J. B., Stevenson, D. K., O’Brodivich, H., und Lee, H. C. (2015). Hospital variation and risk factors for bronchopulmonary dysplasia in a population-based cohort. *JAMA Pediatrics*, 169(2), e143676.
- Laughon, M. M., Langer, J. C., Bose, C. L., Smith, P. B., Ambalavanan, N., Kennedy, K. A., Stoll, B. J., Buchter, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Cotten, C. M., Wilson-Costello, D. E., Shankaran, S., Meurs, K. P. V., Davis, A. S., Gantz, M. G., Finer, N. N., Yoder, B. A., Faix, R. G., ... Walsh, M. C. (2011). Prediction of Bronchopulmonary Dysplasia by Postnatal Age in Extremely Premature Infants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(12), 1715–1722.
- Lavoie, P. M., Pham, C., und Jang, K. L. (2008). Heritability of bronchopulmonary

dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health. *Pediatrics*, 122(3), 479–485.

- Lawrence, S. M., Corriden, R., und Nizet, V. (2017). Age-Appropriate Functions and Dysfunctions of the Neonatal Neutrophil. *Frontiers in Pediatrics*, 0.
- Lee, J. H., Kim, C. S., Chang, Y. S., und Choi, J.-H. (2015). Respiratory Syncytial Virus Related Readmission in Preterm Infants Less than 34 weeks' Gestation Following Discharge from a Neonatal Intensive Care Unit in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 30(Suppl 1), S104–S110.
- Lee, J. H., Noh, O. K., Chang, Y. S., und Network, K. N. (2019). Neonatal Outcomes of Very Low Birth Weight Infants in Korean Neonatal Network from 2013 to 2016. *Journal of Korean Medical Science*, 34(5).
- Levy, O. (2007). Innate immunity of the newborn: Basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), Article 5.
- Liao, F., Rabin, R. L., Smith, C. S., Sharma, G., Nutman, T. B., und Farber, J. M. (1999). CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(1), 186–194.
- Lin, H.-J., Du, L.-Z., Ma, X.-L., Shi, L.-P., Pan, J.-H., Tong, X.-M., Li, Q.-P., Zhou, J.-G., Yi, B., Liu, L., Chen, Y.-B., Wei, Q.-F., Wu, H.-Q., Li, M., Liu, C.-Q., Gao, X.-R., Xia, S.-W., Li, W.-B., Yan, C.-Y., ... Zhuang, S.-Q. (2015). Mortality and Morbidity of Extremely Low Birth Weight Infants in the Mainland of China: A Multi-center Study. *Chinese Medical Journal*, 128(20), 2743–2750.
- Luciano, A. A., Arbona-Ramirez, I. M., Ruiz, R., Llorens-Bonilla, B. J., Martinez-Lopez, D. G., Funderburg, N., und Dorsey, M. J. (2014). Alterations in regulatory T cell subpopulations seen in preterm infants. *PloS One*, 9(5), e95867.
- Ly, N. P., Ruiz-Perez, B., McLoughlin, R. M., Visness, C. M., Wallace, P. K., Cruikshank, W. W., Tzianabos, A. O., O'Connor, G. T., Gold, D. R., und Gern, J. E. (2009). Characterization of regulatory T cells in urban newborns. *Clinical and Molecular Allergy*, 7(1), Article 1.
- Maitre, N. L., Ballard, R. A., Ellenberg, J. H., Davis, S. D., Greenberg, J. M., Hamvas, A., Pryhuber, G. S., und Prematurity and Respiratory Outcomes Program. (2015). Respiratory consequences of prematurity: Evolution of a diagnosis and development of a comprehensive approach. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 35(5), 313–321.
- Malikiwi, A. I., Lee, Y.-M., Davies-Tuck, M., und Wong, F. Y. (2019). Postnatal nutritional

deficit is an independent predictor of bronchopulmonary dysplasia among extremely premature infants born at or less than 28 weeks gestation. *Early Human Development*, 131, 29–35.

Mao, X., Qiu, J., Zhao, L., Xu, J., Yin, J., Yang, Y., Zhang, M., and Cheng, R. (2018). Vitamin D and IL-10 Deficiency in Preterm Neonates With Bronchopulmonary Dysplasia. *Frontiers in Pediatrics*, 6.

March of Dimes, PMNCH, Save the Children und World Health Organization (2012). Executive Summary. In: *Born too soon: The global action report on preterm birth.*, 1-7 World Health Organization, Genf

Marques, B. R., Dinis, A. C., Rocha, G., Flôr-de-Lima, F., Matos, A. C., Henriques, C., and Guimarães, H. (2019). Morbidity and mortality in preterm infants less than 29 weeks of gestational age. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine (JPNIM)*, 8(1), Article 1.

McClymont, S. A., Putnam, A. L., Lee, M. R., Esensten, J. H., Liu, W., Hulme, M. A., Hoffmüller, U., Baron, U., Olek, S., Bluestone, J. A., and Brusko, T. M. (2011). Plasticity of Human Regulatory T Cells in Healthy Subjects and Patients with Type 1 Diabetes. *The Journal of Immunology*, 186(7), 3918–3926.

Melville, J. M., und Moss, T. J. M. (2013). The immune consequences of preterm birth. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 79.

Michaëlsson, J., Mold, J. E., McCune, J. M., und Nixon, D. F. (2006). Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(10), 5741–5748.

Milanesi, B. G., Lima, P. A., Villela, L. D., Martins, A. S., Gomes-Junior, S. C. S., Moreira, M. E. L., und Méio, M. D. B. B. (2021). Assessment of early nutritional intake in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: A cohort study. *European Journal of Pediatrics*, 180(5), 1423–1430.

Misra, R., Shah, S., Fowell, D., Wang, H., Scheible, K., Misra, S., Huyck, H., Wyman, C., Ryan, R. M., Reynolds, A. M., Mariani, T., Katzman, P. J., und Pryhuber, G. S. (2015). Preterm cord blood CD4⁺ T cells exhibit increased IL-6 production in chorioamnionitis and decreased CD4⁺ T cells in bronchopulmonary dysplasia. *Human Immunology*, 76(5), 329–338.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G., und Sakaguchi, S. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3

- Transcription Factor. *Immunity*, 30(6), 899–911.
- Mold, J. E., und McCune, J. M. (2011). At the crossroads between tolerance and aggression: Revisiting the „layered immune system“ hypothesis. *Chimerism*, 2(2), 35–41.
- Mold, J. E., Michaëlsson, J., Burt, T. D., Muench, M. O., Beckerman, K. P., Busch, M. P., Lee, T.-H., Nixon, D. F., und McCune, J. M. (2008). Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5907), 1562–1565.
- Naderi, N., Pourfathollah, A. A., Alimoghaddam, K., und Moazzeni, S. M. (2009). Cord blood dendritic cells prevent the differentiation of naïve T-helper cells towards Th1 irrespective of their subtype. *Clinical and Experimental Medicine*, 9(1), 29–36.
- Nakamura, K., Kitani, A., und Strober, W. (2001). Cell Contact–Dependent Immunosuppression by Cd4+Cd25+Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface–Bound Transforming Growth Factor β . *Journal of Experimental Medicine*, 194(5), 629–644.
- Narendran, V., Visscher, M. O., Abril, I., Hendrix, S. W., und Hoath, S. B. (2010). Biomarkers of epidermal innate immunity in premature and full-term infants. *Pediatric Research*, 67(4), 382–386.
- Northway, W. H., Rosan, R. C., und Porter, D. Y. (1967). Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *The New England Journal of Medicine*, 276(7), 357–368.
- Nussbaum, C., Gloning, A., Pruenster, M., Frommhold, D., Bierschenk, S., Genzel-Boroviczény, O., von Andrian, U. H., Quackenbush, E., und Sperandio, M. (2013). Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(2), 175–184.
- Olin, A., Henckel, E., Chen, Y., Lakshmikanth, T., Pou, C., Mikes, J., Gustafsson, A., Bernhardsson, A. K., Zhang, C., Bohlin, K., und Brodin, P. (2018). Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell*, 174(5), 1277-1292.e14.
- Onland, W., Debray, T. P., Laughon, M. M., Miedema, M., Cools, F., Askie, L. M., Asselin, J. M., Calvert, S. A., Courtney, S. E., Dani, C., Durand, D. J., Marlow, N., Peacock, J. L., Pillow, J. J., Soll, R. F., Thome, U. H., Truffert, P., Schreiber, M. D., Van Reempts, P., ... Offringa, M. (2013). Clinical prediction models for bronchopulmonary dysplasia: A systematic review and external validation study. *BMC Pediatrics*, 13(1), 207.
- Pagel, J., Hartz, A., Figge, J., Gille, C., Eschweiler, S., Petersen, K., Schreiter, L., Hammer, J., Karsten, C. M., Friedrich, D., Herting, E., Göpel, W., Rupp, J., und Härtel, C. (2016). Regulatory T cell frequencies are increased in preterm infants with clinical

- early-onset sepsis. *Clinical and Experimental Immunology*, 185(2), 219–227.
- Pagel, J., Twisselmann, N., Rausch, T. K., Waschina, S., Hartz, A., Steinbeis, M., Olbertz, J., Nagel, K., Steinmetz, A., Faust, K., Demmert, M., Göpel, W., Herting, E., Rupp, J., und Härtel, C. (2020). Increased Regulatory T Cells Precede the Development of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants. *Frontiers in Immunology*, 11, 565257.
- Podestà, M., Bruschettoni, M., Cossu, C., Sabatini, F., Dagnino, M., Romantsik, O., Spaggiari, G. M., Ramenghi, L. A., und Frassoni, F. (2015). Preterm Cord Blood Contains a Higher Proportion of Immature Hematopoietic Progenitors Compared to Term Samples. *PLOS ONE*, 10(9), e0138680.
- Poindexter, B. B., Feng, R., Schmidt, B., Aschner, J. L., Ballard, R. A., Hamvas, A., Reynolds, A. M., Shaw, P. A., Jobe, A. H., und Prematurity and Respiratory Outcomes Program. (2015). Comparisons and Limitations of Current Definitions of Bronchopulmonary Dysplasia for the Prematurity and Respiratory Outcomes Program. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(12), 1822–1830.
- Qazi, K. R., Jensen, G. B., Heiden, M. van der, Björkander, S., Holmlund, U., Haileselassie, Y., Kokkinou, E., Marchini, G., Jenmalm, M. C., Abrahamsson, T., und Sverre-mark-Ekström, E. (2020). Extremely Preterm Infants Have Significant Alterations in Their Conventional T Cell Compartment during the First Weeks of Life. *The Journal of Immunology*, 204(1), 68–77.
- Rennó, C., Nadaf, M. I. V., Zago, C. A., Carneiro-Sampaio, M., und Palmeira, P. (2016). Healthy Preterm Newborns Show an Increased Frequency of CD4(+) CD25(high) CD127(low) FOXP3(+) Regulatory T Cells with a Naive Phenotype and High Expression of Gut-Homing Receptors. *Scandinavian Journal of Immunology*, 83(6), 445–455.
- Restori, K. H., Srinivasa, B. T., Ward, B. J., und Fixman, E. D. (2018). Neonatal Immunity, Respiratory Virus Infections, and the Development of Asthma. *Frontiers in Immunology*, 9, 1249.
- Rieber, N., Gille, C., Köstlin, N., Schäfer, I., Spring, B., Ost, M., Spieles, H., Kugel, H. A., Pfeiffer, M., Heininger, V., Alkhaled, M., Hector, A., Mays, L., Kormann, M., Zundel, S., Fuchs, J., Handgretinger, R., Poets, C. F., und Hartl, D. (2013). Neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in cord blood modulate innate and adaptive immune responses. *Clinical and Experimental Immunology*, 174(1), 45–52.
- Rito, D. C., Viehl, L. T., Buchanan, P. M., Haridas, S., und Koenig, J. M. (2017). Augmented Th17-type immune responses in preterm neonates exposed to histologic chorioamnionitis. *Pediatric Research*, 81(4), 639–645.

- Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G., und Lombardi, G. (2019). Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 43.
- Romero, R., Gómez, R., Chaiworapongsa, T., Conoscenti, G., Kim, J. C., und Kim, Y. M. (2001). The role of infection in preterm labour and delivery. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 15 Suppl 2, 41–56.
- Rueda, C. M., Presicce, P., Jackson, C. M., Miller, L. A., Kallapur, S. G., Jobe, A. H., und Chougnnet, C. A. (2016). Lipopolysaccharide-Induced Chorioamnionitis Promotes IL-1–Dependent Inflammatory FOXP3+ CD4+ T Cells in the Fetal Rhesus Macaque. *The Journal of Immunology*, 196(9), 3706–3715.
- Rueda, C. M., Wells, C. B., Gisslen, T., Jobe, A. H., Kallapur, S. G., und Chougnnet, C. A. (2015). Effect of chorioamnionitis on regulatory T cells in moderate/late preterm neonates. *Human Immunology*, 76(1), 65–73.
- Sahni, M., und Bhandari, V. (2020). Recent advances in understanding and management of bronchopulmonary dysplasia. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-703.
- Schwarz, J., Scheckenbach, V., Kugel, H., Spring, B., Pagel, J., Härtel, C., Pauluschke-Fröhlich, J., Peter, A., Poets, C. F., Gille, C., und Köstlin, N. (2018). Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period. *Clinical and Experimental Immunology*, 191(3), 328–337.
- Sedlacek, H.-H. (2017 a). Die unterschiedlichen Abwehrssysteme. In: Sedlacek, H.-H. (Herausgeber): *Immunologie – die Immunabwehr des Menschen*. 2. Aufl., 1-4, De Gruyter, Berlin/Boston
- Sedlacek, H.-H. (2017 b). Immunschwächen des Neugeborenen. In: Sedlacek, H.-H. (Herausgeber): *Immunologie – die Immunabwehr des Menschen*. 2. Aufl., 501-507, De Gruyter, Berlin/Boston
- Sedlacek, H.-H. (2017 c). Regulatorische T-Lymphozyten. In: Sedlacek, H.-H. (Herausgeber): *Immunologie – die Immunabwehr des Menschen*. 2. Aufl., 254-266, De Gruyter, Berlin/Boston
- Shah, P. S., Sankaran, K., Aziz, K., Allen, A. C., Seshia, M., Ohlsson, A., und Lee, S. K. (2012). Outcomes of preterm infants <29 weeks gestation over 10-year period in Canada: A cause for concern? *Journal of Perinatology*, 32(2), Article 2.
- Shahzad, T., Radajewski, S., Chao, C.-M., Bellusci, S., und Ehrhardt, H. (2016). Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: When inflammation meets organ development. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), 23.

- Sharma, A. A., Jen, R., Brant, R., Ladd, M., Huang, Q., Skoll, A., Senger, C., Turvey, S. E., Marr, N., und Lavoie, P. M. (2014). Hierarchical Maturation of Innate Immune Defences in Very Preterm Neonates. *Neonatology*, 106(1), 1–9.
- Shennan, A. T., Dunn, M. S., Ohlsson, A., Lennox, K., und Hoskins, E. M. (1988). Abnormal Pulmonary Outcomes in Premature Infants: Prediction From Oxygen Requirement in the Neonatal Period. *Pediatrics*, 82(4), 527–532.
- Shim, S.-Y., Yun, J. Y., Cho, S. J., Kim, M. H., und Park, E. A. (2021). The Prediction of Bronchopulmonary Dysplasia in Very Low Birth Weight Infants through Clinical Indicators within 1 Hour of Delivery. *Journal of Korean Medical Science*, 36(11).
- Sjaastad, L. E., Owen, D. L., Tracy, S. I., und Farrar, M. A. (2021). Phenotypic and Functional Diversity in Regulatory T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 715901.
- Smith, V. C., Zupancic, J. A. F., McCormick, M. C., Croen, L. A., Greene, J., Escobar, G. J., und Richardson, D. K. (2004). Rehospitalization in the first year of life among infants with bronchopulmonary dysplasia. *The Journal of Pediatrics*, 144(6), 799–803.
- Spiegler, J., Preuß, M., Gebauer, C., Bendiks, M., Herting, E., Göpel, W., Bendiks, M., Berghäuser, M. A., Böckenholt, K., Bohnhorst, B., Böttger, R., Brune, T., Dawczynski, K., Dördelmann, M., Ehlers, S., Eichhorn, J. G., Felderhoff-Müser, U., Franz, A., Gebauer, C., ... Wintgens, J. (2016). Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? *The Journal of Pediatrics*, 169, 76–80.e4.
- Stichtenoth, G., Demmert, M., Bohnhorst, B., Stein, A., Ehlers, S., Heitmann, F., Rieger-Fackeldey, E., Olbertz, D., Roll, C., Emeis, M., Mögel, M., Schiffmann, H., Wieg, C., Wintgens, J., Herting, E., Göpel, W., und Härtel, C. (2012). Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: Data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klinische Padiatrie*, 224(4), 276–281.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Shankaran, S., Laptook, A. R., Walsh, M. C., Hale, E. C., Newman, N. S., Schibler, K., Carlo, W. A., Kennedy, K. A., Poindexter, B. B., Finer, N. N., Ehrenkranz, R. A., Duara, S., Sánchez, P. J., O’Shea, T. M., Goldberg, R. N., Van Meurs, K. P., ... Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2010). Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 126(3), 443–456.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Walsh, M. C., Carlo, W. A., Shankaran, S., Laptook, A. R., Sánchez, P. J., Van Meurs, K. P., Wyckoff, M., Das, A., Hale, E. C., Ball, M. B., Newman, N. S., Schibler, K., Poindexter, B. B., Kennedy, K. A., Cotten, C. M.,

- Watterberg, K. L., ... Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2015). Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA*, 314(10), 1039–1051.
- Strunk, T., Doherty, D., Richmond, P., Simmer, K., Charles, A., Levy, O., Liyanage, K., Smith, T., Currie, A., und Burgner, D. (2009). Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 94(3), F230-231.
- Su, B.-H., Hsieh, W.-S., Hsu, C.-H., Chang, J.-H., Lien, R., und Lin, C.-H. (2015). Neonatal Outcomes of Extremely Preterm Infants from Taiwan: Comparison with Canada, Japan, and the USA. *Pediatrics and Neonatology*, 56(1), 46–52.
- Tai, X., Van Laethem, F., Pobezinsky, L., Guintier, T., Sharrow, S. O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C. B., Feigenbaum, L., und Singer, A. (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood*, 119(22), 5155–5163.
- Thébaud, B., Goss, K. N., Laughon, M., Whitsett, J. A., Abman, S. H., Steinhorn, R. H., Aschner, J. L., Davis, P. G., McGrath-Morrow, S. A., Soll, R. F., und Jobe, A. H. (2019). Bronchopulmonary dysplasia. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 78.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., und Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, 184(7), 3433–3441.
- Thornton, A. M., Lu, J., Korty, P. E., Kim, Y. C., Martens, C., Sun, P. D., und Shevach, E. M. (2019). Helios+ and Helios- Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *European Journal of Immunology*, 49(3), 398–412.
- Todd, D. A., Earl, M., Lloyd, J., Greenberg, M., und John, E. (1998). Cytological changes in endotracheal aspirates associated with chronic lung disease. *Early Human Development*, 51(1), 13–22.
- Toth, A., Steinmeyer, S., Kannan, P., Gray, J., Jackson, C. M., Mukherjee, S., Demmert, M., Sheak, J. R., Benson, D., Kitzmiller, J., Wayman, J. A., Presicce, P., Cates, C., Rubin, R., Chetal, K., Du, Y., Miao, Y., Gu, M., Guo, M., ... Zacharias, W. J. (2022). Inflammatory blockade prevents injury to the developing pulmonary gas exchange surface in preterm primates. *Science Translational Medicine*, 14(638), eabl8574.
- Tucker, J., und McGuire, W. (2004). Epidemiology of preterm birth. *BMJ*, 329(7467), 675–

678.

- Upham, J. W., Rate, A., Rowe, J., Kusel, M., Sly, P. D., and Holt, P. G. (2006). Dendritic Cell Immaturity during Infancy Restricts the Capacity To Express Vaccine-Specific T-Cell Memory. *Infection and Immunity*, 74(2), 1106–1112.
- Valenzuela-Stutman, D., Marshall, G., Tapia, J. L., Mariani, G., Bancalari, A., Gonzalez, Á., und Neocosur Neonatal Network. (2019). Bronchopulmonary dysplasia: Risk prediction models for very-low- birth-weight infants. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 39(9), 1275–1281.
- van Rossem, M. C., van de Loo, M., Laan, B. J., de Sonnaville, E. S. V., Tamminga, P., van Kaam, A. H., und Onland, W. (2015). Accuracy of the Diagnosis of Bronchopulmonary Dysplasia in a Referral-Based Health Care System. *The Journal of Pediatrics*, 167(3), 540-544.e1.
- Vento, M., Moro, M., Escrig, R., Arruza, L., Villar, G., Izquierdo, I., Roberts, L. J., Arduini, A., Escobar, J. J., Sastre, J., und Asensi, M. A. (2009). Preterm Resuscitation With Low Oxygen Causes Less Oxidative Stress, Inflammation, and Chronic Lung Disease. *Pediatrics*, 124(3), e439–e449.
- Villamor-Martinez, E., Álvarez-Fuente, M., Ghazi, A. M. T., Degraeuwe, P., Zimmermann, L. J. I., Kramer, B. W., und Villamor, E. (2019). Association of Chorioamnionitis With Bronchopulmonary Dysplasia Among Preterm Infants: A Systematic Review, Meta-analysis, and Metaregression. *JAMA Network Open*, 2(11).
- Voigt, M., Fusch, C., Olbertz, D., Hartmann, K., Rochow, N., Renken, C., und Schneider, K. T. M. (2006). Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 66(10), 956–970.
- vom Hove, M., Prenzel, F., Uhlig, H. H., und Robel-Tillig, E. (2014). Pulmonary Outcome in Former Preterm, Very Low Birth Weight Children with Bronchopulmonary Dysplasia: A Case-Control Follow-Up at School Age. *The Journal of Pediatrics*, 164(1), 40-45.e4.
- Walker, L. S. K. (2013). Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of Autoimmunity*, 45(100), 49–57.
- Walsh, M. C., Yao, Q., Gettner, P., Hale, E., Collins, M., Hensman, A., Everette, R., Peters, N., Miller, N., Muran, G., Auten, K., Newman, N., Rowan, G., Grisby, C., Arnell, K., Miller, L., Ball, B., McDavid, G., und National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2004). Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatrics*, 114(5), 1305–1311.
- Weitkamp, J.-H., Koyama, T., Rock, M. T., Correa, H., Goettel, J. A., Matta, P., Oswald-

- Richter, K., Rosen, M. J., Engelhardt, B. G., Moore, D. J., und Polk, D. B. (2013). Necrotising enterocolitis is characterised by disrupted immune regulation and diminished mucosal regulatory (FOXP3)/effector (CD4, CD8) T cell ratios. *Gut*, 62(1), 73–82.
- Wemhöner, A., Ortner, D., Tschirch, E., Strasak, A., und Rüdiger, M. (2011). Nutrition of preterm infants in relation to bronchopulmonary dysplasia. *BMC Pulmonary Medicine*, 11, 7.
- Yamazaki, T., Yang, X. O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H. S., Ma, L., Panopoulos, A. D., Craig, S., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., und Dong, C. (2008). CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 181(12), 8391–8401.
- York, T. P., Eaves, L. J., Neale, M. C., und Strauss, J. F. (2014). The contribution of genetic and environmental factors to the duration of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 210(5), 398–405.
- Yost, C. C., Cody, M. J., Harris, E. S., Thornton, N. L., McInturff, A. M., Martinez, M. L., Chandler, N. B., Rodesch, C. K., Albertine, K. H., Petti, C. A., Weyrich, A. S., und Zimmerman, G. A. (2009). Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: A novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*, 113(25), 6419–6427.
- Zaghouani, H., Hoeman, C. M., und Adkins, B. (2009). Neonatal immunity: Faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends in Immunology*, 30(12), 585.
- Zahran, A. M., Saad, K., Abdel-Raheem, Y. F., Elsayh, K. I., El-Houfey, A. A., Aboul-Khair, M. D., und Alblihed, M. A. (2019). Characterization of Regulatory T Cells in Preterm and Term Infants. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 67(1), 49–54.

Anhänge

Abbildungen

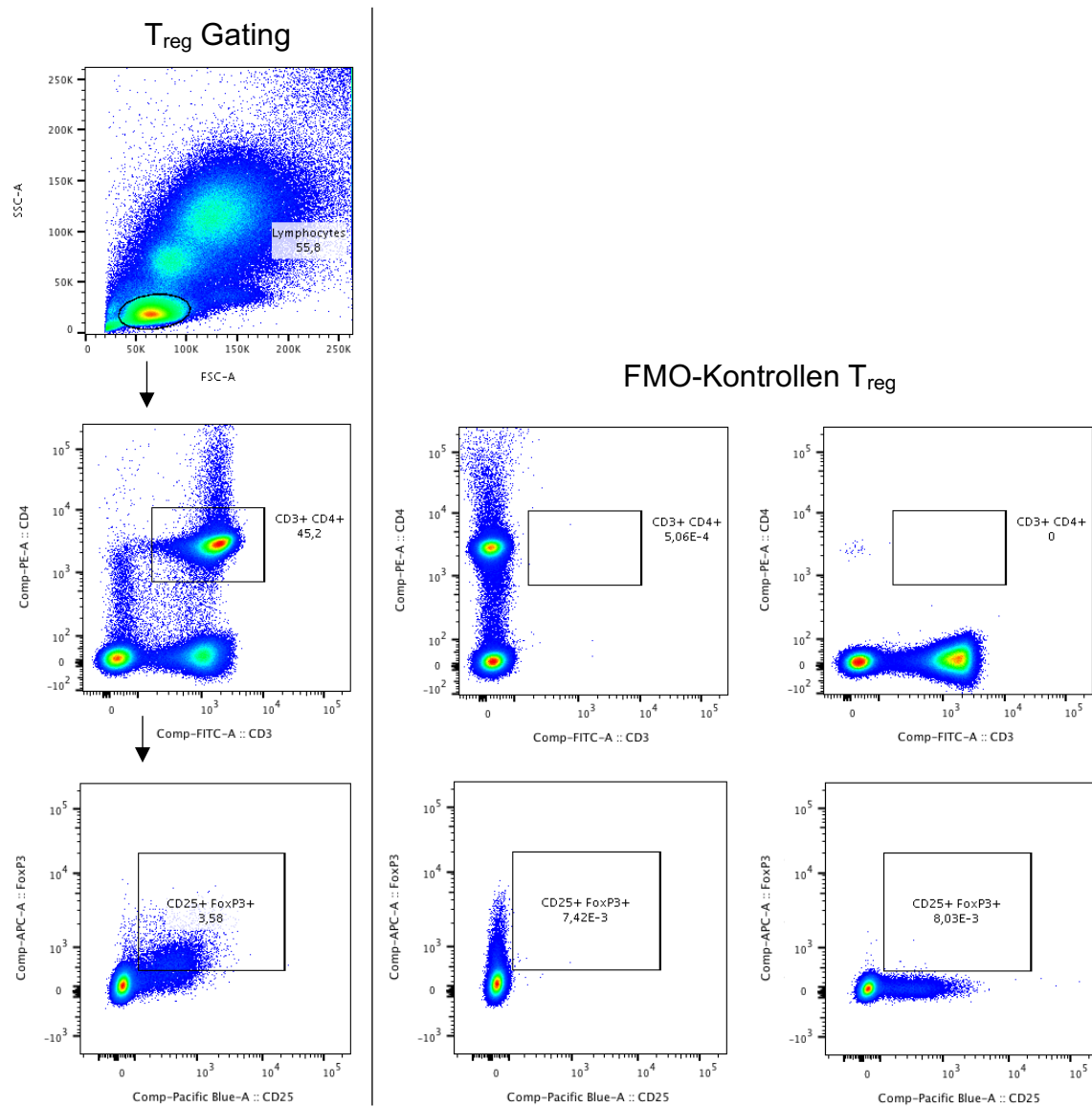


Abbildung A: Fluorescence Minus One-Kontrollen der durchflusszytometrischen Bestimmung der relativen Menge regulatorischer T-Zellen

Am linken Rand vertikal ist die Gatingstrategie zur Identifizierung der CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen gezeigt.

Auf der rechten Seite sind die entsprechenden Fluorescence Minus One-Kontrollen für den jeweiligen Gating-Schritt gezeigt. Die Grenzen des jeweiligen Gatingbereichs stimmen überein. In der zweiten Reihe links ist die CD4 FMO Kontrolle, rechts die CD3 FMO Kontrolle. Analog in der dritten Reihe zu finden ist links die CD25 FMO Kontrolle und rechts die FoxP3 FMO Kontrolle.

Die Abbildung zeigt die Probe eines Frühgeborenen von 34 SSW im Alter von einem Jahr.

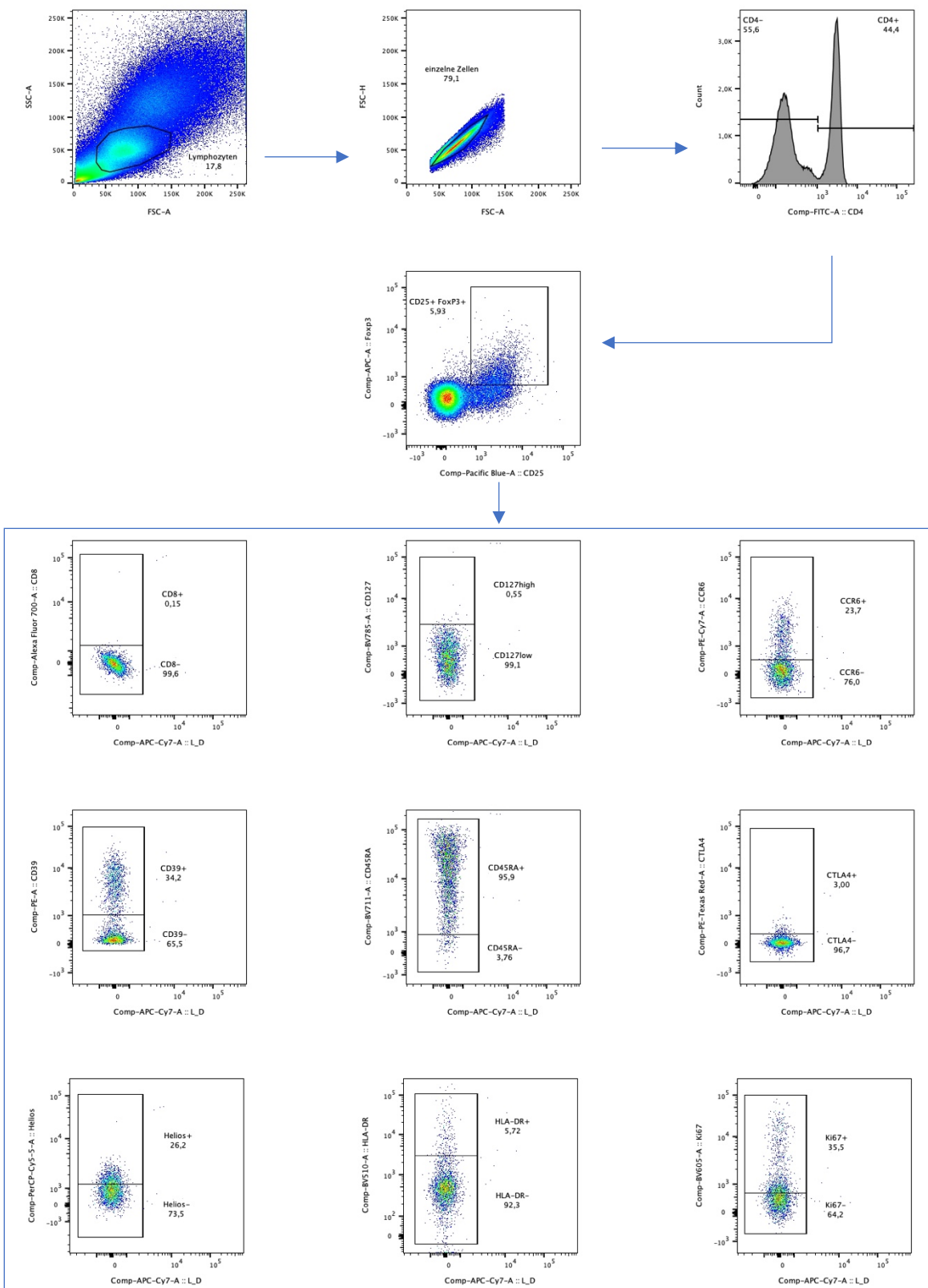


Abbildung B: Anwendung Multicolor-Panel zur phänotypischen Charakterisierung CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen unter Verwendung peripheren Blutes eines Frühgeborenen

Die Abbildung zeigt die Probe eines Frühgeborenen von 23+5 SSW am Lebens- tag 22.

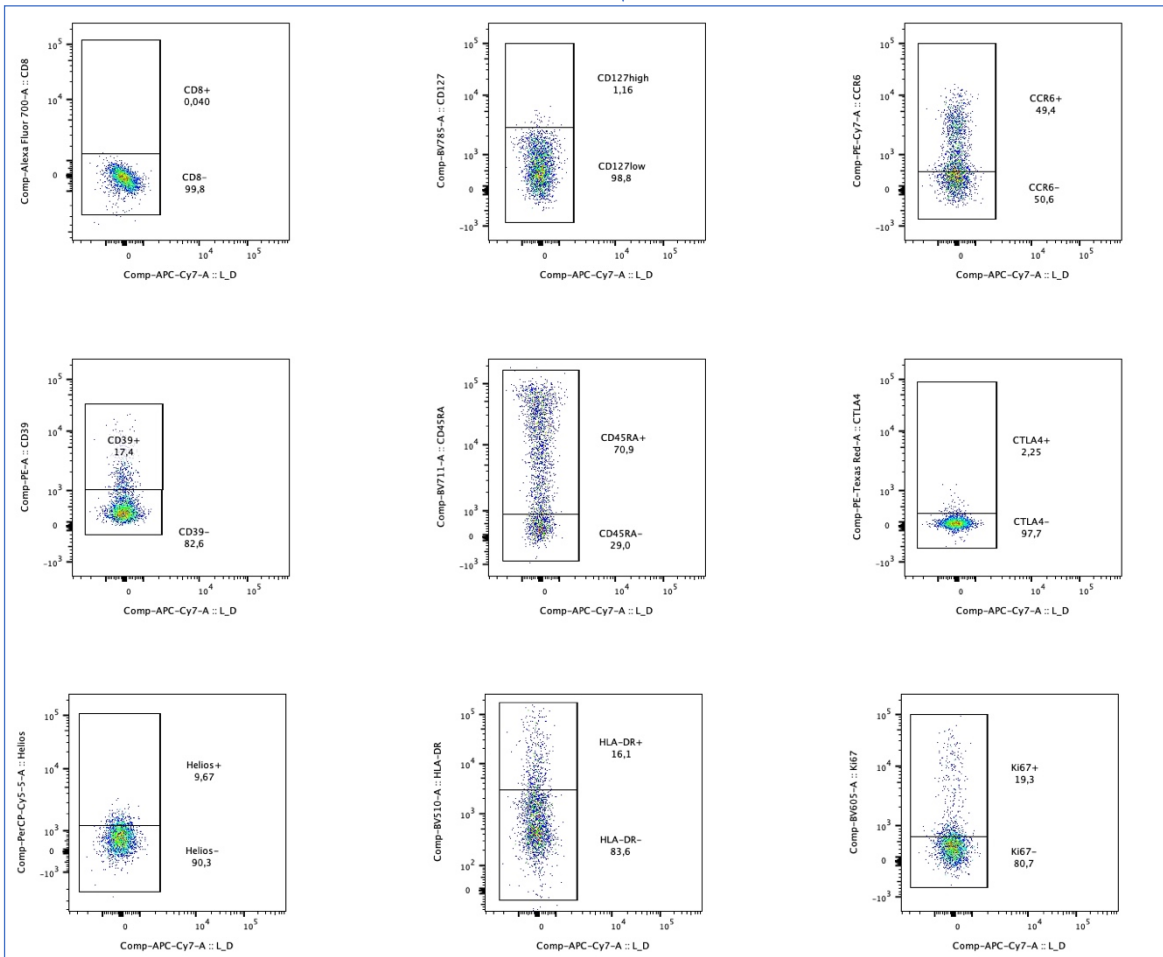
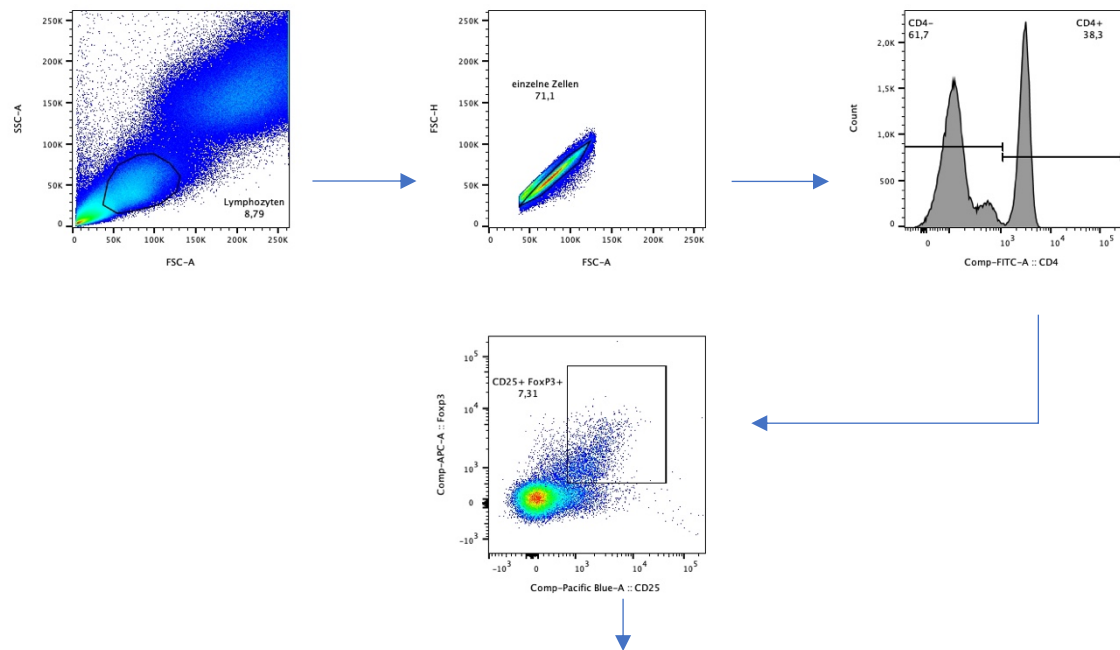


Abbildung C: Anwendung Multicolor-Panel zur phänotypischen Charakterisierung CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen unter Verwendung peripheren Blutes einer erwachsenen weiblichen Spenderin
 Die Abbildung zeigt die Probe einer gesunden weiblichen Spenderin.

Ethikvotum

Die Untersuchungen wurden dem Betreuer der hier vorgelegten Promotionsschrift von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (Aktenzeichen 13-037, Datum Genehmigungsschreiben 22.05.2013; Aktenzeichen 15-304, Datum Genehmigungsschreiben 18.11.2015).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Studienpatienten und ihren Eltern und Familien. Ohne ihre Unterstützung wäre die Realisierung dieses Forschungsprojektes nicht möglich gewesen.

Ich möchte meiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung meines Promotionsprojektes sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Härtel danke ich für die Möglichkeit der Mitarbeit in der Arbeitsgruppe, der Überlassung des Promotionsprojektes sowie für die Betreuung und die in vielerlei Hinsicht große Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Bei Dr. med. Julia Pagel möchte ich mich für ihre geduldige Anleitung meiner wissenschaftlichen Arbeit, ihre große Hilfsbereitschaft und ihren fachlichen Rat sowie konstruktive Kritik bedanken.

Des Weiteren möchte Professor Claire Chougnat, PhD und Shibabrata Mukherjee, PhD aus dem Cincinnati Children's Hospital Medical Center für ihre große Unterstützung und meine wissenschaftliche Ausbildung danken. Durch die hervorragende Förderung des Promotionsvorhabens durch meine Arbeitsgruppe sowie das Graduiertenkolleg International Research Training Group 1911 wurde mir ein dreimonatiger Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Professor Chougnat ermöglicht, der zu den prägendsten Erfahrungen meines Studiums zählt.

Dr. rer. nat. Tillman Vollbrandt aus dem Institut für systemische Entzündungsforschung der Universität zu Lübeck möchte ich für die vielen Ratschläge und Hinweise im Rahmen des Einsatzes der Durchflusszytometrie danken.

Tanja Rausch danke ich herzlich für ihre hervorragende Unterstützung bei der statistischen Auswertung der generierten Daten.

Des Weiteren möchte ich vielen weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danken, die an der Datenerhebung, -verwaltung und -auswertung beteiligt waren.

Professor Dr. med. Jan Rupp aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie der Universität zu Lübeck und den Mitarbeitern des dortigen Forschungslabores danke ich herzlich für das Zurverfügungstellen eines Arbeitsplatzes sowie die kollegiale Zusammenarbeit.

Dem Graduiertenkolleg International Research Training Group 1911 sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle und ideelle

Förderung in der Zeit der Vollzeittätigkeit im Forschungslabor im Rahmen des Promotionsprojektes.

Mein Dank gilt auch den Ärzten und Pflegekräften der neonatologischen Intensivstation sowie der pädiatrischen Intensivstation der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck für die Unterstützung des Forschungsprojektes.

Ich danke meiner Familie für ihre stetige und bedingungslose Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.