

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Borkhardt

# **INKT-Zellzahlen bei Kindern mit erworbener und angeborener Immundefizienz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christine Maria Bongartz

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med N. Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med H.-J. Laws

Zweitgutachter: Prof. Dr. med U. Germing

*Meinen Kindern gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
1.1 Invariante NKT-Zellen.....	1
1.2 iNKT-Zell-Zahlen .....	5
1.3 Invariante NKT- Zellen bei Kindern .....	6
1.3.1 Invariante NKT-Zellen bei Kindern mit HIV-Infektion .....	7
1.3.2 Invariante NKT-Zellen und angeborener Immundefekt .....	8
1.4 Fragestellung.....	9
2 Patienten, Material und Methoden.....	10
2.1 Studiendesign.....	10
2.2 Patientenkollektiv.....	11
2.2.1 Erworbener Immundefekt: Patienten mit HIV-Exposition oder HIV-Infektion .....	11
2.2.2 Angeborener Immundefekt.....	13
2.3 Immunphänotypisierung der iNKT- Zellen.....	14
2.4 Ermittlung der absoluten und relativen iNKT-Zellzahl .....	15
2.4 Statistische Analyse .....	15
3 Ergebnisse.....	17
3.1 Patienten mit HIV-Exposition.....	17
3.1.1 Absolute und relative iNKT-Zellzahl .....	18
3.1.2 iNKT-Zellzahlen und Alter .....	20
3.1.3 iNKT-Zellzahlen und Geschlecht .....	22
3.1.4 Differenzierung nach Phänotyp.....	23
3.2 Patienten mit HIV-Infektion.....	25
3.2.1 Absolute und relative iNKT-Zellzahl .....	27
3.2.2 Abhängigkeit iNKT- und CD4-Zellzahl .....	28
3.2.3 Abhängigkeit iNKT-Zellzahl und Viruslast .....	29

3.2.4 Kasuistik Extremgruppe .....	31
3.3 Patienten mit HIV-Exposition und HIV-Infektion im Vergleich .....	37
3.3.1 Untersuchung der iNKT-Zellvariabilität und der Einflussgröße infektiologischer Status .....	37
3.3.2 Analyse der absoluten iNKT-Niveaus im Gruppenvergleich und während des Beobachtungsverlaufs .....	40
3.4 Patienten mit DiGeorge-Syndrom.....	42
3.4.1 Fallbeschreibung iNKT-Werte bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom .....	42
3.5 Patienten mit Ataxia teleangiectasia.....	45
3.5.1 Fallbeschreibung iNKT-Werte bei Patienten mit Ataxia telangiectasia .....	46
4 Diskussion .....	49
5 Zusammenfassung .....	56
6 Literaturverzeichnis.....	57
7 Eidstattliche Versicherung .....	62
8 Danksagung.....	63

## Abkürzungsverzeichnis

<b>abs</b>	absolut
<b><math>\alpha</math>GalCer</b>	$\alpha$ -Galaktosylceramid
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AML</b>	akute myeloische Leukämie
<b>ART</b>	antiretrovirale Therapie
<b>ATM</b>	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>CCR</b>	<i>c-c chemokine receptor</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CVID</b>	<i>common variable immunodeficiency</i>
<b>DAIG</b>	Deutsche Aids Gesellschaft
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FACS</b>	<i>fluorescence-activated-cell-sorting</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>HAART</b>	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
<b>HBV</b>	Hepatitis B-Virus
<b>HCV</b>	Hepatitis C-Virus

<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz Virus
<b>HLA</b>	Humanes-Leukozyten-Antigen
<b>IgD</b>	Immunglobulin D
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INKT-Zelle</b>	Invariante Natürliche-Killer-T-Zelle
<b>ITK</b>	<i>interleukin-2-inducible-t-cell-kinase</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>mRNA</b>	mitochondriale Ribonukleinsäure
<b>MHC</b>	<i>major histocompatibility complex</i>
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>MYCN</b>	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i>
<b>ÖAIG</b>	Österreichische AIDS Gesellschaft
<b>SAP</b>	<i>slam-associated protein</i>
<b>Th1</b>	T-Helferzelle 1
<b>Th2</b>	T-Helferzelle 2
<b>TCR</b>	<i>t-cell-receptor</i>
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>VL</b>	Viruslast
<b>vs</b>	lat. "versus"- gegen
<b>XIAP</b>	<i>x-linked inhibitor of apoptosis</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Invariante NKT-Zellen

Humane invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen), auch Typ I-iNKT Zellen genannt, stellen innerhalb des Immunsystems des Menschen eine spezifische Untergruppe von T-Lymphozyten dar, da sie sowohl Eigenschaften von T-Zellen als auch von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) besitzen.<sup>1</sup> Als typisches Merkmal einer T-Zelle tragen die iNKT-Zellen auf der Zelloberfläche einen T-Zellrezeptor (TCR) zur Erkennung endogener und exogener Antigene.<sup>2</sup> Der TCR der CD3<sup>+</sup>-iNKT-Zellen unterscheidet sich jedoch strukturell vom TCR konventioneller T-Zellen, indem er aus einer invarianten V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18-Kette und einer wenig variablen  $\beta$ -Kette- die oft V $\beta$ 11 enthält- besteht.<sup>2</sup> Im Gegensatz zu klassischen T-Lymphozyten erfolgt die Aktivierung von iNKT-Zellen nicht durch Bindung klassischer MHC-Komplexe, die Peptid-Antigene präsentieren, sondern durch Bindung an das MHC-ähnliche Molekül, CD1d, das Glykolipid-Antigene präsentiert.<sup>3</sup> Das in diesem Zusammenhang bisher bekannteste Glykolipid ist  $\alpha$ -Galactosylceramid, das aufgrund seines wachstumshemmenden Effektes auf Tumorzellen als mögliches Mittel zur Krebstherapie von Bedeutung ist.<sup>4</sup> Die Aktivierung von iNKT-Zellen durch die Interaktion mit  $\alpha$ GalCer-CD1d-Komplexen führt zur raschen Freisetzung zahlreicher Zytokine, welche ihrerseits dendritische Zellen, NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen aktivieren.<sup>5</sup> Die besonders schnelle Zytokinausschüttung beruht auf dem Vorhandensein präformierter mRNA für entsprechende Zytokine, so dass die Immunantwort ohne vorherige Gentranskription erfolgen kann.<sup>5</sup> iNKT-Zellen besitzen somit gleichermaßen charakteristische Fähigkeiten sowohl von Zellen der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr. In der Fähigkeit zur MHC-unabhängigen Zytokinsekretion und der Ausstattung der Zelloberfläche mit einem TCR vereinen sie Eigenschaften angeborener und adaptiver Immunität.<sup>2</sup>

Funktionell können entsprechend der CD4-Expression grob zwei Untergruppen an iNKT-Zellen unterschieden werden. CD4<sup>+</sup>-NKT-Zellen sezernieren sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine, wohingegen CD4<sup>-</sup>-NKT-Zellen überwiegend Th1-Zytokine freisetzen.<sup>3,6,7</sup> Zahlreiche Studien verweisen auf die immunologisch wichtigen,

regulatorischen Eigenschaften von iNKT-Zellen angesichts der Tatsache, dass sie Zytokine der Th1- und Th2- Immunantwort gleichermaßen produzieren können. Mittlerweile konnte die Synthese einer Vielzahl von Zytokinen nachgewiesen werden. iNKT-Zellen sind somit in der Lage, je nach Stimulus, IFN- $\gamma$  und IL-4 sowie IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und GM-CSF zu sezernieren.<sup>2,3,8-11</sup> Dementsprechend vielfältig sind die Eigenschaften der iNKT-Zellpopulation, die ihnen im Bereich der Infektions- und Tumorabwehr sowie der Autoimmunität zugeschrieben werden.

Sowohl für bakterielle als auch für virale Infektionen lassen sich Zusammenhänge zwischen der T-Zellsubpopulation und dem Verlauf der jeweiligen Infektion herstellen.<sup>12-25</sup> Im Rahmen diverser bakterieller Infektionen spielt hierbei die Erkennung mikrobieller Antigene durch iNKT-Zellen eine entscheidende Rolle. Für Infektionen mit Gram- und LPS- negativen Bakterien wie Sphingomonas-, Ehrlichia- und Borrelia-Spezies konnten somit wirksame Mechanismen zum Schutz des Organismus vor entsprechenden Erregern nachgewiesen werden.<sup>12-14</sup> Ebenso werden iNKT-Zellen im Fall von Infektionen mit Salmonella, Pseudomonas aeruginosa und Chlamydia trachomatis eine protektive Rolle zugeschrieben.<sup>12,15,16</sup>

Der immunmodulatorische Einfluss von iNKT-Zellen auf das humane Immunsystem beim Vorliegen viraler Infektionen ist bislang nur ansatzweise nachvollzogen.<sup>17</sup> Während aktivierte iNKT-Zellen im murinen Organismus bei Infektion mit Influenzaviren eine effektive Immunantwort von NK- und CD8<sup>+</sup>-Zellen fördern sowie den Virustiter kontrollieren, sind sie im humanen Organismus für eine verbesserte antigenspezifische Immunantwort verantwortlich.<sup>18-20</sup> Im Modellversuch mit HBV-infizierten Mäusen lässt sich durch die Aktivierung von iNKT-Zellen eine verminderte Virusreplikationsrate beobachten. Prospektiv wird die therapeutische Aktivierung von iNKT-Zellen folglich als mögliche Therapieoption bei chronischer HBV-Infektion diskutiert.<sup>21</sup> Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion zeigte sich eine signifikant erhöhte Fähigkeit zur IL-13-Sekretion durch iNKT-Zellen. Ein Unterschied bezüglich der iNKT-Zellzahl im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe konnte parallel nicht festgestellt werden.<sup>22</sup>

Die kontinuierliche Schwächung des Immunsystems im Rahmen einer aktiven HIV-Infektion beruht primär auf der fortschreitenden Zerstörung konventioneller CD4<sup>+</sup>-T-

Zellen. Darüber hinaus sind iNKT-Zellen als CD1d restriktive-T-Lymphozyten-Subpopulation als mögliches Ziel des HI-Virus bekannt.<sup>23</sup> Die Hypothese, dass eine HIV-Infektion mit selektiv vermindertem Vorkommen an iNKT-Zellen einhergeht, konnte mittlerweile übereinstimmend verifiziert werden. Die rasche, signifikante Abnahme an iNKT-Zellen betrifft vor allem die CD4<sup>+</sup>-Subpopulation im Vergleich zur CD4<sup>-</sup>-Subpopulation.<sup>24,25</sup> Die höhere Anfälligkeit der CD4<sup>+</sup> iNKT-Zellen für das HI-Virus ist hierbei vermutlich in der vergleichsweise häufigeren Expression des HIV-Korezeptors CCR5 durch die CD4<sup>+</sup>-Subpopulation begründet.<sup>26,27</sup> Zusammenhänge zwischen der verminderten Anzahl an iNKT-Zellen und der Viruslast sowie der CD4-Zellzahl wurden mit Hilfe unterschiedlicher Studiendesigns untersucht. Sandberg et al. und Moutsier et al. kamen zu dem Ergebnis, dass bei HIV-infizierten Patienten, die sich mehrheitlich (80-83%) unter antiretroviraler Therapie befanden, inverse Korrelationen zwischen den CD4<sup>+</sup>V $\alpha$ 24<sup>+</sup>-NKT-Zellen und der Viruslast bzw. den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestehen.<sup>24,28</sup>

Eine frühe und effektive antiretrovirale Therapie bzw. HAART-Therapie bewirkt durch Hemmung der Virusreplikationsrate eine erhebliche Senkung der Viruslast sowie einen Anstieg der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.<sup>7</sup> Somit lassen sich sowohl die HIV-assoziierte Morbidität als auch Mortalität unter konsequenter antiretroviraler Therapie signifikant senken.<sup>7</sup> Die rasche Rekonstitution konventioneller T-Zellen innerhalb von zwei bis drei Monaten nach Beginn antiretroviraler Therapie beruht maßgeblich auf der Umverteilung von T-Lymphozyten aus lymphozytärem Gewebe der Peripherie in den Kreislauf.<sup>29,30</sup> Entsprechend vorliegender Studienergebnisse von van der Vliet et al., Moll et al. und Vasan et al. zum Verhalten konventioneller T-Zellen unter HAART-Therapie besteht großes Interesse an Erkenntnissen, die Aufschluss über den Effekt antiretroviraler Therapie auf die spezialisierte iNKT-Zellpopulation geben.<sup>31-33</sup>

In ersten Studien von van der Vliet et al. konnte diesbezüglich zunächst kein signifikanter Anstieg des infektionsbedingt verminderten iNKT-Zellniveaus bei konsequenter, antiretroviraler Therapie nachgewiesen werden.<sup>25</sup> Die detailliertere Folgestudie zeigte dagegen eine signifikante Zunahme von iNKT-Zellen zwei bis drei Monate nach Beginn der antiretroviralen Therapie, ähnlich der oben beschriebenen Rekonstitution konventioneller T-Lymphozyten.<sup>31</sup> Aktuellere Ergebnisse aus Forschungsansätzen mit ähnlicher Fragestellung legen lediglich eine Stabilisierung des iNKT-Zell-Levels als Auswirkung der HAART-Therapie nahe.<sup>33,34</sup> Neben der

genannten quantitativen Beeinträchtigung der iNKT-Zellpopulation wirkt sich eine HIV-Infektion trotz antiretroviraler Therapie ebenfalls maßgeblich negativ auf die qualitative iNKT-Funktion aus. Folglich erscheint die Mobilisation von iNKT-Zellen zur Therapie einer HIV-Infektion angesichts der mutmaßlich irreversiblen Schädigung durch das HI-Virus nicht erfolgversprechend.<sup>35</sup> Dennoch wird eine frühe, effektive antiretrovirale Therapie als sinnvoll erachtet, um die qualitative iNKT-Zellfunktion signifikant zu verbessern.<sup>33</sup> Die Kombinationstherapie bestehend aus IL-2 und effektiver antiretroviraler Medikation hat sich ferner als förderlich für die Wiederherstellung der iNKT-Zellimmunität erwiesen.<sup>32</sup>

Eine weitere Bedeutung wird den invarianten NKT-Zellen im Rahmen der Tumorabwehr zugeschrieben. Ishihara et al. zeigten bereits im Jahre 2000, dass aktivierte, humane iNKT-Zellen in vitro zur Induktion von Tumorlyse in der Lage sind.<sup>36</sup> In vivo, bei Patienten mit Prostatakarzinom und Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren im Vergleich zu gesunden Probanden, wurden durch Tahir et al. und Giaccone et al., verminderte iNKT-Zellzahlen gemessen.<sup>37,38</sup> Ebenso werden niedrige iNKT-Zellzahlen im peripheren Blut bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer niedrigeren Gesamtüberlebensrate assoziiert. Folglich soll eine niedrige iNKT-Zellzahl bei Diagnosestellung als unabhängige Variable für einen prognostisch ungünstigen Verlauf einer AML verwendet werden können.<sup>39</sup>

Auch im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen scheinen Typ-1-iNKT-Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Vor allem Untersuchungen zu ihrer Funktion im Rahmen von Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Asthma bronchiale unterstreichen ihre Eigenschaften sowohl als Regulations- als auch als Effektorzelle im Immunsystem.<sup>40,41</sup> Ausgehend von den Beobachtungen niedrigerer iNKT-Zellzahlen im murinen Organismus bei Vorliegen eines Typ-1-Diabetes sowie erhöhter iNKT-Zellzahlen als protektiver Faktor für das Auftreten der Erkrankung, wird iNKT-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung innovativer Therapiemethoden gegen Typ-1-Diabetes zugeschrieben.<sup>42</sup>

Obwohl die Rolle von iNKT-Zellen im Rahmen menschlicher, immunologischer Dysregulation weiterhin intensiv recherchiert und teils kontrovers diskutiert wird, bleiben einige Fragestellungen weitestgehend ungeklärt. Folglich ist die Datenlage

auch in Bezug auf den Einfluss von Alter, Geschlecht, ethnischer Herkunft und Umwelteinflüssen auf diese spezifische T-Zellsubpopulation bisher lückenhaft.<sup>43</sup>

## 1.2 iNKT-Zell-Zahlen

Die Tatsache, dass die Anzahl an invarianten NKT-Zellen im peripheren Blut des Menschen gleichzeitig sehr gering wie auch hoch variabel ist, erschwert die Forschung an dieser T-Zellsubpopulation.<sup>6,44-46</sup> Zudem lieferte der wissenschaftliche Ansatz, humane iNKT-Zellen spezifisch per Durchflusszytometrie zu erfassen und somit ihre Anzahl im peripheren Blut zu bestimmen, im Laufe der Jahre unterschiedliche Detektionsmethoden. Folglich sind die bisher vorliegenden Studienergebnisse zur Anzahl invarianter NKT-Zellen limitiert vergleichbar.

Bisher nutzte man zur Identifizierung von iNKT-Zellen klassischerweise eine Kombination zweier monoklonaler Antikörper gegen  $V\alpha 24$  und  $V\beta 11$ .<sup>47</sup> Im Laufe der Zeit wurde diese Vorgehensweise jedoch durch eine spezifischere Methode abgelöst, so dass sich zur Färbung die Eigenschaft der iNKT-Zellen der CD1d-Tetramer-vermittelten Erkennung von Glykolipidantigenen wie z.B.  $\alpha$ GalCer zu Nutze gemacht wurde.<sup>3,48,49</sup> Allerdings konnte auch auf anderen, CD161 exprimierenden T-Zellsubpopulationen mit vielfältigen Fähigkeiten, eine CD1d-Restriktion festgestellt werden.<sup>50,51</sup> Somit wird die CD1d-Färbemethode zur Evaluierung von iNKT-Zellzahlen mittlerweile als nicht ausreichend spezifisch erachtet. Folglich wurde sie von der Färbemethode mittels monoklonalem Antikörper gegen 6B11, die sich als hochspezifisch etabliert hat, abgelöst. Der 6B11-Klon ist spezifisch für die CDR3-Schleife der  $V\alpha 24J\alpha 18$ -Kette des T-Zell-Rezeptors humaner iNKT-Zellen und ermöglicht somit in Kombination mit anti- $V\alpha 24$ , anti- $V\beta 11$  und anti-CD3 eine hoch sensitive und spezifische iNKT-Zell-Detektion.<sup>43,52</sup>

Mit Hilfe oben genannter, spezifischer Färbemethoden konnten Untersuchungen am gesunden Erwachsenen Erkenntnisse dazu liefern, inwiefern das Alter, das Geschlecht oder die ethnische Herkunft Einfluss auf die Häufigkeit von iNKT-Zellen besitzen. Das Nachlassen der Leistungsfähigkeit des Immunsystems im Alter, die sogenannte Immunoseneszenz geht bekanntermaßen unter anderem mit einem Rückgang der Leukozytenzahl und niedrigen absoluten Zahlen konventioneller T-Zellen einher. In entsprechenden Studien konnten zudem unabhängig voneinander

auch prozentual niedrigere Zahlen von  $V\alpha^{24+}V\beta^{11+}$ -iNKT-Zellen im Alter nachgewiesen werden.<sup>53-55</sup> Während innerhalb bekannter gesunder Populationen allgemein eine hohe Variabilität bezüglich der iNKT-Zellzahl herrscht, wird das Vorhandensein geschlechterspezifischer Unterschiede weiterhin kontrovers diskutiert.<sup>46,56</sup> Die Tendenz zu erhöhten iNKT-Zellzahlen bei weiblichen Studienteilnehmern konnte nur in einzelnen Studien beobachtet werden.<sup>56,57</sup> Der Einfluss ethnischer Faktoren auf konventionelle Lymphozytenpopulationen ist einstimmig belegt.<sup>58,59</sup> In Analogie hierzu ist der Zusammenhang zwischen der Herkunft und gemessenen iNKT-Zellzahlen weiterhin Gegenstand der Forschung. Beispielsweise zeigen Untersuchungen an gesunden iranischen Erwachsenen für diese Studienpopulation im Vergleich zu bisher etablierten Werte höhere iNKT-Zellzahlen.<sup>43,46,54</sup> Während die Anzahl humaner invarianter NKT-Zellzahlen innerhalb einer Population sehr variabel ist, verhalten sich die iNKT-Werte einzelner Individuen über einen längeren Zeitraum mehrheitlich stabil.<sup>43,60,61</sup>

### **1.3 Invariante NKT- Zellen bei Kindern**

Die Datenlage zu Fragestellungen rund um die Thematik iNKT-Zellen bei Kindern ist begrenzt.

Bei pädiatrischen Patienten mit metastasiertem Neuroblastom soll ein Ursache-Wirkung-Beziehung zwischen dem Fehlen von iNKT-Zellen und übermäßiger Expression des prognostisch relevanten Tumoronkogens *MYCN* in den Tumorzellen bestehen.<sup>62</sup> Des Weiteren wird die Rekonstitution von iNKT-Zellen nach HLA-haploidentischer, hämatopoetischer Stammzelltransplantation im Falle unterschiedlicher maligner, hämatologischer Tumore mit der Kontrolle leukämischer Rezidive assoziiert.<sup>63</sup> Folglich könnte die Bestimmung der iNKT-Zell-Rekonstitution als therapeutischer Marker nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation eingesetzt werden. Darüber hinaus wäre eine therapeutische iNKT-Zell-Gabe als Präventivmaßnahme zur Vermeidung eines Leukämierrezidivs denkbar.<sup>63</sup> Bei Kindern mit diagnostiziertem Asthma bronchiale, die eine Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben aufweisen, wurde ein signifikant verringerter Quotient aus iNKT-Zellen und  $CD4^+$ -NKT-Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gemessen.<sup>64</sup>

Basierend auf umfangreichen Untersuchungen an gesunden Kindern konnten 2011 erstmalig Referenzwerte für iNKT-Zellen bei Kindern kaukasischer Herkunft etabliert werden.<sup>45</sup> Hierbei wurde sowohl die Färbemethode mittels CD3<sup>+</sup>/V $\alpha$ 24<sup>+</sup>/V $\beta$ 11<sup>+</sup>- als auch mittels CD3<sup>+</sup>/6B11<sup>+</sup>- AK verwendet, um die iNKT-Zellen durchflusszytometrisch zu erfassen. Die Anzahl der gemessenen iNKT-Zellen war geschlechts- und altersunabhängig. Außerdem konnte jedoch gleichzeitig eine sehr hohe Bandbreite an gemessenen iNKT-Zellen nachgewiesen werden.<sup>45</sup>

### **1.3.1 Invariante NKT-Zellen bei Kindern mit HIV-Infektion**

Im Rahmen einer aktiven HIV-Infektion kommt es bei erwachsenen Patienten durch verschiedene Mechanismen zu einer deutlichen Reduktion der im peripheren Blut messbaren iNKT-Zellen.<sup>23,25,28</sup> Die selektive iNKT-Zelldepletion konnte an einer Kohorte von 57, durch vertikale Transmission mit HIV infizierten Kindern, erstmalig im Jahr 2002 auch für pädiatrische Patienten nachgewiesen werden.<sup>24</sup> Die absoluten iNKT-Zellzahlen waren bei bestehender unkontrollierter Virämie und deutlicher Abnahme der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, im Vergleich zur pädiatrischen und erwachsenen Kontrollgruppe signifikant niedriger.<sup>24</sup> Ferner liefert die Studie von Sandberg et al. erste Hinweise auf Zusammenhänge zwischen gemessenem iNKT-Zellniveau, Viruslast und CD4-Zellzahl. Sowohl die absolute iNKT-Zellzahl als auch die gesamte Zahl aller CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zeigte eine umgekehrte Korrelation zur Viruslast. Die Abnahme der iNKT-Zellzahl wiederum korrelierte stark mit der Abnahme CD4<sup>+</sup>-Zellen.<sup>24</sup> Eine Studie aus dem Jahr 2014 mit 31 pädiatrischen Patienten im Alter von vier Monaten bis zwei Jahren ohne antiretrovirale Therapie zur Fragestellung, inwiefern die iNKT-Zellpopulation im Rahmen einer aktiven HIV-Infektion affiziert wird, liefert ähnliche Ergebnisse.<sup>65</sup> Die erhebliche Verminderung der iNKT-Zellzahlen in der Frühphase der HIV-Infektion sowie die Korrelation zwischen iNKT-Zellzahl und CD4-Zellzahl konnte übereinstimmend mit o.g. Ergebnissen nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen iNKT-Zellzahl und Viruslast konnte hingegen nicht hergestellt werden.<sup>65</sup>

### 1.3.2 Invariante NKT-Zellen und angeborener Immundefekt

Auswirkungen angeborener Defekte des lymphozytären Systems auf die iNKT-Zellpopulation sind bisher wenig untersucht. Bei drei seltenen genetischen Defekten (SAP-, XIAP- und ITK-Defizienz), die zur Entwicklung EBV-abhängiger lymphoproliferativer Syndrome prädisponieren, konnten fehlende oder niedrigere iNKT-Zellzahlen gemessen werden.<sup>66,67</sup> Folglich scheint die spezialisierte T-Lymphozytensubpopulation eine entscheidende Rolle bezüglich pathophysiologischer Zusammenhänge der oben genannten Erkrankungen zu spielen. Es wird vermutet, dass die Anfälligkeit für EBV-abhängige, lymphoproliferative Syndrome auf dem vorliegenden Defekt invarianter, natürlicher Killer-T-Zellen beruht.<sup>66</sup>

Basierend auf Untersuchungen an erwachsenen Patienten mit angeborenem Immundefekt in Form eines *common variable immunodeficiency (CVID)*, wird auch bei Kindern im Rahmen dieser Immundefekterkrankung ein verminderter Anteil an iNKT-Zellen mit der pathophysiologisch relevanten Fehlfunktion der Memory-B-Zellen in Verbindung gebracht.<sup>68</sup> Zum Einfluss weiterer, angeborener Immundefekte bei Kindern auf die iNKT-Zellpopulation liegen bislang keine Daten vor.

Beim DiGeorge-Syndrom handelt es sich um eine Ausprägung des Mikrodeletionssyndroms 22q11. Die Inzidenz dieses angeborenen Immundefekts liegt bei 1:4000. Er beruht auf einer fehlerhaften Embryonalentwicklung der 3. und 4. Schlundtasche. Daraus resultieren charakteristische Fehlbildungen wie Herzfehler, Thymushypoplasie und Hypoparathyreoidismus.<sup>69-71</sup> Das Ausmaß der Thymushypoplasie bestimmt die Schwere des daraus resultierenden, immunologischen Defizits. Bei den betroffenen Patienten sind - je nach Schweregrad des Immundefekts - eine leicht bis stark beeinträchtigte T-Zellfunktion bzw. leicht verminderte T-Zellzahlen bis hin zum völligen Fehlen von T-Zellen zu beobachten.<sup>72-74</sup> Erkenntnisse, inwiefern im Rahmen eines DiGeorge-Syndroms die iNKT-Zellpopulation in ihrer Anzahl bzw. Funktion beeinflusst wird, existieren bislang nicht.

Ataxia teleangiectasia ist eine seltene, autosomal rezessive Erkrankung mit einer Inzidenz von 1:40.000-100.000, der ein Defekt des ATM-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 11q22-23 zugrunde liegt.<sup>75-78</sup> Das ATM-Protein besitzt als Proteinkinase funktionell einen hohen Stellenwert für die DNA-Reparatur, die

Kontrolle der Zellteilung sowie die Einleitung der Apoptose.<sup>79-81</sup> Die gestörte Funktion der ATM-Kinase hat bei den betroffenen Patienten typischerweise eine progressive Neurodegeneration, Teleangiektasien an Augen und Haut sowie einen Immundefekt sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene zur Folge.<sup>82-89</sup> Störungen der humoralen Immunität zeigen sich vor allem in Form von IgA- und IgG-Subklassenmangel und verminderten B-Zellzahlen, Störungen der zellulären Immunität in Form von verminderten CD4<sup>+</sup>- Zellen durch eine gestörte T-Zellreifung.<sup>88,90-93</sup> Mögliche Auswirkungen des Immundefekts im Rahmen einer Ataxia teleangiectasia auf die iNKT-Zellzahl sind zur Zeit nicht bekannt.

## 1.4 Fragestellung

Während vergleichsweise zahlreiche Studienergebnisse über mögliche immunmodulatorische Funktionen von iNKT-Zellen im murinen Modell oder zum Teil auch beim Erwachsenen in vitro und in vivo vorliegen, gibt es lediglich vereinzelt fundierte Erkenntnisse in Bezug auf die Aufgabe und Funktionsweise von iNKT-Zellen bei Kindern. Gleiches gilt für repräsentative Ergebnisse, die den qualitativen und quantitativen Stellenwert von iNKT-Zellen im kindlichen Immunsystem eindeutig verifizieren können.

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst die iNKT-Zellzahlen bei Kindern mit bekannter HIV-Infektion, HIV-Exposition und angeborenem Immundefekt- wie Ataxia teleangiectatica bzw. Louis-Bar-Syndrom und DiGeorge-Syndrom- ermittelt und den bisher etablierten Normwerten gesunder Kinder gegenübergestellt werden. Zu diesem Zweck konnten die in der Ambulanz für pädiatrische Immunologie und Rheumatologie der Uniklinik Düsseldorf erhobenen iNKT-Zellzahlen von insgesamt 92 HIV-infizierten und HIV-exponierten Kindern sowie von neun Kindern mit angeborenem Immundefekt genutzt werden. Ein weiteres Ziel dieser retrospektiven Studie besteht darin, den Einfluss von Parametern wie CD4-Zellzahl, Viruslast, antiretroviraler Medikation oder Phänotyp auf das iNKT-Zellniveau HIV-infizierter Kinder zu analysieren. Die Kohorte der HIV-exponierten Kinder wurde im Hinblick auf alters- und phänotyp- spezifische Unterschiede bezüglich der iNKT-Zellzahl untersucht. Für das Kollektiv der Patienten mit angeborenem Immundefekt wird die Beschreibung des iNKT-Levels in Abhängigkeit von weiteren spezifischen T-Zell-Subpopulationen und unter dem Einfluss von möglichen Infektionen angestrebt.

## **2 Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die vorliegende Studie basiert auf der retrospektiven Auswertung von Patientendaten, die durch eine umfangreiche Aktenanalyse gewonnen wurden. Alle Patienten befanden sich im Beobachtungszeitraum April 2009 bis Februar 2011 dauerhaft oder vorübergehend in ärztlicher Betreuung durch die Ambulanz für Immunologie und Rheumatologie der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Bei den erhobenen Daten handelt es sich sowohl um Blutwerte (wie z.B. Lymphozytenzahl, T-Zell-Zahl, iNKT-Zellzahl, Viruslast, CRP) als auch um klinische Parameter (z.B. Alter, Erkrankungsstadium, Herkunft, klinischer Infekt, Pharmakotherapie, Zeitpunkt des Therapiestarts), die jeweils im Rahmen der routinemäßigen Untersuchung in der immunologischen Ambulanz, erhoben wurden. Die Gesamtzahl der vorliegenden Untersuchungsergebnisse innerhalb der einzelnen Studiengruppen begründet sich auf zeitlich nicht standardisierten Mehrfachmessungen pro Patient. T1 markiert jeweils den Zeitpunkt, an dem erstmalig oben genannte Blutwerte gemessen wurden. Der Abstand zu den gegebenenfalls vorhandenen Folgemessungen (Tx) resultiert aus individuell angeordneten Blutentnahmen entsprechend dem klinischen Verlauf und unterscheidet sich folglich von Patient zu Patient.

Bei der zuständigen Ethikkommission wurde fristgerecht ein Ethikvotum beantragt, da personenbezogene Daten ausgewertet wurden. Nach Prüfung des Antrags durch die Ethikkommission wurde ein positives Ethikvotum mit der Studiennummer 3563 erteilt.

## 2.2 Patientenkollektiv

### 2.2.1 Erworbener Immundefekt: Patienten mit HIV-Exposition oder HIV-Infektion

In das Kollektiv HIV-exponierter Patienten konnten 45 Kinder im Alter von sechs Tagen bis drei Jahren eingeschlossen werden. Hierbei handelt es sich um 21 männliche und 24 weibliche Patienten. Die Aktenrecherche lieferte insgesamt 116 Untersuchungszeitpunkte, an denen durch laborchemische Analysen neben routinemäßig erhobenen Blutwerten die iNKT-Zellzahl erfasst wurde. Die Anzahl der Messungen pro Patient schwankt mit einem (T1) bis sechs (T6) Messzeitpunkten deutlich.

Die HIV-Exposition beruhte bei allen Patienten auf einer während der Schwangerschaft und Geburt bestehenden maternalen HIV-Infektion. Da das HIV-Transmissionsrisiko beim überwiegenden Teil der Patienten entsprechend den DAIG- und ÖAIG- Leitlinien als niedrig eingestuft wurde, erhielten 84,4 Prozent (38 von 45) eine Postexpositionsprophylaxe mit Zidovudin. Bei fünf Kindern lag ein erhöhtes Transmissionsrisiko vor, so dass eine eskalierte Postexpositionsprophylaxe mit einer zweifachen (Zidovudin und Lamivudin) bzw. dreifachen (Zidovudin, Lamivudin und Nevirapin) Prophylaxe verabreicht wurde. Bei zwei Kindern lagen keine Informationen zur Art der Postexpositionsprophylaxe vor. Standardgerecht befanden sich alle Patienten mindestens bis zu einem Alter von 15-18 Monaten in ambulanter Betreuung, um das Verschwinden des mütterlichen HIV-Antikörpers im Blut des exponierten Kindes zu registrieren und somit eine HIV-Infektion sicher ausschließen zu können.<sup>94</sup> Bei allen 45 Kindern konnte eine HIV-Transmission ausgeschlossen werden.

Das Kollektiv der HIV-infizierten Patienten umfasst insgesamt 47 Patienten - davon 22 männliche und 25 weibliche - im Alter von 8 Monaten bis 18 Jahren. Bei allen lag eine vertikale Infektion vor. Im oben genannten Beobachtungszeitraum konnten für diese Patientengruppe insgesamt 326 Untersuchungszeitpunkte erfasst werden. Die Anzahl der Messzeitpunkte pro Patient schwankte individuell stark von einer (T1) bis hin zu 14 (T14) Messungen.

Mit Ausnahme von vier Patienten befanden sich alle Patienten, entsprechend der Leitlinien der Deutschen und der Österreichischen AIDS-Gesellschaft, unter

antiretroviraler Kombinationstherapie. Hierbei wurde die antiretrovirale Pharmakotherapie bei 41 Patienten bereits während des gesamten Untersuchungszeitraums konstant durchgeführt, während bei zwei Patienten die antiretrovirale Therapie erst innerhalb des Untersuchungszeitraums angesetzt wurde.

Für beide oben genannte Patientenkollektive wurden folgende Aspekte für jeden Messzeitpunkt im Rahmen der retrospektiven Auswertung tabellarisch erfasst:

- Geburtsdatum
- Datum des Untersuchungszeitpunkts
- Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung
- Geschlecht
- Herkunft und Phänotyp
- Viruslast zum Zeitpunkt der Untersuchung (in RNA-Kopien/ml Blut, untere Nachweisgrenze 40 Kopien/ml)
- antiretrovirale Medikation
- klinischer Infekt
- CRP
- absolute Leukozytenzahl
- absolute und relative Lymphozytenzahl
- absolute und relative CD3<sup>+</sup>-T-Zellzahl
- absolute und relative CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl
- relative iNKT-Zellzahl (in %, in Bezug auf Lymphozyten pro  $\mu$ l bzw. pro ml)
- absolute iNKT-Zellzahl (pro ml Blut)
- relative iNKT-Zellzahl (in %, in Bezug auf CD3<sup>+</sup>-T-Zellen pro  $\mu$ l)

Die genannten Parameter wurden für das Kollektiv der HIV-infizierten Patienten um folgende Daten ergänzt:

- Zeitpunkt des Therapiestarts
- CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Zellzahl bei Therapiestart
- Erkrankungsstadium nach CDC-Klassifikation<sup>95</sup>

## 2.2.2 Angeborener Immundefekt

### Patienten mit DiGeorge-Syndrom

In das Kollektiv der pädiatrischen Patienten mit DiGeorge-Syndrom, die sich im genannten Beobachtungszeitraum in Behandlung der Ambulanz für Immunologie und Rheumatologie der Universitätskinderklinik Düsseldorf befanden, konnten insgesamt sechs Patienten im Alter von drei Monaten bis 16 Jahren eingeschlossen werden. Hierbei handelte es sich um eine weibliche Patientin sowie um fünf männliche Patienten. Bis auf einen Patienten nordafrikanischen Phänotyps, waren fünf von sechs Patienten kaukasischen Phänotyps und gleichzeitig deutscher Herkunft. Für die genannte Patientengruppe lagen Messwerte und klinische Parameter zu insgesamt 18 Beobachtungszeitpunkten vor. Folgende patientenbezogene Daten wurden im Rahmen der Aktenrecherche gewonnen und tabellarisch erfasst:

- Geburtsdatum
- Datum des Untersuchungszeitpunkt
- Alter
- Geschlecht
- Herkunft
- klinischer Infekt
- CRP
- absolute Leukozytenzahl
- absolute und relative Lymphozytenzahl
- absolute und relative CD3<sup>+</sup>-T-Zellzahl
- absolute und relative CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl
- absolute und relative CD45RA<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl
- relative iNKT-Zellzahl (in %, in Bezug auf Lymphozyten pro µl bzw. pro ml)
- absolute iNKT-Zellzahl (pro ml Blut)
- relative iNKT-Zellzahl (in %, in Bezug auf CD3<sup>+</sup>-T-Zellen pro µl)

### Patienten mit Ataxia teleangiectasia

Unter den sieben Patienten mit Ataxia teleangiectasia, die zum Zeitpunkt des Studienbeginns durch die Ambulanz für Immunologie und Rheumatologie der Universitätskinderklinik Düsseldorf betreut wurden, befanden sich drei Patienten,

deren iNKT-Werte durchflusszytometrisch erfasst wurden. Dementsprechend konnten die erhobenen Daten von drei Patienten zur Analyse genutzt werden. Hierbei handelte es sich um zwei männliche Patienten im Alter von 22 Monaten und sieben Jahren sowie um eine weibliche Patientin im Alter von 16 Jahren - alle kaukasischen Phänotyps. Insgesamt wurden für diese Patientengruppe fünf Untersuchungszeitpunkte registriert, an denen Messungen der iNKT-Werte durchgeführt wurden. Bei zwei Patienten lagen Daten an jeweils zwei Messzeitpunkten (T1 und T2) vor. Entsprechend des Patientenkollektivs mit DiGeorge-Syndrom wurden auch für diese Patientengruppe die oben genannten Laborwerte um klinische Parameter ergänzt und in einer Tabelle zusammengefasst.

### **2.3 Immunphänotypisierung der iNKT- Zellen**

Alle Blutproben wurden mithilfe von EDTA antikoaguliert und innerhalb von 24 Stunden im Immun-Labor der Klinik für Kinder-Onkologie-, -Hämatologie und Klinische Immunologie ausgewertet. Hier wurde ein Differenzialblutbild mit Leukozyten- und Lymphozytenzahl angefertigt. Darüber hinaus wurden die Lymphozytensubpopulationen mittels eines FACS-Canto-Geräts (Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland) durchflusszytometrisch untersucht. Die Färbung der spezifischen Populationen erfolgte mit Hilfe Fluoreszin-Isothiocyanat-, Phycoerythrin- und Peridinin-Chlorophyll-Protein markierter monoklonaler Antikörper entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers. Antikörperklone gegen folgende Epitope wurden verwendet: CD3 (Fitc 345763 BD), CD4 (PE 345769), anti Human iNKT (6B11,BD), CD45RA (Fitc 335039 BD), CD45RO (PE 347967 BD), CD4 (Percep 345770 BE). Für alle Färbemethoden wurden adäquate an den jeweiligen Isotypen angepasste Kontrollen eingeschlossen. Aufgrund der sehr niedrigen Dichte an iNKT-Zellen im peripheren Blut wurden  $1-5 \times 10^5$  Zellen im Lymphozytenfenster ausgewertet. Die Bestimmung der iNKT-Zellzahl erfolgte als prozentualer bzw. relativer Anteil der CD3<sup>+</sup>/6B11<sup>+</sup> Zellen an den Gesamtlymphozyten.

## 2.4 Ermittlung der absoluten und relativen iNKT-Zellzahl

Aus dem durchflusszytometrisch bestimmten, relativen Anteil der iNKT-Zellen an den Gesamtlymphozyten (iNKT in % Lymphozyten) wurden ergänzend folgende zwei Parameter berechnet:

Die absolute iNKT-Zellzahl/ml Blut (iNKT/ml) als:

$$iNKT \text{ (in \% Lymphozyten)} \times \text{absolute Lymphozytenzahl}/\mu\text{l} \times 1000$$

sowie die relative iNKT-Zellzahl bezogen auf die Gesamtzahl der T-Zellen (iNKT in % CD3)<sup>+</sup> als:

$$(iNKT/ml \times 0,001 : \text{absolute CD3}^+ \text{-Zellzahl}/\mu\text{l}) \times 100.$$

## 2.4 Statistische Analyse

Die Datenerhebung erfolgte anhand von archivierten Patientenakten. Diese enthielten die oben genannten Blutwerte und klinischen Parameter der Patienten der Düsseldorfer Kinderklinik für Immunologie im Zeitraum von April 2009 bis Februar 2011. Die Blutwerte und klinischen Parameter wurden zunächst in einer Excel-Tabelle erfasst und jedem Patienten individuell zugeordnet. Zusätzlich wurden der jeweilige zeitliche Abstand zum Therapiestart, das Alter zum Bestimmungszeitpunkt und die absolute iNKT-Zell-Zahl pro ml Blut sowie die relative iNKT-Zellzahl in Prozent CD3 berechnet und der Excel-Tabelle hinzugefügt.

Die in der FACS-Analyse erhobenen iNKT-Werte mit dem Wert Null (2% aller gemessenen Werte), wurden fachlich diskutiert und angesichts des repräsentativen Stellenwertes in die statistische Analyse miteinbezogen.

Die weiterführende statistische Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Software SPSS Version 20 (SPSS Inc.IBM, Armonk, USA) für Microsoft Windows. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Als statistisch signifikant wurde ein Signifikanzniveau von  $p < .05$  angesehen.

Zur Auswertung kamen folgende statistische Test zur Anwendung:

T-Test

Für den Vergleich von zwei unverbundenen Stichproben

Chi-Quadrat-Test

Zur Testung auf Unabhängigkeit zwischen zwei Merkmalen

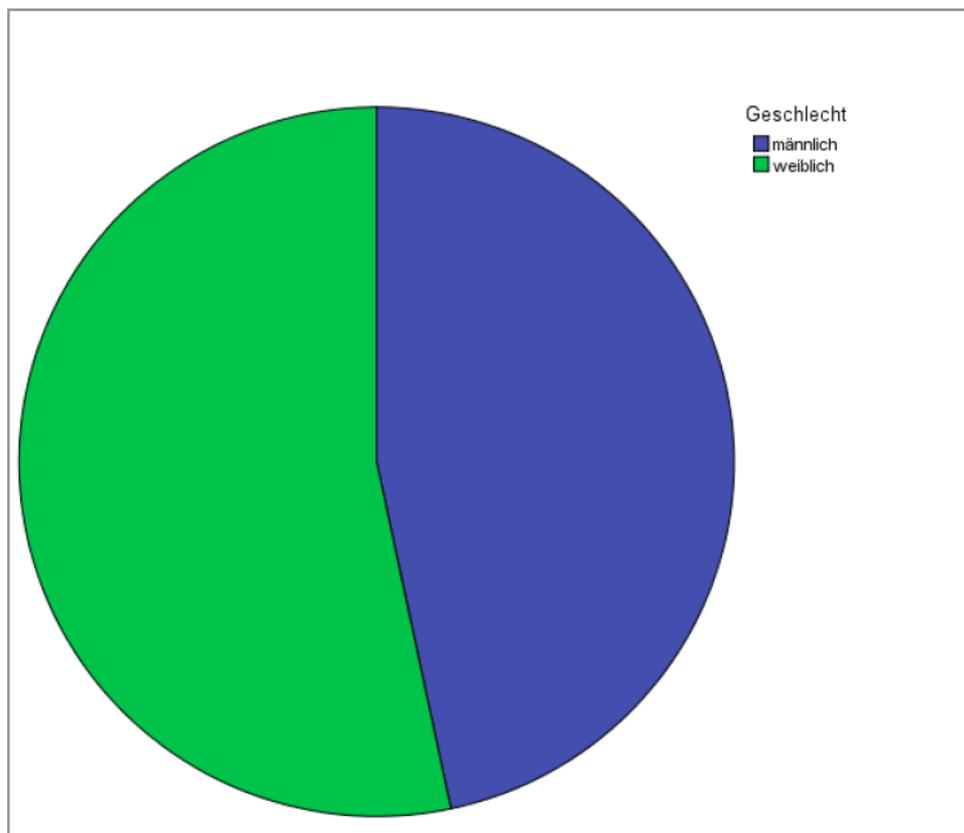
Diagramme und Tabellen wurden unter Verwendung von Excel und SPSS erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patienten mit HIV-Exposition

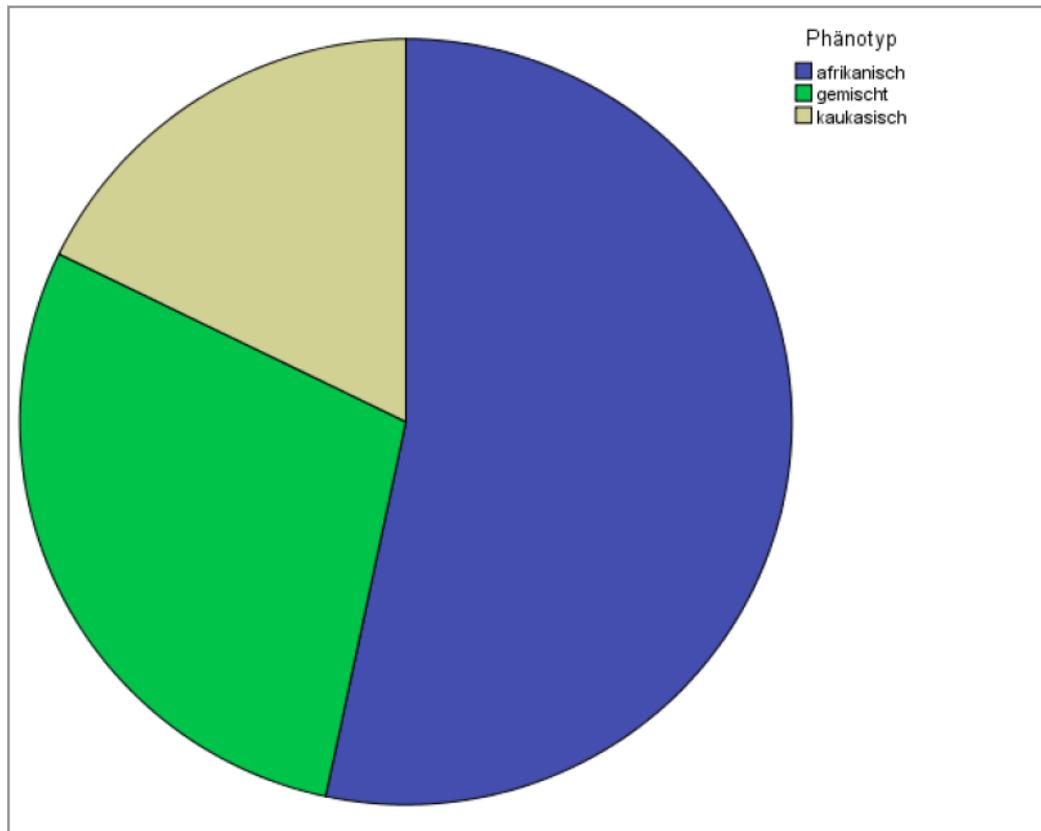
Das Alter der 45 Patienten schwankt von 0,2 Monaten bis 36,2 Monaten, der Altersmedian liegt bei 0,8 Monaten. 47% der Kinder sind weiblichen, 53% männlichen Geschlechts.

**Abbildung 1: Patienten mit HIV-Exposition, Geschlechterverteilung**



Das Patientenkollektiv kann entsprechend des Phänotyps in drei Gruppen unterteilt werden. Demnach handelt es sich bei 53% der Kinder um einen afrikanischen, bei 29% der Kinder um einen gemischten und bei 18% der Kinder um einen kaukasischen Phänotyp.

**Abbildung 2: Patienten mit HIV-Exposition, Differenzierung nach Phänotyp**



### **3.1.1 Absolute und relative iNKT-Zellzahl**

Anhand des Kollektivs HIV-exponierter Kinder (N=45) konnten unter Berücksichtigung der jeweils zum Erhebungszeitpunkt T1 durchgeführten laborchemischen Untersuchung folgende iNKT-Zellniveaus erhoben werden: Die absolute iNKT-Zellzahl schwankt zwischen 975 und 16497 Zellen pro ml Blut (MW:  $4574 \pm 3750$ ). Der Median liegt bei 3354 iNKT-Zellen pro ml Blut. Die relative iNKT-Zellzahl liegt zwischen 0,024 und 0,492 % an  $CD3^+$ -T-Zellen (MW:  $0,132 \pm 0,104$ ), der Median bei 0,095 % an  $CD3^+$ -T-Zellen.

**Tabelle 1: iNKT-Zellzahl bei HIV-exponierten Kindern**

	iNKT absolut (pro ml)	iNKT relativ (in %CD3)
N	45	45
Median	3354	0,095
Mittelwert	4574	0,132
Standardabweichung	3750	,104
Minimum	975	,024
Maximum	16497	,492

Die relativen Zahlen invarianter NKT-Zellen in % an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen bei Kindern mit HIV-Exposition befinden sich - verglichen mit den 2011 durch Bienemann et al. erhobenen Werten - insgesamt auf ähnlichem Messniveau. Eine Tendenz zu niedrigeren iNKT-Zellzahlen bei der HIV-exponierten Population zeigt sich anhand des Mittelwerts und Medians, die ca.18% niedriger liegen als bei der Population ohne Viruskontakt.<sup>45</sup>

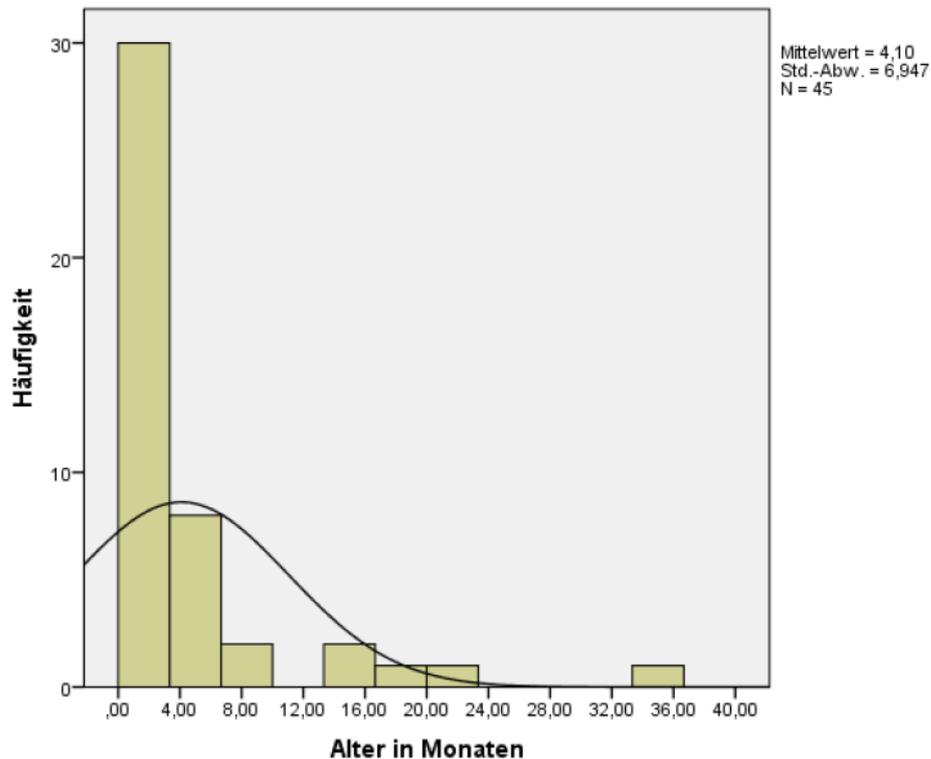
Betrachtet man die absoluten Zahlen invarianter NKT-Zellen pro ml bei HIV-exponierten Kindern, liegen diese über den durch Bienemann et al. publizierten Werten. Median und Mittelwert der absoluten iNKT-Zellzahl innerhalb der HIV-exponierten Population, liegen um 20% höher als bei der Population ohne Virusexposition.<sup>45</sup>

Diese Beobachtungen sind bei vergleichbarer Größe der beiden genannten Studiengruppen vermutlich auf die Unterschiede innerhalb der Altersstruktur und der damit verbundenen T-Zell- bzw. Gesamtlymphozytenzahl zurückzuführen. Bei den Patienten der vorliegenden Studie handelt es sich um deutlich jüngere Kinder (Altersmedian: 0,8 Monate) als jene, deren iNKT-Werte durch Bienemann et al. ausgewertet wurden (Altersmedian: 10,5 Jahre). Für die jüngeren Kinder sind typischerweise hohe T-Zellzahlen anzunehmen, welche als Divisor in die Ermittlung der relativen iNKT-Zellzahl in %CD3<sup>+</sup> eingehen und somit die oben genannte Abweichung nach unten erklären lassen. Als möglicher Grund für die beobachtete Abweichung der absoluten iNKT-Zellzahl vom Normbereich bei Patienten mit HIV-Exposition können vergleichsweise hohe Gesamtlymphozytenzahlen vermutet werden, die als ein Faktor in die Berechnung der absoluten iNKT-Zellzahl eingehen.

### 3.1.2 INKT-Zellzahlen und Alter

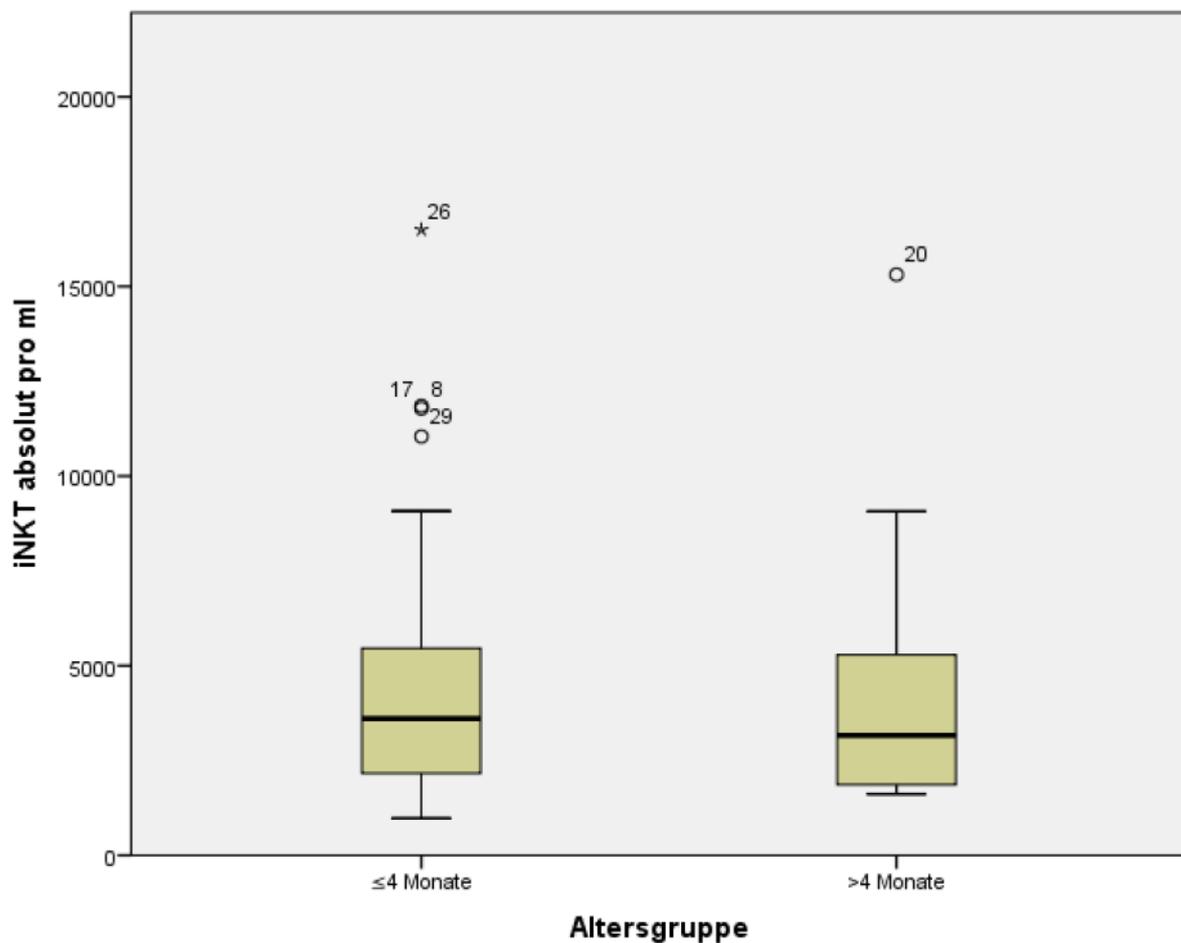
Das mittlere Alter HIV-exponierter Kinder am Erhebungszeitpunkt (T1) beträgt 4,1 Monate. 71% der Kinder sind zu diesem Zeitpunkt jünger als vier Monate alt, 29% der Kinder sind älter als vier Monate.

**Abbildung 3: Altersverteilung Patienten mit HIV-Exposition**



Um den Einfluss des Alters auf die iNKT-Zellzahl zu untersuchen, wurde die Gesamtkohorte HIV-exponierter Kinder in zwei Gruppen unterteilt. Dementsprechend konnten 32 Kinder der Gruppe Lebensalter  $\leq 4$  Monate und 13 Kinder der Gruppe Lebensalter  $> 4$  Monate zugeordnet werden (siehe Abbildung 4).

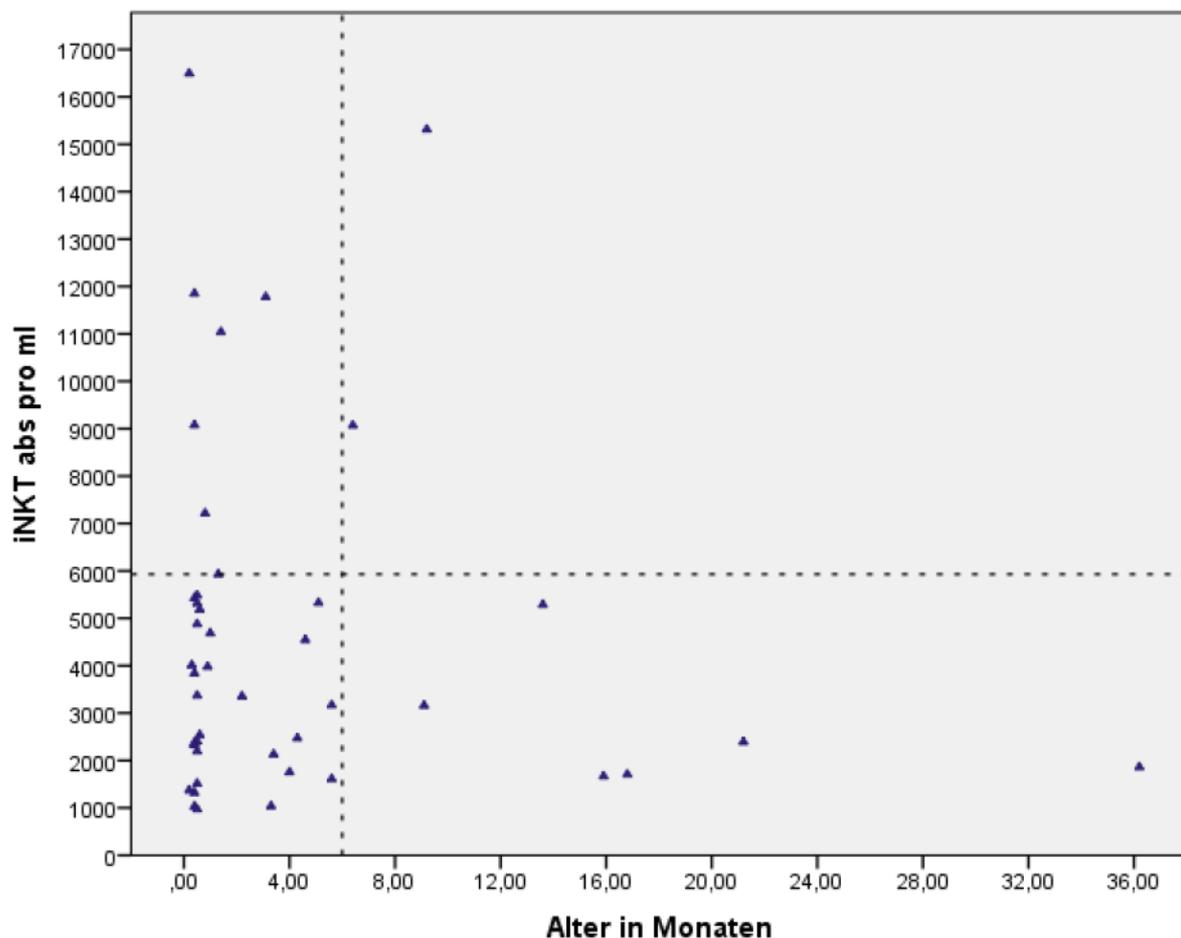
**Abbildung 4: Absolute iNKT-Zellzahl HIV-exponierter Kinder unterschieden nach Lebensalter  $\leq 4$  Monate und  $>4$  Monate**



Anhand der vorliegenden Daten konnte unter Zuhilfenahme des t-Tests kein signifikanter Unterschied ( $p= .874$ ) zwischen den oben beschriebenen Altersgruppen in Bezug auf die Höhe des absoluten iNKT-Levels gemessen werden.

Die Darstellung der iNKT-Zellzahl in Abhängigkeit vom Lebensalter zeigt eine hohe interindividuelle Variabilität innerhalb der abgebildeten Altersgruppen. Tendenziell liegt die absolute iNKT-Zellzahl HIV-exponierter Kinder im Bereich von 1000 - 6000 Zellen pro ml (siehe Abbildung 5).

**Abbildung 5: Absolute iNKT-Zellzahl in Abhängigkeit vom Alter in Lebensmonaten bei HIV-exponierten Kindern**

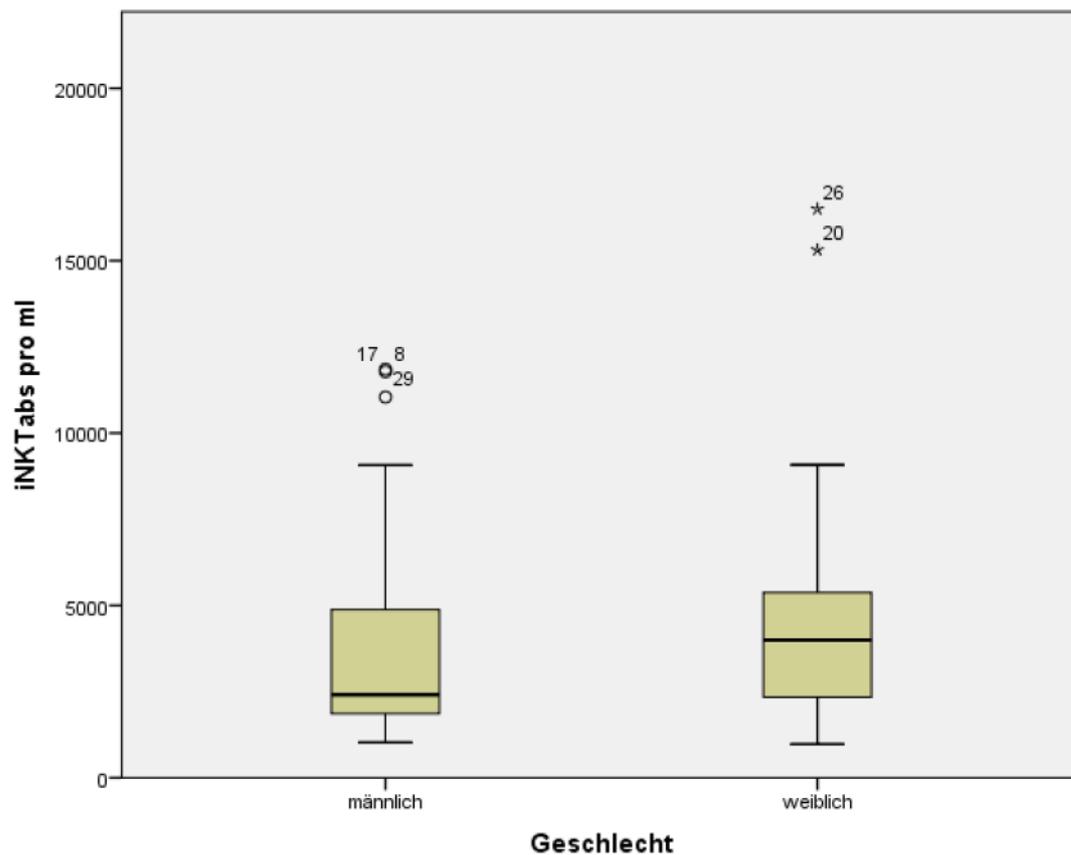


### 3.1.3 iNKT-Zellzahlen und Geschlecht

Die statistische Untersuchung der männlichen gegenüber der weiblichen Patientengruppe in Hinblick auf die Höhe der absoluten iNKT-Zellzahl ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = .610$ ).

Dementsprechend zeigte die graphische Darstellung der iNKT-Zellzahlen der männlichen gegenüber denjenigen der weiblichen Studiengruppe HIV-exponierter Kinder sehr ähnliche Zellniveaus. Im Median liegen die iNKT-Werte von weiblichen Studienteilnehmer tendenziell höher als die von männlichen Studienteilnehmern. Insgesamt können hieraus jedoch keine eindeutigen Hinweise auf geschlechterspezifische Unterschiede in Hinblick auf die iNKT-Zellzahl abgeleitet werden (siehe Abbildung 6).

**Abbildung 6: Absolute iNKT-Zellzahl HIV-exponierter Kinder männlichen und weiblichen Geschlechts**



### 3.1.4 Differenzierung nach Phänotyp

Die iNKT-Zellzahlen HIV-exponierter Kinder afrikanischen Phänotyps konnten in 24 Fällen ausgewertet werden. Die gemessenen Werte für die absolute und relative iNKT-Zellzahl sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: iNKT-Zellzahl bei HIV-exponierten Kindern afrikanischen Phänotyps**

	iNKT absolut (pro ml)	iNKT relativ (in%CD3)
N	24	24
Median	2440	,089
Mittelwert	3834	,105
Standardabweichung	3120	,078
Minimum	1030	,035
Maximum	11850	,388

Die Auswertung der vorliegenden iNKT-Werte der Kinder mit gemischtem Phänotyp lieferte die in Tabelle 3 abgebildeten Ergebnisse.

**Tabelle 3: iNKT-Zellzahl bei HIV-exponierten Kindern gemischten Phänotyps**

	iNKT absolut (pro ml)	iNKT relativ (in%CD3)
N	13	13
Mittelwert	5196	,172
Median	3981	,135
Standardabweichung	4284	,138
Minimum	975	,024
Maximum	15312	,492

Innerhalb der Gruppe HIV-exponierter Kinder schwankt die absolute iNKT-Zellzahl der Patienten kaukasischen Phänotyps zwischen 2350 und 16497 Zellen pro ml Blut (MW:5783  $\pm$ 4549). Der Median liegt bei 5237 iNKT-Zellen pro ml Blut. Die relative iNKT-Zellzahl liegt zwischen 0,060 und 0,380% an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (MW:0,149  $\pm$ 0,100), der Median befindet sich bei 0,133% an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (vgl. Tabelle 4).

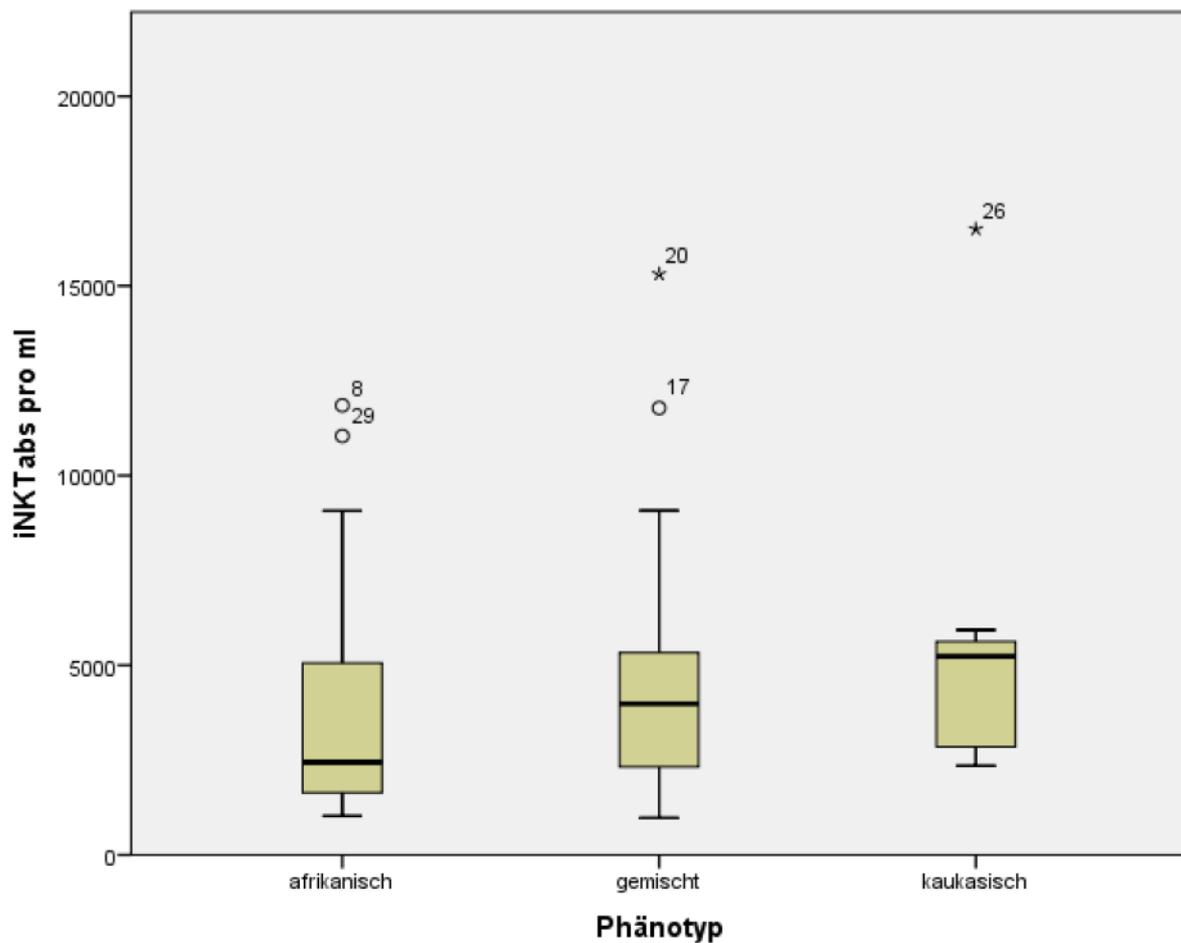
**Tabelle 4: iNKT-Zellzahlen bei HIV-exponierten Kindern kaukasischen Phänotyps**

	iNKT absolut (pro ml)	iNKT relativ (in%CD3)
N	8	8
Mittelwert	5783	,149
Median	5237	,133
Standardabweichung	4549	,100
Minimum	2350	,060
Maximum	16497	,380

Der statistische Vergleich der gemessenen absoluten iNKT-Werte zwischen den drei phänotypisch unterschiedenen Untergruppen der HIV-exponierten Studienteilnehmer mittels t-Test ergab jeweils keinen signifikanten Unterschied (*gemischt/kaukasisch*:  $p = .773$ , *gemischt/afrikanisch*:  $p = .325$ , *kaukasisch/afrikanisch*:  $p = .288$ ). Bei Patienten kaukasischen Phänotyps konnten im Vergleich zur Gruppe afrikanischer Patienten

tendenziell höhere absolute iNKT-Zellzahlen gemessen werden. Die Kohorte der kaukasischen Patienten zeichnet sich darüber hinaus im Vergleich zur Kohorte des afrikanischen und gemischten Phänotyps durch eine deutlich geringere Spannweite der gemessenen Werte aus. Abbildung 7 stellt diese Ergebnisse graphisch dar. Die in dieser Abbildung mit den Ziffern 8, 17, 20, 26 und 29 gekennzeichneten Werte, wurden in die oben genannte statistische Analyse miteinbezogen.

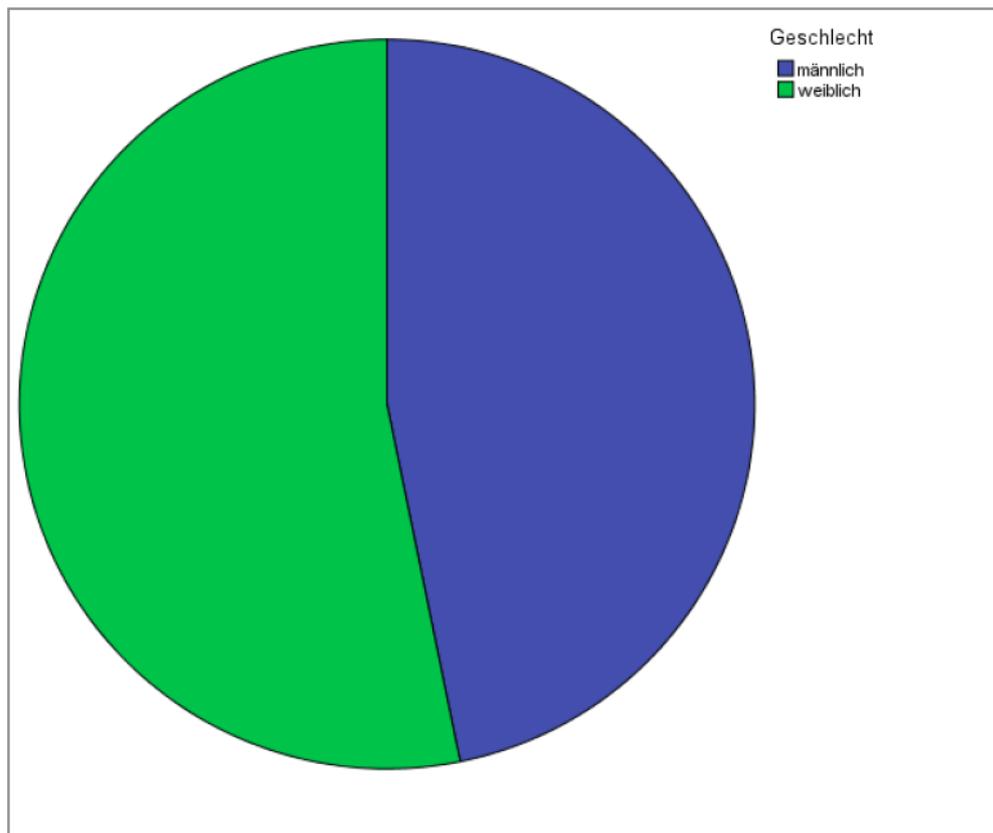
**Abbildung 7: Vergleich absolute iNKT-Zellzahl zwischen HIV-exponierten Patienten afrikanischen, gemischten und kaukasischen Phänotyps**



### 3.2 Patienten mit HIV-Infektion

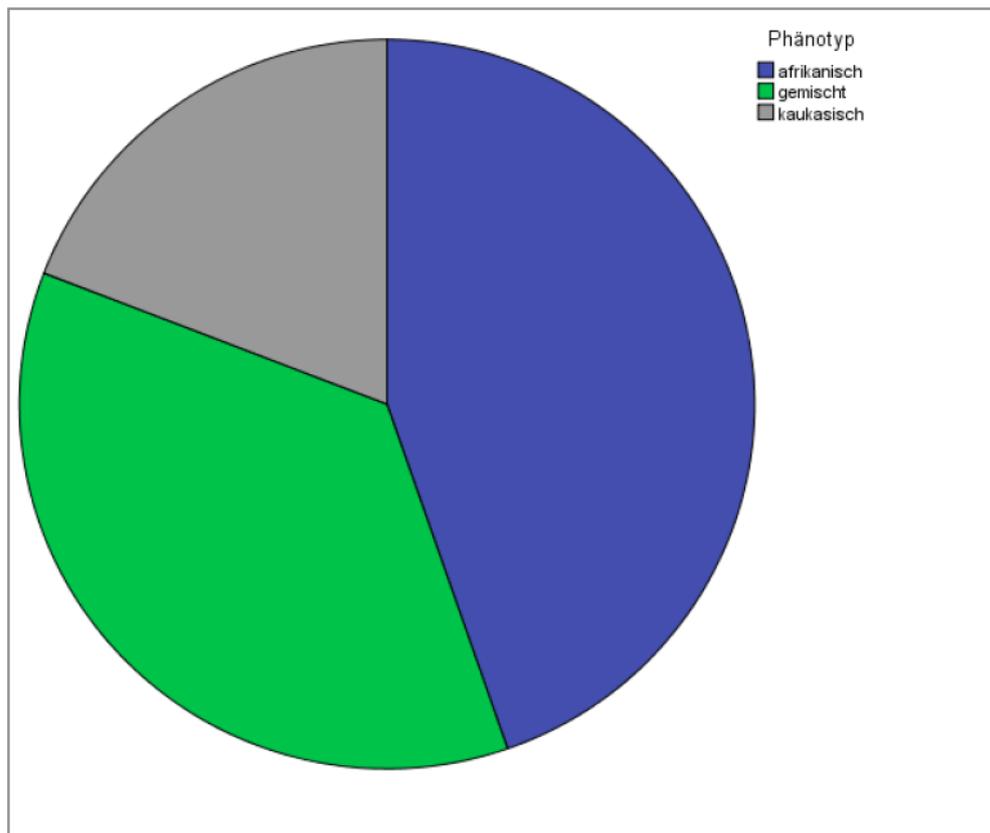
In das Kollektiv der Patienten mit HIV-Infektion konnten 47 Kinder eingeschlossen werden. Das Alter der Patienten reicht von acht bis 216 Monaten, der Median liegt bei 133 Monaten. 47% der HIV-infizierten Kinder sind männlichen, 53% weiblichen Geschlechts.

**Abbildung 8: HIV-infizierte Kinder, Geschlechterverteilung**



Die 47 mit dem HI-Virus infizierten Kindern konnten den drei nach Phänotyp unterschiedenen Untergruppen: afrikanisch, gemischt oder kaukasisch zugeordnet werden. Dementsprechend handelt es sich bei 45% der Patienten um einen afrikanischen, bei 36% um einen gemischten und bei 19% um einen kaukasischen Phänotyp.

**Abbildung 9: HIV-infizierte Kinder, Differenzierung nach Phänotyp**



### **3.2.1 Absolute und relative iNKT-Zellzahl**

Für die Kohorte HIV-infizierter Kinder (N=47) konnten alle gemessenen iNKT-Werte zum Erhebungszeitpunkt T1 zur Auswertung der iNKT-Levels genutzt werden. Die absolute iNKT-Zellzahl reicht von 0 bis 30754 Zellen pro ml Blut (MW: 4191± 5575). Der Median befindet sich bei 2142 iNKT-Zellen pro ml Blut. Die relative iNKT-Zellzahl schwankt zwischen 0% und 2,527% an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (MW:0,242 ±0,410), der Median liegt bei 0,128% an CD3<sup>+</sup>-T-Zellen. Die große Streuung der gemessenen iNKT-Werte äußert sich durch gleichermaßen auffallend hohe Spannweite und Standardabweichung (vgl. Tabelle 5).

**Tabelle 5: iNKT-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern**

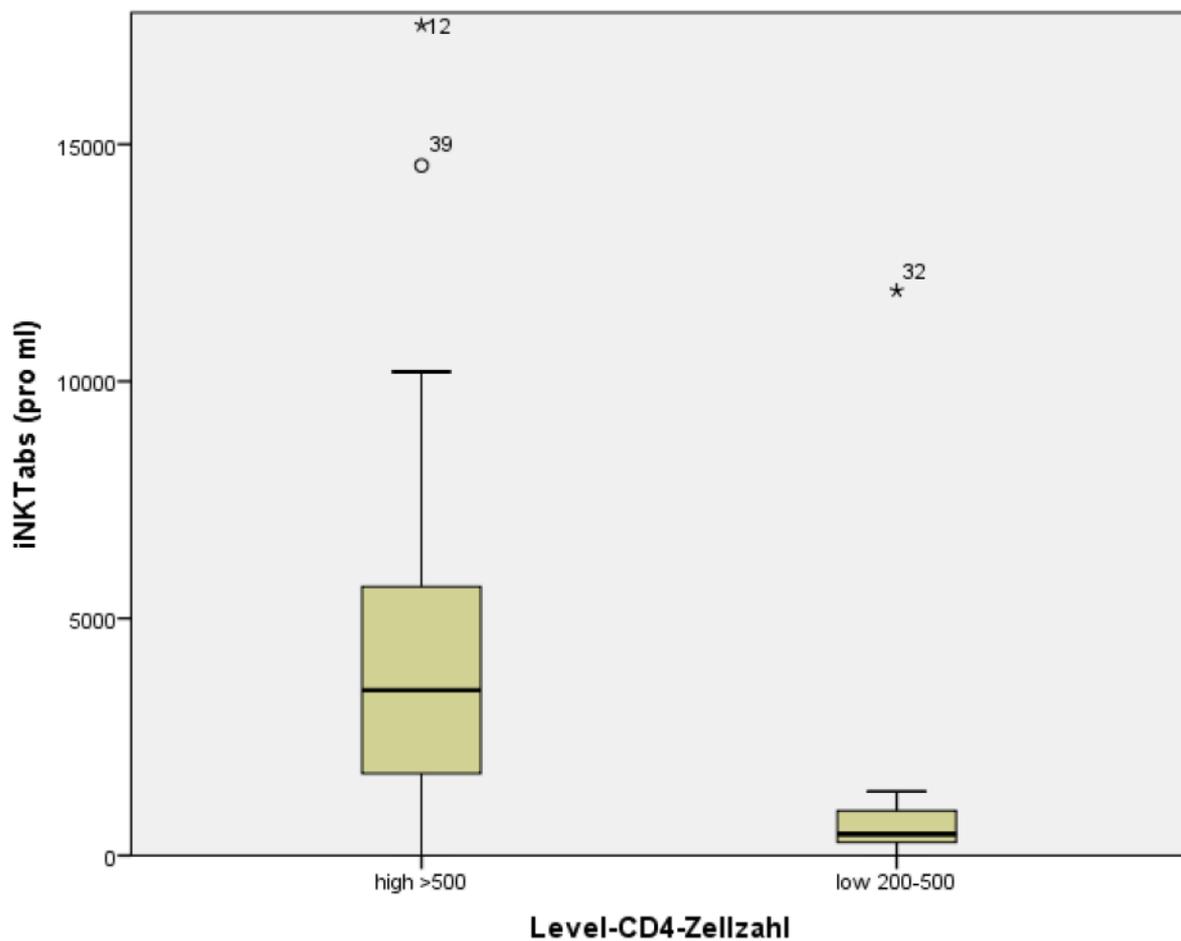
	iNKT absolut (pro ml)	iNKT relativ (in %CD3)
N	47	47
Median	2142	0,128
Mittelwert	4191	0,242
Standardabweichung	5575	0,410
Minimum	0	0
Maximum	30754	2,527

Folglich ist die Aussagekraft der iNKT-Werte von Kindern mit HIV-Infektion im Rahmen einer Gegenüberstellung dieser und der als normwertig erachteten iNKT-Werten von gesunden Kindern <sup>45</sup> eingeschränkt. Im Median weichen die anhand der HIV-infizierten Patientengruppe gemessenen absoluten und relativen iNKT-Zellzahlen von den bisher etablierten iNKT-Werten nur geringfügig nach oben ab. Die, sowohl für die relative als auch für die absolute iNKT-Zellzahl, erhobenen Mittelwerte sind im Vergleich mit der gesunden Population um den Faktor 1,5 bis 1,6 jedoch deutlich erhöht.

### **3.2.2 Abhängigkeit iNKT- und CD4-Zellzahl**

Um den möglichen Einfluss der Veränderung der CD4-Zellzahl auf die Höhe der iNKT-Zellpopulation beurteilen zu können, wurde die Studienpopulation entsprechend des vorliegenden CD4-Zellniveaus unterteilt. Analog zu den Laborkategorien 1 und 2 der CDC-Klassifikation<sup>95</sup> wurden die Patienten einer Gruppe mit hohen (>500/ $\mu$ l) CD4-Zellzahlen und einer Gruppe mit niedrigen (200-500/ $\mu$ l) CD4-Zellzahlen zugeordnet. Die Gruppe mit hohen CD4-Zellzahlen umfasst 35 Kinder (75%), die Gruppe mit niedrigen CD4-Zellzahlen 12 Kinder (25%). Im t-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = .012$ ) zwischen den beiden Patientenkollektiven in Bezug auf die gemessene Höhe des iNKT-Niveaus festgestellt werden. Abbildung 8 veranschaulicht die auffallend höheren iNKT-Zellzahlen bei Patienten mit CD4-Zellzahlen >500/ $\mu$ l im Vergleich zu Patienten mit CD4-Zellzahlen im Bereich von 200-500/ $\mu$ l (siehe Abbildung 10).

**Abbildung 10: Absolute iNKT-Zellzahl HIV-infizierter Kinder bei hohem und niedrigem CD4-Level (iNKT=30754/ml ausgeschlossen)**



### 3.2.3 Abhängigkeit iNKT-Zellzahl und Viruslast

Als weiterer Aspekt der statistischen Auswertung wurde der Zusammenhang zwischen der Viruslast (in Kopien HIV-RNA pro ml Blut) und der Höhe der absoluten iNKT-Zellzahl untersucht. Dies erfolgte zunächst anhand aller HIV-infizierten Patienten mit positivem Viruslastnachweis (VL  $\geq 40$  Kopien/ml). Die Datenauswertung der Patienten mit HIV-Infektion ohne Viruslastnachweis (VL  $< 40$  Kopien/ml) folgt in Kapitel 3.3.

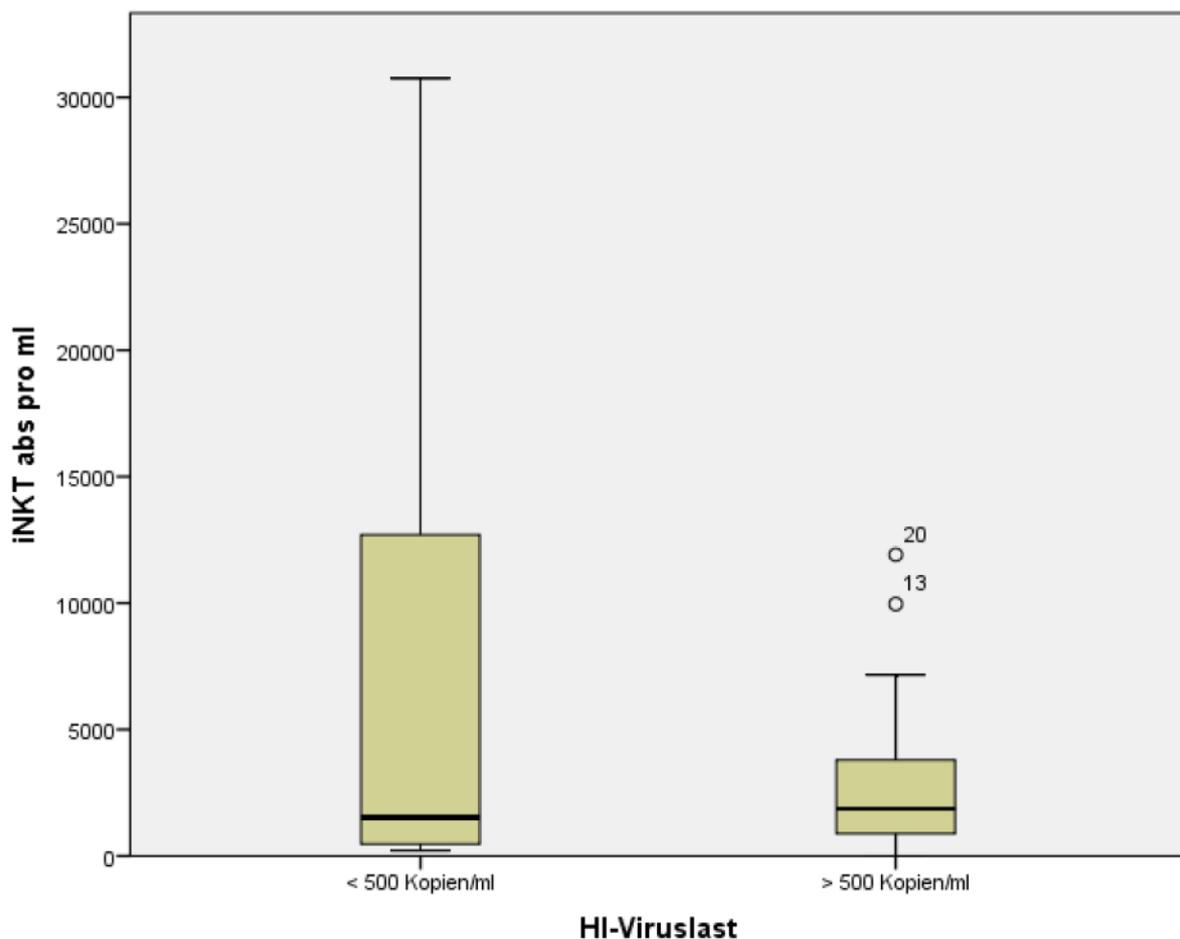
In die Kohorte HIV-infizierter Kinder mit messbarer Viruslast konnten insgesamt 23 Patienten eingeschlossen werden. Sie wurde nach Viruslast unterschieden in folgende Gruppen:

1) Viruslast <500 Kopien/ml, N= 6 (26%)

2) Viruslast >500Kopien/ml, N= 17 (74%)

Im Mittelwertvergleich für unverbundene Stichproben unterscheiden sich die Gruppen 1) und 2) hoch signifikant voneinander bezüglich des gemessenen iNKT-Levels ( $p<.01$ ). Im graphischen Vergleich (siehe Abbildung 11) liegen die absoluten iNKT-Werte HIV-infizierter Patienten mit niedriger HI-Viruslast deutlich höher im Vergleich zur Patientengruppe mit hoher Viruslast. Gleichzeitig weist Gruppe 1) eine erheblich stärker ausgeprägte Spannweite in Bezug auf die abgebildeten iNKT-Zellzahlen auf.

**Abbildung 11: Absolute iNKT-Zellzahl HIV-infizierter Kinder in Abhängigkeit von der HI-Viruslast**

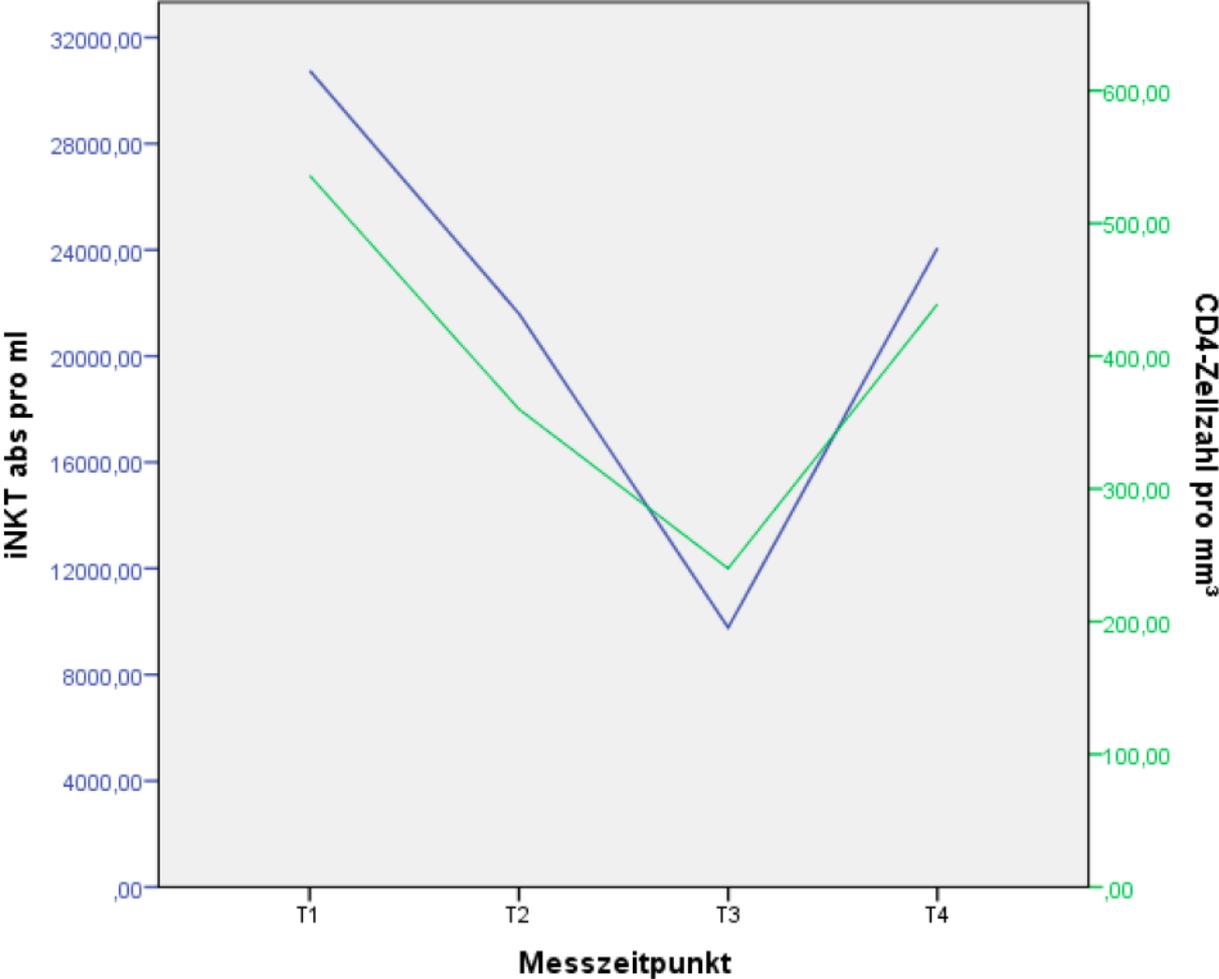


### **3.2.4 Kasuistik Extremgruppe**

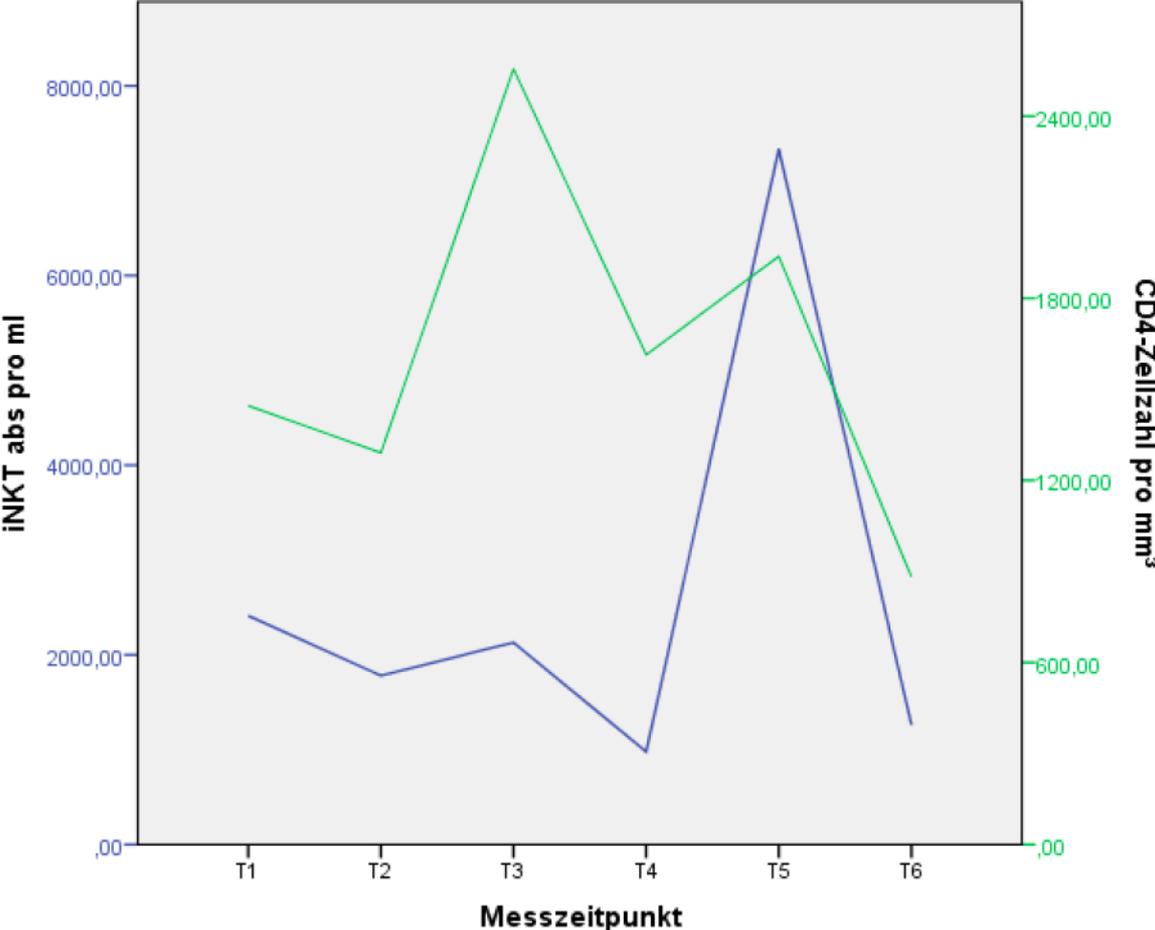
Die Auswertung der zum Beobachtungszeitpunkt T1 gemessenen iNKT-Werte zeigt, dass innerhalb der Kohorte HIV-infizierter Kinder sieben Patienten besonders hohe iNKT-Werte aufweisen. Es handelt sich um drei weibliche und vier männliche Patienten afrikanischen Phänotyps, deren absoluten iNKT-Werte jeweils im oberen Messbereich bei 7800-30754 Zellen pro ml liegen. Alle Patienten - mit Ausnahme Patient c) - befanden sich während des gesamten Beobachtungszeitraums unter antiretroviraler Therapie, unter der sie jeweils weder klinisch noch laborchemisch Zeichen eines Infekts bzw. einer Entzündung aufwiesen. Für alle sieben Patienten lagen neben der Ersterhebung (T1) weitere iNKT-Werte vor. Diese wurden im Beobachtungsverlauf an mindestens drei bis maximal fünf weiteren Messzeitpunkten im Rahmen von Folgeuntersuchungen bestimmt. Für alle Patienten innerhalb der hier beschriebenen Extremgruppe konnten im weiteren Beobachtungsverlauf starke individuelle Schwankungen der gemessenen absoluten iNKT-Zellzahlen gezeigt werden. Die ausgeprägte Variabilität wurde daraufhin im Kontext mit dem erhobenen CD4-Zellniveau sowie der Höhe der Viruslast untersucht.

Bei fünf der sieben Patienten (Patient a-e) zeigten sich in Analogie zum iNKT-Zellniveau deutlich schwankende CD4-Zellzahlen. Unabhängig von der Höhe der Zellzahlen konnte beim Absinken des CD4-Zellniveaus zeitgleich das Absinken des iNKT-Zellniveaus beobachtet werden. Steigende CD4-Zellzahlen wurden durch das Ansteigen der absoluten iNKT-Zellzahl begleitet (vgl. Abbildungen 12-16).

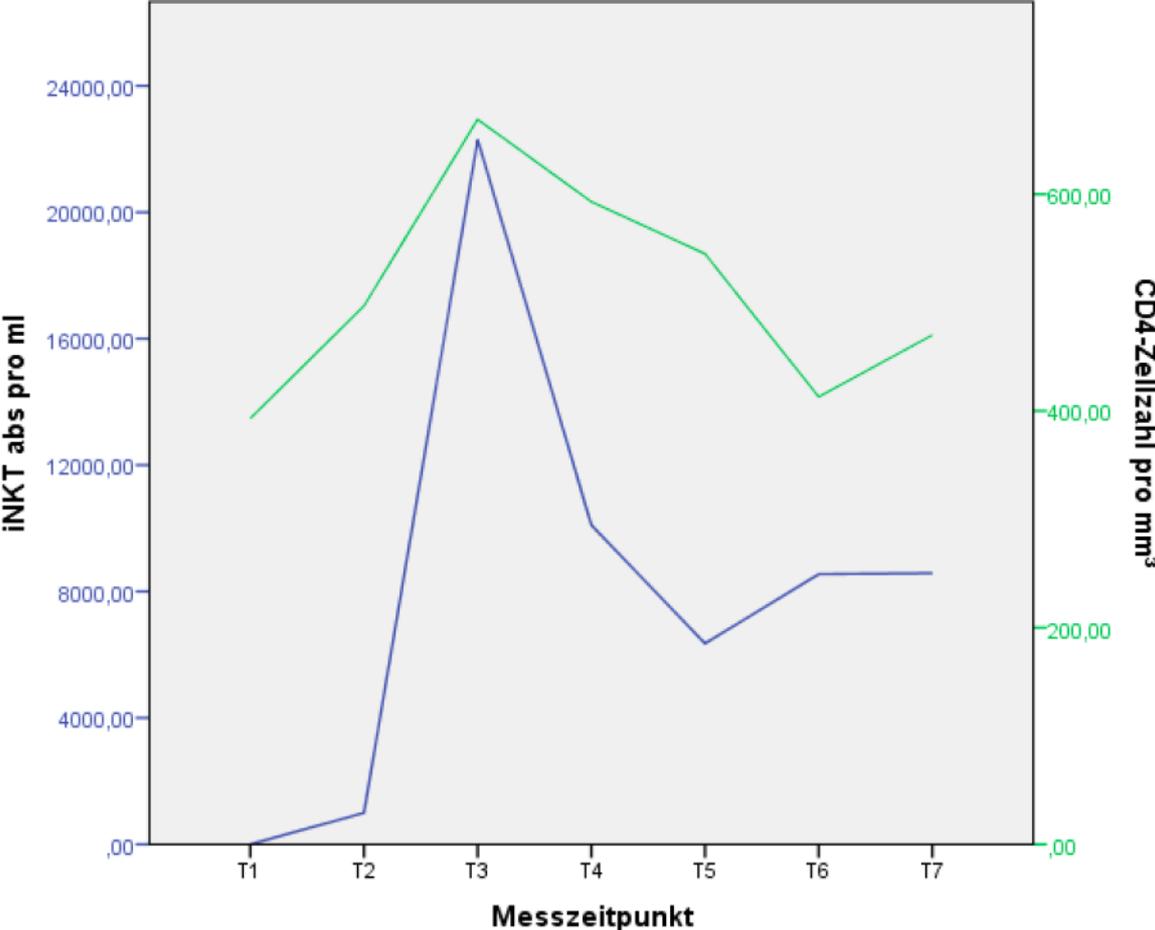
**Abbildung 12: Verlaufsbeobachtung absolute iNKT-und CD4-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern, Patient a), Alter zum Zeitpunkt T1: 17 Jahre**



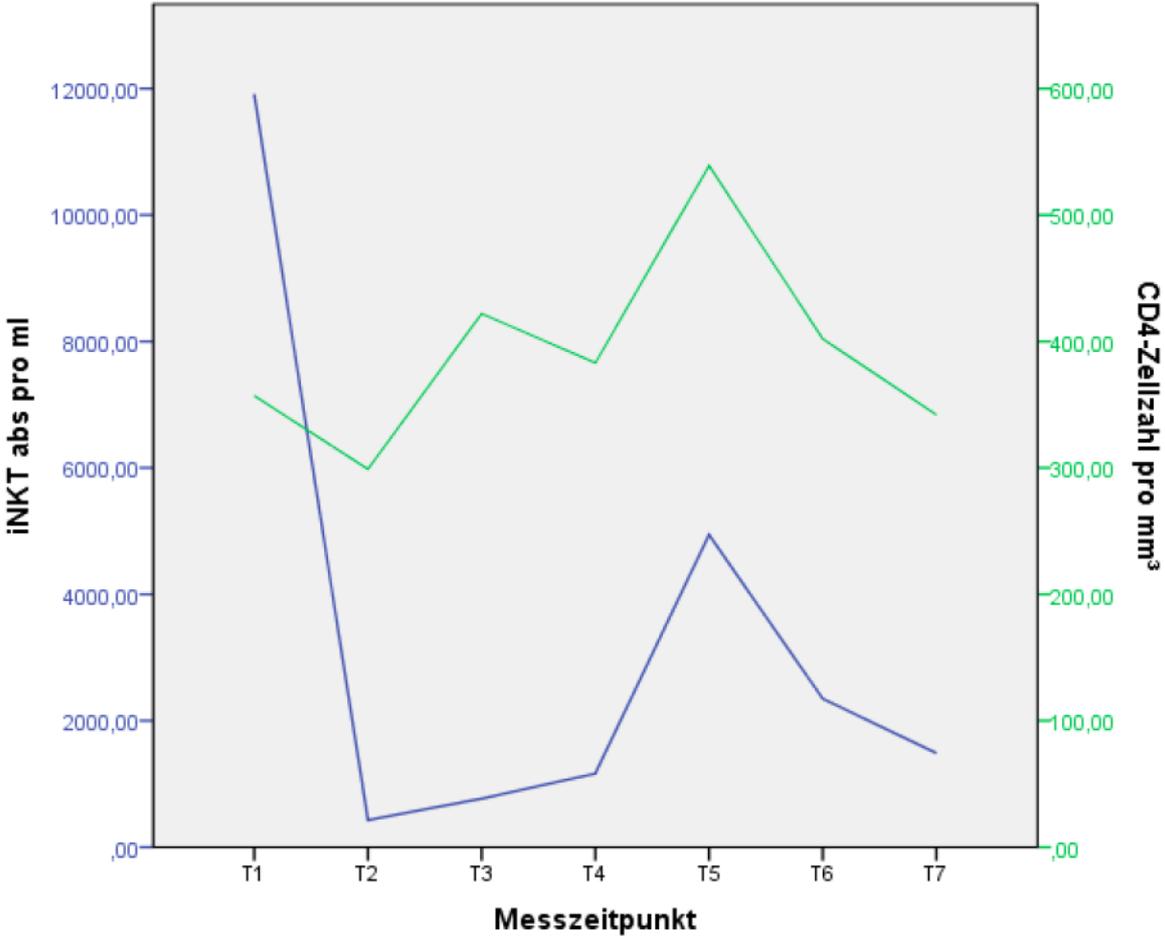
**Abbildung 13: Verlaufsbeobachtung absolute iNKT- und CD4-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern, Patient b), Alter zum Zeitpunkt T1: 1 Jahr**



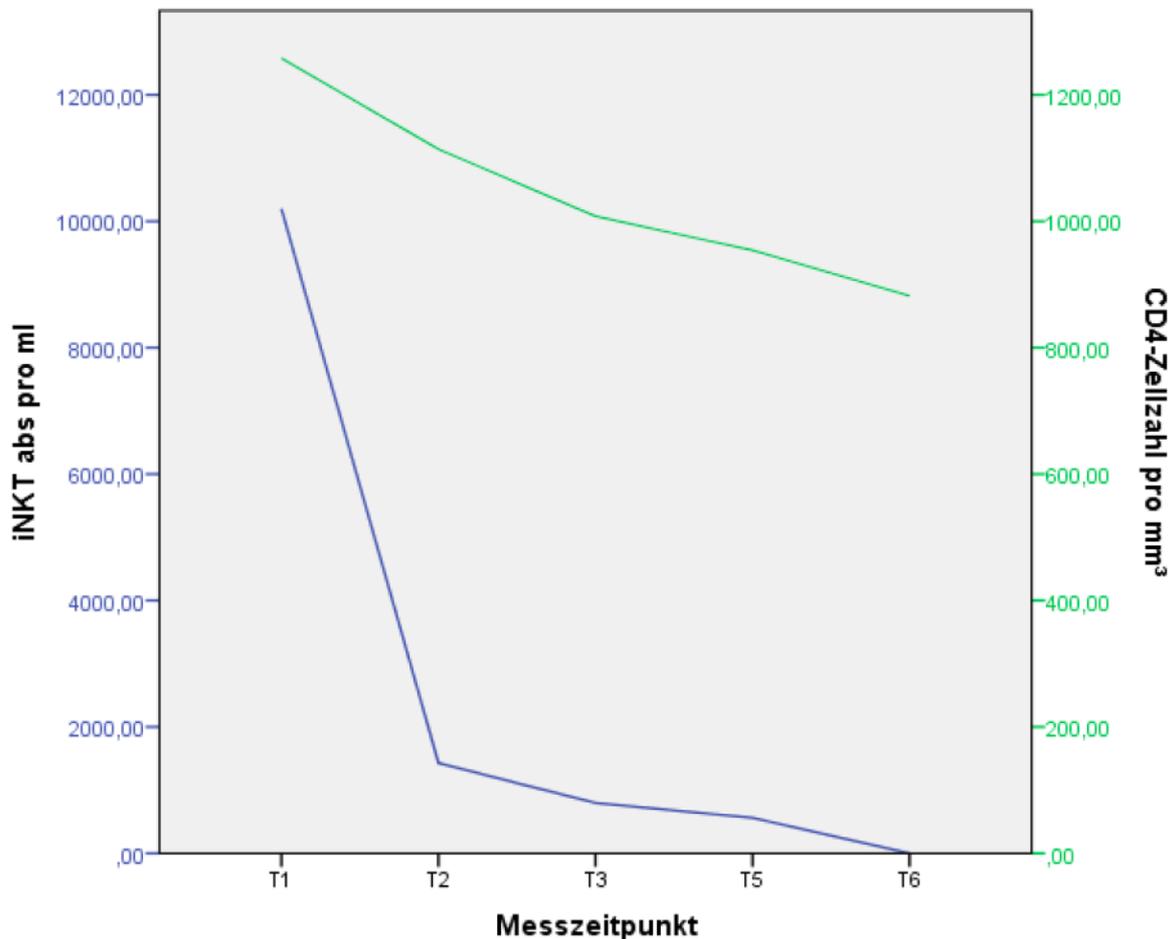
**Abbildung 14: Verlaufsbeobachtung absolute iNKT-und CD4-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern, Patient c), Alter zum Zeitpunkt T1: 9 Jahre**



**Abbildung 15: Verlaufsbeobachtung absolute iNKT- und CD4-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern, Patient d), Alter zum Zeitpunkt T1: 8 Jahre**



**Abbildung 16: Verlaufsbeobachtung absolute iNKT- und CD4-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern, Patient e), Alter um Zeitpunkt T1: 7 Jahre**



Die Untersuchung der Variabilität der iNKT-Zellzahl in Zusammenschau mit der Veränderung der Höhe der Viruslast zeigte keinen einheitlichen Trend. Für die Patienten a) und e) konnte unter konsequenter antiretroviraler Therapie während des gesamten Beobachtungsverlaufs keine Viruslast nachgewiesen werden. Patient b) wies unter ART ein gleichermaßen stabiles Viruslastniveau (<500 Kopien/ml) auf. Bei Patient c) stabilisierte sich die Viruslast im Bereich 7000-9000 Kopien/ml (ohne antiretrovirale Medikation). Für Patient d) konnte eine deutlich schwankende Viruslast, mit ab dem Zeitpunkt T2 fallender Tendenz von 10.000 Kopien/ml auf Werte <1000 bis unter die Nachweisgrenze verzeichnet werden. Die deutliche Abnahme der Viruslast lässt sich bei diesem Patienten durch eine Anpassung des antiretroviralen Therapieregimes erklären.

Angesichts der überwiegend geringen Schwankungsbreite der gemessenen Viruslast im Beobachtungsverlauf der oben genannten fünf Patienten, konnte kein aussagekräftiges Ergebnis bezüglich des möglichen Zusammenhangs zwischen Viruslast und iNKT-Zellzahl formuliert werden.

### **3.3 Patienten mit HIV-Exposition und HIV-Infektion im Vergleich**

In das Gesamtkollektiv der Kinder mit HIV-Exposition oder –Infektion wurden insgesamt 87 Studienteilnehmer eingeschlossen. Patienten ohne Mehrfachmessung wurden vom Kollektiv ausgeschlossen. Angesichts der beobachteten ausgeprägten Schwankungsbreite wurden die hoch variablen iNKT-Zellzahlen systematisch untersucht.

#### **3.3.1 Untersuchung der iNKT-Zellvariabilität und der Einflussgröße infektiologischer Status**

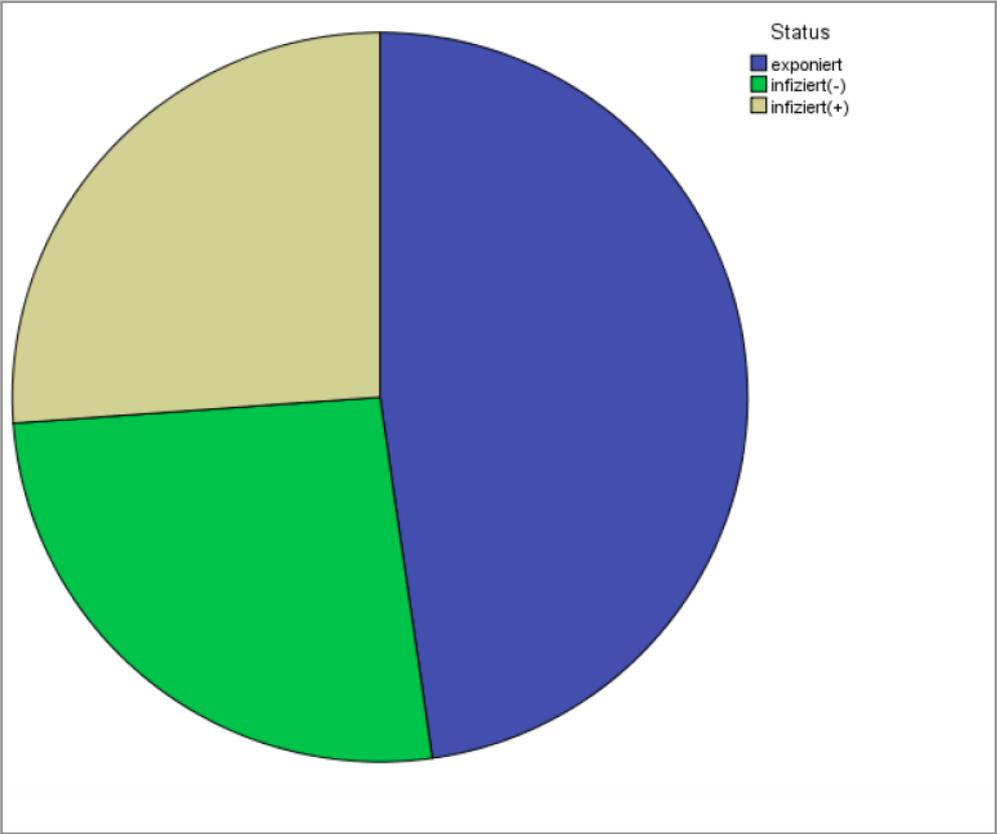
Die zwei Untergruppen (HIV-Exponierte und HIV-Infizierte) des Gesamtkollektivs zeigten in Bezug auf die Mittelwerte der absoluten iNKT-Werte statistisch keinen Unterschied (t-test für unverbundene Stichproben:  $p=.235$ ). Folglich wurde das Gesamtkollektiv zur weiteren statistischen Analyse nach Schwankungsbreite der iNKT-Zellzahlen um mehr oder weniger als 30% im Laufe der beobachteten Zeit (ohne Berücksichtigung der Zeitdauer) in zwei Gruppen unterschieden. Bei 56 Patienten (64%) schwankten die iNKT-Werte  $> 30\%$ , bei 31 Patienten (36%) ließen sich Schwankungen  $<30\%$  beobachten.

Des Weiteren wurden die Probanden unterschieden in:

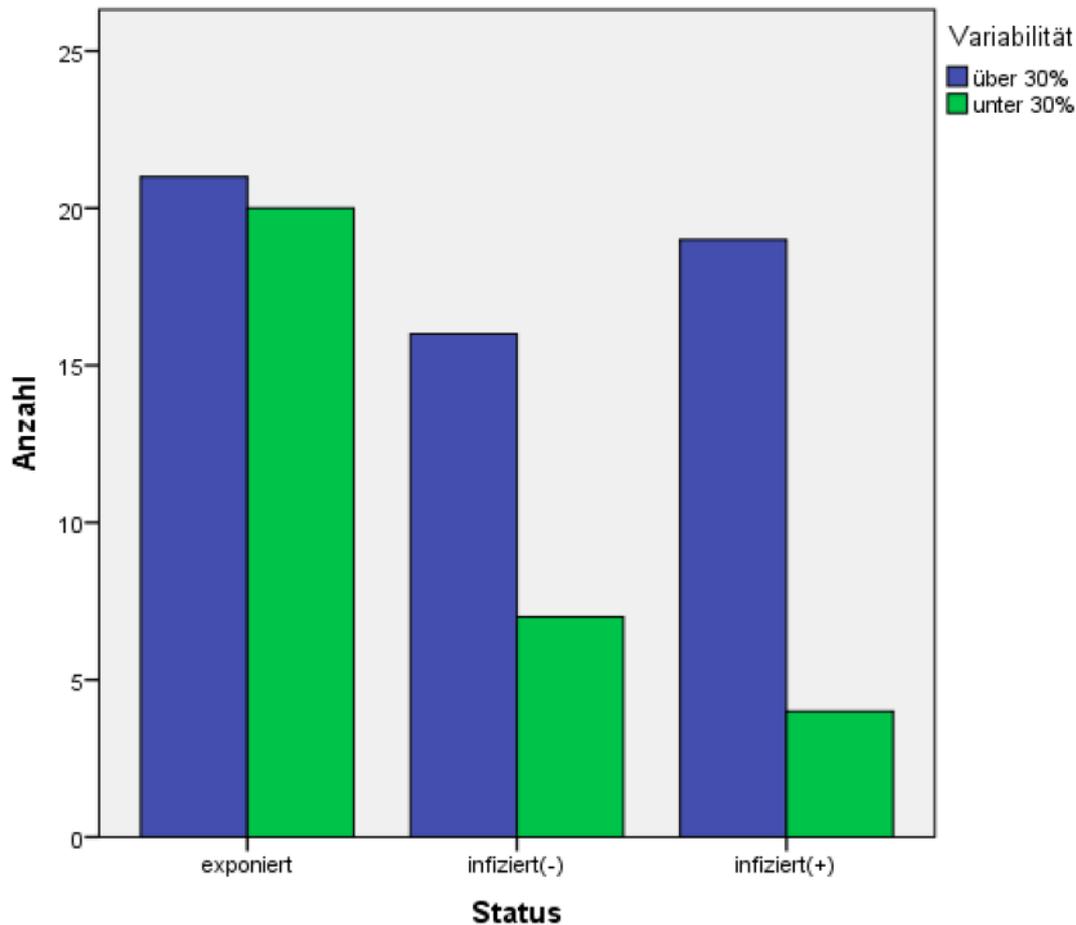
- 1) HIV-Exponierte ohne nachgewiesene Infektion [exponiert]
- 2) HIV-Infizierte ohne messbare Viruslast, d.h.  $<40$  Viruskopien/ml, [infiziert(-)]
- 3) HIV-Infizierte mit messbarer Viruslast, d.h.  $\geq 40$  Viruskopien/ml, [infiziert(+)], wobei die Höhe der gemessenen Viruslast keine Berücksichtigung fand.

Gruppe 1 umfasst 41 Patienten, Gruppe 2 und 3, jeweils 23 Patienten.

**Abbildung 17: Untergruppen innerhalb des Kollektivs HIV-exponierter und infizierter Kinder**



**Abbildung 18: Variabilität der iNKT-Werte in Abhängigkeit vom infektiologischen Status**



Die Untersuchung des Schwankungsverhaltens der gemessenen iNKT-Werte anhand von Folgemessungen lieferte folgendes Ergebnis: In Gruppe 1 weisen ca. 50% der Probanden Messwerte mit Schwankungen <30% auf, in Gruppe 3 hingegen nur ca. 10% der Probanden, in Gruppe 2 zeigt sich ein Schwankungsverhalten, das zwischen Gruppe 1 und 3 liegt (vgl. Abbildung 18). Die Unterscheidung der Gruppen zueinander ist im Chi-Quadrat-Test hoch signifikant ( $p < .01$ ). Im Vergleich zu den HIV-exponierten Patienten zeichnet sich somit die Gruppe HIV-infizierter Patienten (Gruppen 2 und 3) durch eine signifikant höhere iNKT-Zellvariabilität aus. Folglich scheint es im Rahmen einer manifesten HIV-Infektion zu ausgeprägten Schwankungen der iNKT-Zellpopulation zu kommen.

Vergleicht man darüber hinaus das Schwankungsverhalten der absoluten iNKT-Werte von HIV-infizierten Patienten mit und ohne Viruslastnachweis, ist die iNKT-

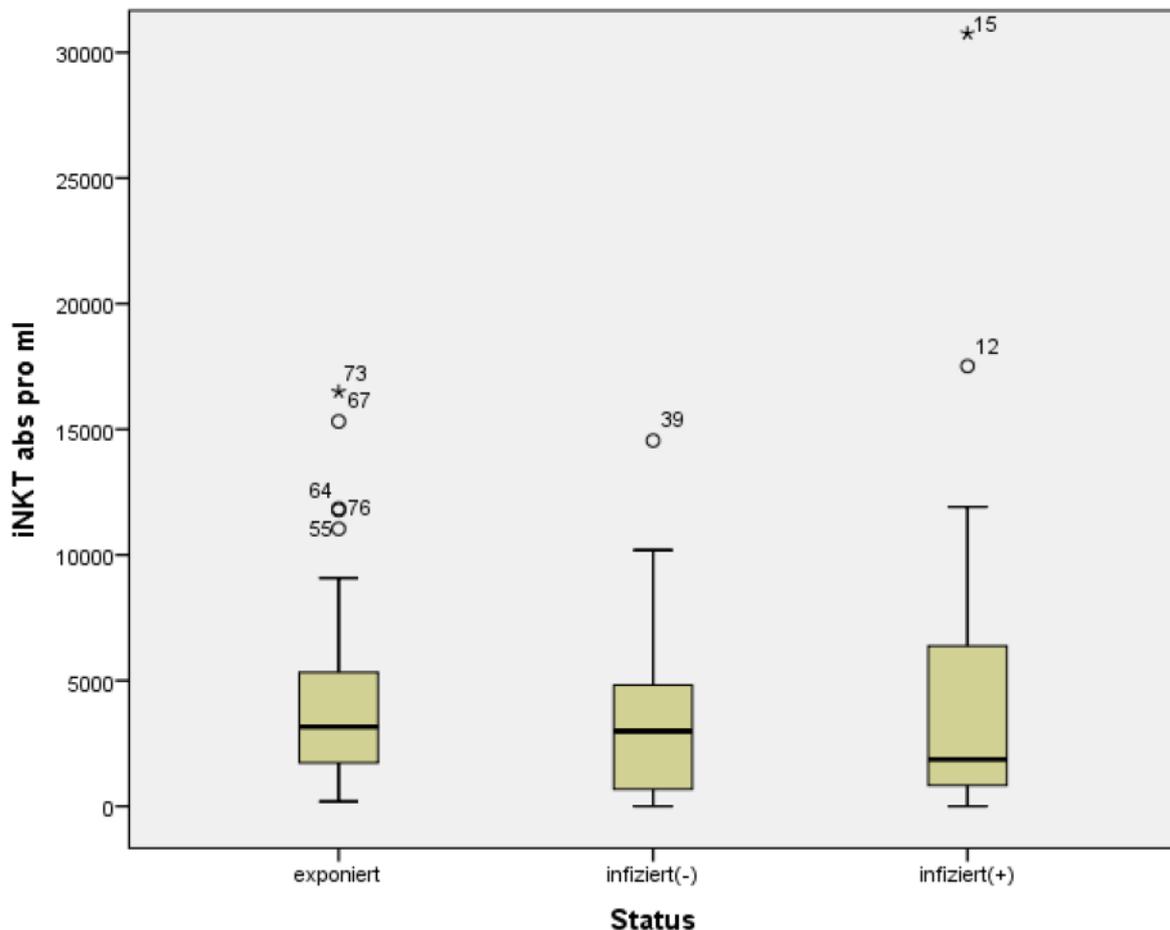
Zellvariabilität bei Infizierten mit Viruslast deutlicher ausgeprägt. Es lässt sich somit feststellen, dass stark schwankende iNKT-Zellzahlen mit einer hohen Viruslast innerhalb der untersuchten Population einhergehen. Das Ausmaß der iNKT-Zell-Variabilität wird maßgeblich durch den infektiologischen Status im Rahmen der HI-Virusinfektion beeinflusst.

Die drei untersuchten Patientengruppen verhalten sich bezüglich der iNKT-Zellexpression hoch signifikant. Jedoch kann die Einflussgröße Viruslast hierbei nicht als Alleinstellungsmerkmal angesehen werden.

### **3.3.2 Analyse der absoluten iNKT-Niveaus im Gruppenvergleich und während des Beobachtungsverlaufs**

Die jeweils erstmalig zum Zeitpunkt T1 erhobene, absolute iNKT-Zellzahl wurde zunächst für die Gruppen HIV-exponierter sowie HIV-infizierter Kinder mit und ohne Viruslastnachweis vergleichend untersucht.

**Abbildung 19: Absolute iNKT-Zellzahl in Abhängigkeit vom Immunstatus zum Beobachtungszeitpunkt T1**



Die graphische Darstellung der absoluten iNKT-Werte zum Messzeitpunkt T1 im Vergleich zwischen den abgebildeten drei Patientengruppen (siehe Abbildung 19) zeigt sehr ähnliche iNKT-Levels bei exponierten und infizierten Patienten ohne messbare Viruslast bei gleichbleibend hoher Variabilität. Die gemessenen iNKT-Zellzahlen bei HIV-infizierten Kindern mit Viruslastnachweis liegen mit 1862 iNKT-Zellen pro ml im Median deutlich unterhalb der Vergleichsgruppe HIV-infizierter Kinder ohne Viruslastnachweis (im Median: 2991 iNKT-Zellen pro ml).

Zunächst wurden alle drei Untergruppen mit Hilfe einer Mittelwertanalyse verglichen. Die Mittelwertanalyse des iNKT-Niveaus zum Zeitpunkt T1 bei HIV-exponierten Patienten, sowohl im Vergleich mit HIV-infizierten Patienten mit, als auch ohne Viruslast, zeigte im t-test für unverbundene Stichproben keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p=.236$ ,  $p=.320$ ).

Die anschließende Mittelwertanalyse der absoluten iNKT-Zellzahl zwischen HIV-Infizierten mit und ohne nachweisbare Viruslast [ infiziert (+) vs. infiziert (-)], liefert bei Infizierten ohne Viruslast im Mittel deutlich höhere iNKT-Zellzahlen als bei Patienten mit Viruslastnachweis, bei allerdings hohen interindividuellen Schwankungen. Die Unterschiede erweisen sich im t-test für unverbundene Stichproben zu den Messzeitpunkten T1 ( $p < .05$ ), T2 und T3 (*jeweils*  $p < .01$ ) als signifikant.

Analysen zum Zeitpunkt T4 sowie nachfolgender Messzeitpunkte führte durch die geringe Probandenzahl zu keinen weiterführenden Ergebnissen und wurde daher als nicht sinnvoll erachtet. Da der Messzeitpunkt T2 bei der vorliegenden Kohorte HIV-exponierter Patienten nur zwanzigmal abgebildet wurde, konnten diese Daten nicht zur statistisch aussagekräftigen Analyse genutzt werden. Folglich ergab der Vergleich der vorhandenen Mehrfachmessungen HIV-Infizierter Studienteilnehmer mit denen exponierter Studienteilnehmern keine belastbaren Ergebnisse.

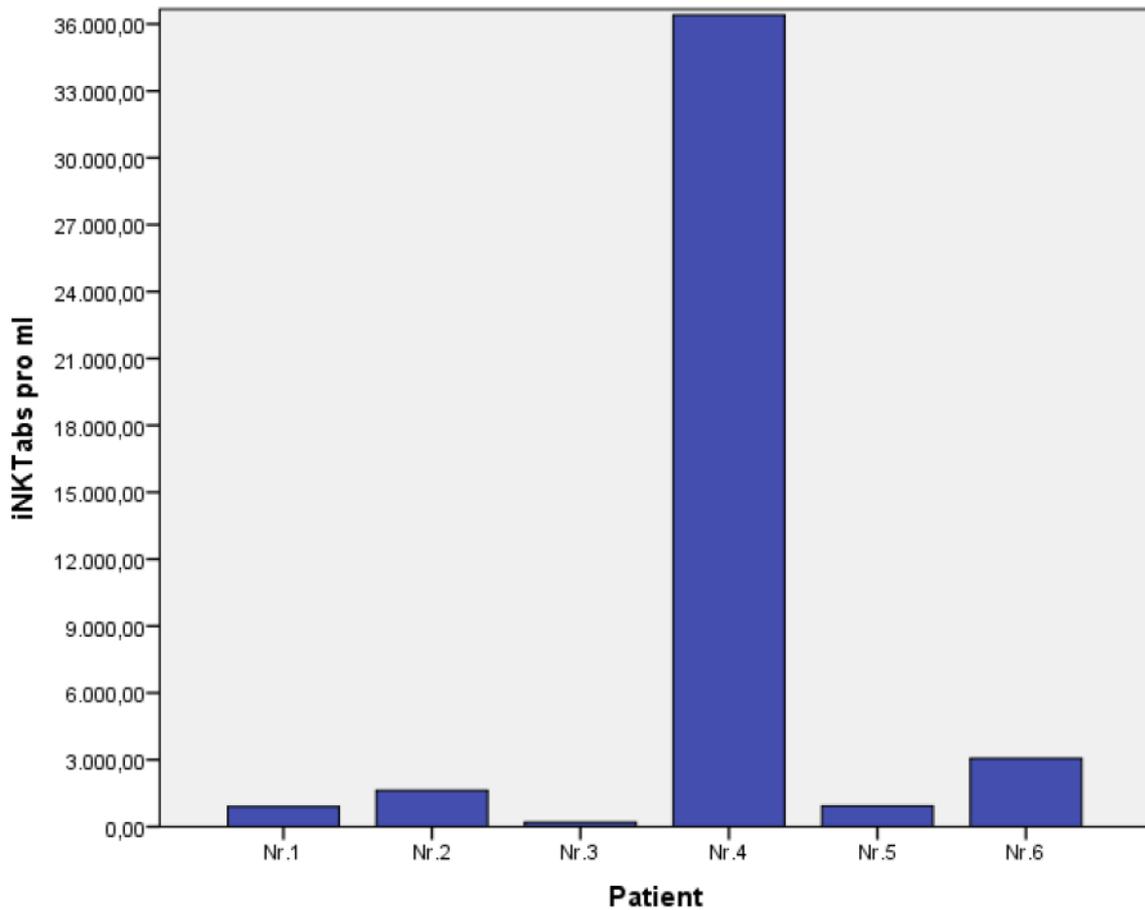
### **3.4 Patienten mit DiGeorge-Syndrom**

Die Gruppe der Patienten mit DiGeorge-Syndrom fiel mit 6 Patienten sehr klein aus, nicht zuletzt aufgrund der Seltenheit des Krankheitsbildes. Eine statistische Analyse der erhobenen Messwerte ist aufgrund der geringen Probandenzahl als nicht zielführend zu betrachten. Die durch die Aktenanalyse gewonnenen Informationen über iNKT-Zellzahlen bei Di-George-Patienten werden daher im Rahmen einer Fallbeschreibung gesondert festgehalten und ausgewertet.

#### **3.4.1 Fallbeschreibung iNKT-Werte bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom**

Sowohl die absolute als auch die relative iNKT-Zellzahl bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom zeigen eine ausgeprägte Variabilität. Die absolute iNKT-Zellzahl schwankt zum Erhebungszeitpunkt T1 zwischen 195 und 36404 Zellen pro ml, die relative iNKT-Zellzahl zwischen 0,024 und 0,705 in %CD3. Mit Ausnahme von Patient Nr.4 liegen die absoluten iNKT-Werte gleichermaßen unterhalb eines Zellniveaus von ca. 3000 iNKT-Zellen pro ml (vgl. Abbildung 20).

**Abbildung 20: Absolute iNKT-Zellzahl bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom**



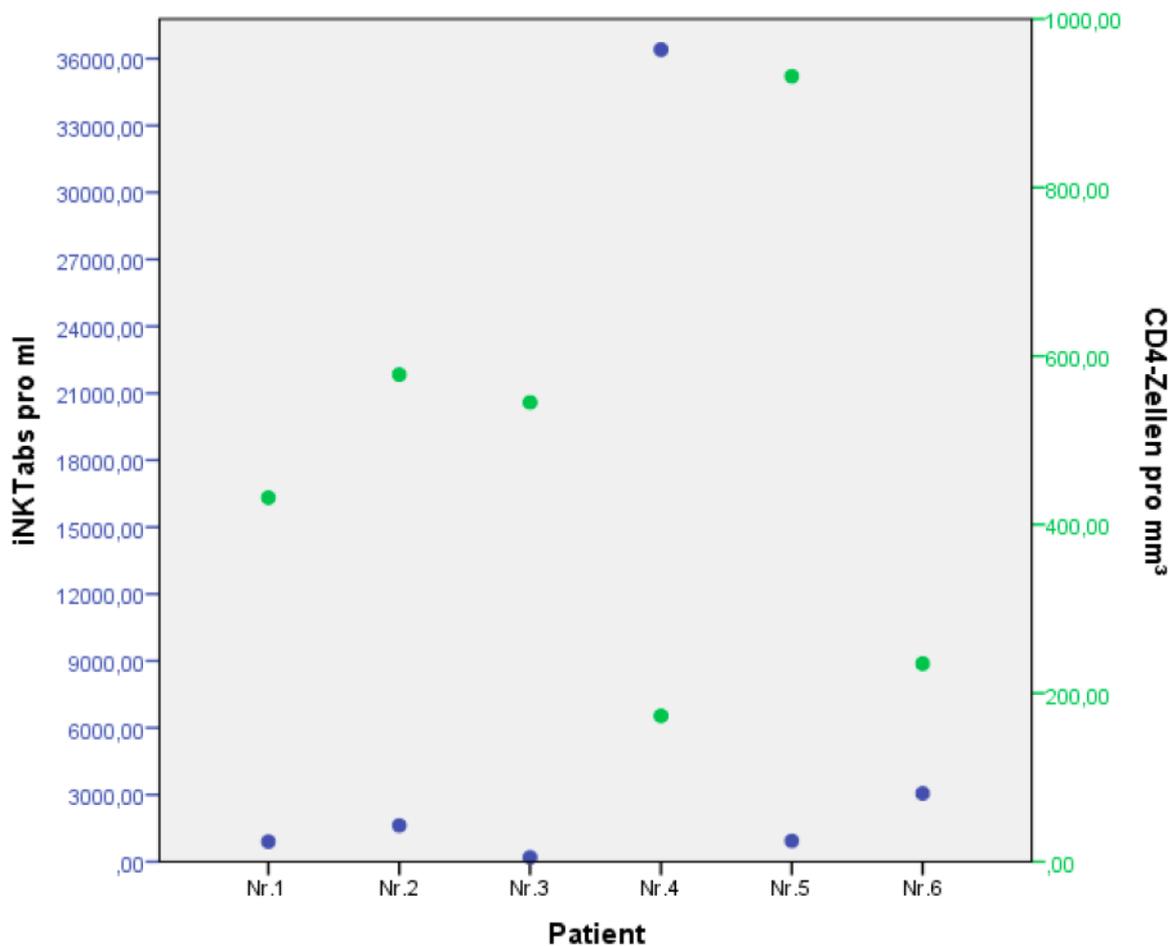
Aufgrund der ungleichmäßigen Geschlechterverteilung zugunsten des männlichen Geschlechts bei gleichzeitig sehr geringem Stichprobenumfang lässt sich keine Aussage über den möglichen Einfluss des Geschlechts auf die iNKT-Werte der hier beschriebenen Studienpopulation treffen. Desgleichen gilt für Aussagen über die mögliche Beeinflussung des iNKT-Niveaus durch das Alter bzw. den Phänotyp.

Die Aktenanalyse im Hinblick auf die Fragestellung, inwiefern Infekte Auswirkungen auf die iNKT-Zellzahl bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom besitzen, lieferte keine wegweisenden Informationen. Alle sechs Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt klinisch infektfrei, laborchemische Entzündungsmarker in Form des CRP-Wertes waren nicht nachweisbar.

Die Krankheitsverläufe der Patienten mit den absolut gemessenen, höchsten iNKT-Werten (Patient Nr.4 und Nr.6) werden jedoch insgesamt als komplikationsreich geschildert. Der bekannte, klinisch schlechte Immunstatus beider Patienten wird

laborchemisch durch eine sehr niedrige Zahl an CD4<sup>+</sup>-Zellen (173 bzw. 235 Zellen pro mm<sup>3</sup>) und CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen (0 bzw.35 Zellen pro mm<sup>3</sup>) untermauert. Bei beiden Patienten lag innerhalb der Kohorte ein umgekehrtes Verhalten von iNKT-Zellzahlen gegenüber der CD4-Zellpopulation vor. Dies zeichnet sich durch sehr hohe bzw.hohe iNKT-Zellzahlen bei gleichermaßen sehr niedrigen bzw. niedrigen Zahlen an reifen (CD4<sup>+</sup>) und naiven (CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)- Zellen aus (siehe Abbildungen 21 und 22).

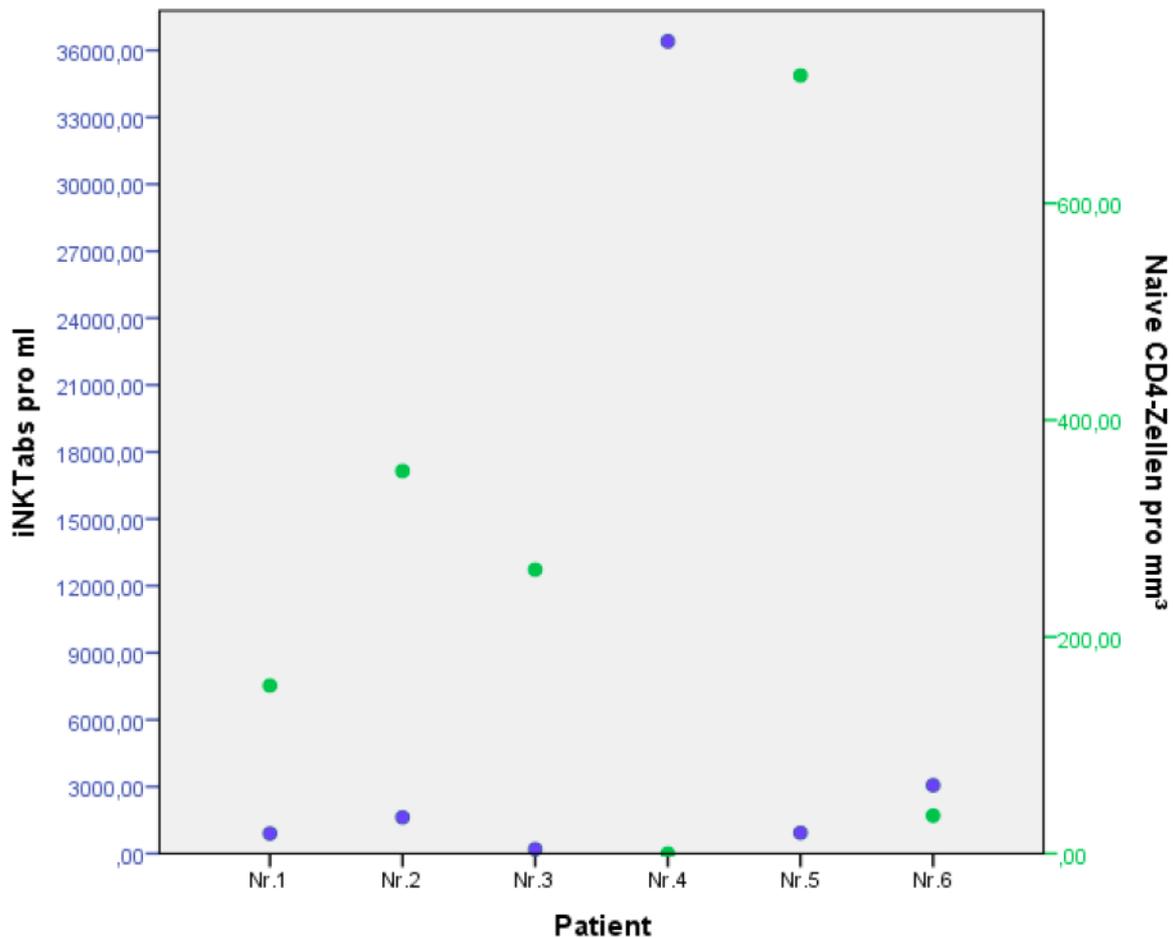
**Abbildung 21: Absolute iNKT-Zellzahl und CD4-Zellzahl bei DiGeorge-Syndrom**



Die Untersuchung der im Fall von vier Patienten vorliegenden Folgemessungen konnte keine für alle Patienten gültige, eindeutige Tendenz der Höhe des iNKT-Levels in Abhängigkeit von den gemessenen reifen bzw. naiven CD4-Zellzahlen nachweisen. Die Höhe der iNKT-Zellzahlen zeigte sich im individuellen Beobachtungsverlauf gleichermaßen hoch variabel. Es konnte kein gerichteter

Zusammenhang zwischen der Veränderung der iNKT-Werte und der Veränderung der oben genannten erfassten laborchemischen Parameter beobachtet werden.

**Abbildung 22: Absolute iNKT-Zellzahl und Anzahl naiver CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen bei DiGeorge-Syndrom**



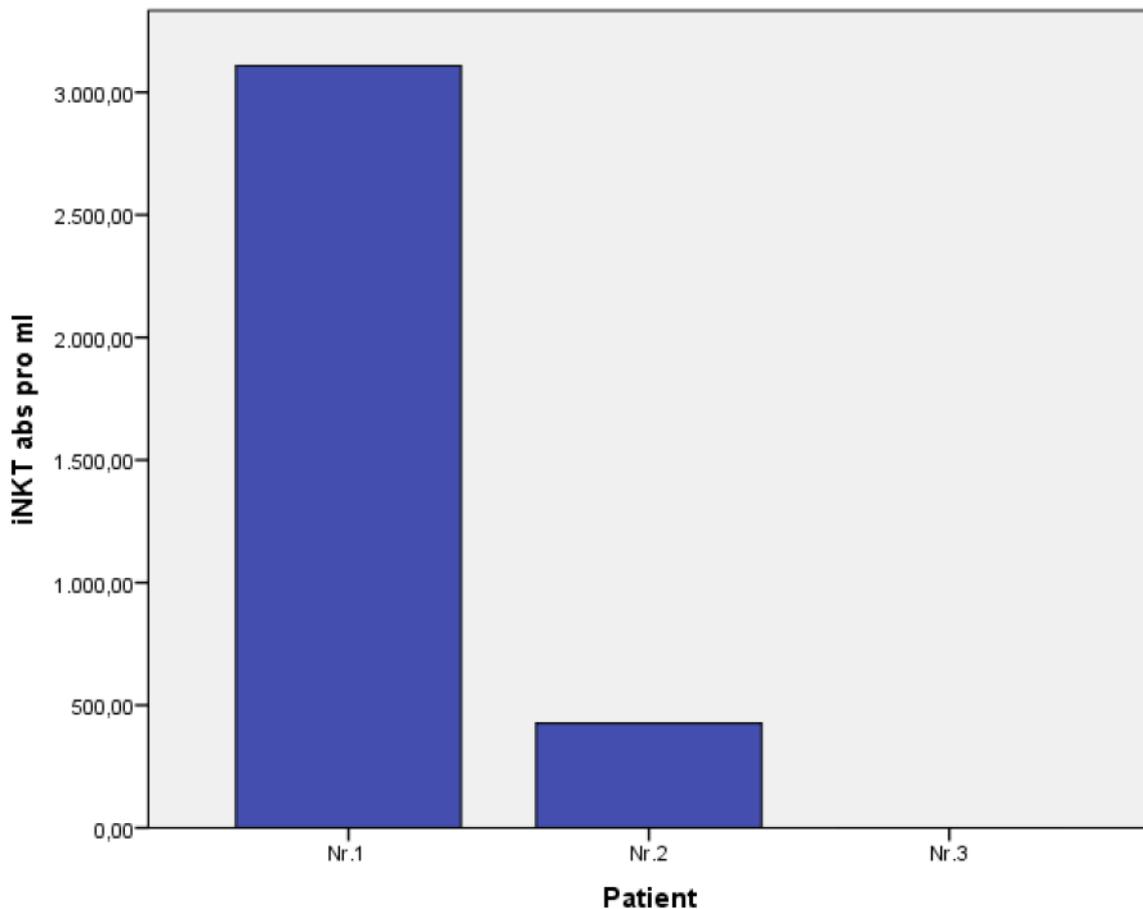
### 3.5 Patienten mit Ataxia teleangiectasia

Die erfassten laborchemischen Parameter und klinischen Angaben zu den drei Patienten mit Ataxia teleangiectasia bzw. Louis-Bar-Syndrom boten angesichts des äußerst geringen Umfangs der Stichprobe keine adäquate Grundlage für eine Auswertung im Rahmen einer statistischen Analyse. Die neu gewonnenen Informationen über iNKT-Zellzahlen bei Patienten mit angeborenem Immundefekt in Form einer Ataxia teleangiectasia werden daher kasuistisch beschrieben.

### 3.5.1 Fallbeschreibung iNKT-Werte bei Patienten mit Ataxia telangiectasia

Die anhand der drei Kinder mit Ataxia teleangiectasia gemessenen iNKT-Werte liegen zum Erhebungszeitpunkt T1 absolut zwischen 0 und 3108 Zellen pro ml bzw. relativ zwischen 0 und 0,191 in %CD3. Die für Patient 2 und 3 erhobenen, absoluten iNKT-Werte liegen mit 426 und 0 Zellen pro ml Blut deutlich unter dem für Patient Nr.1 gemessenen Wert (3108 Zellen pro ml) (siehe Abbildung 23).

**Abbildung 23: Absolute iNKT-Zellzahl bei Kindern mit Ataxia teleangiectasia**

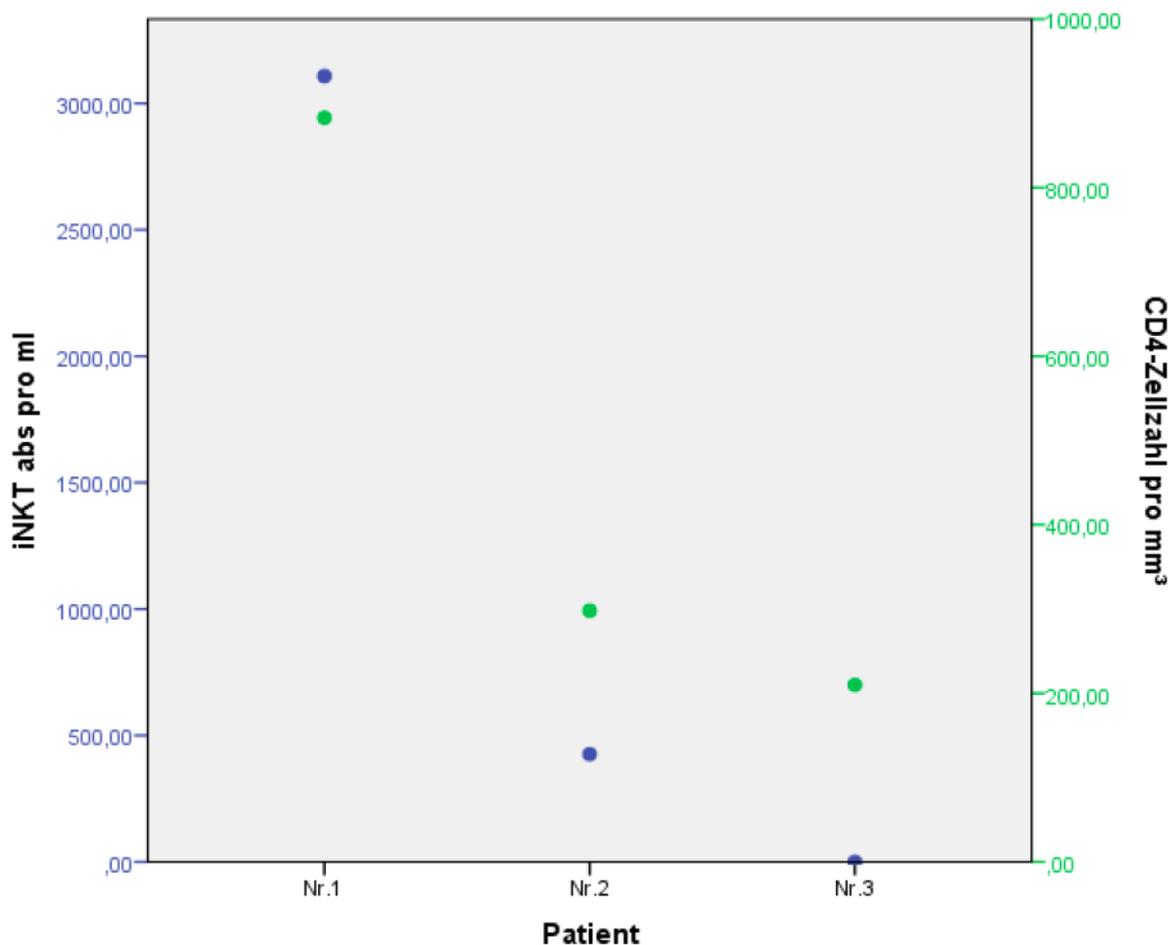


Bei Patient Nr.1 mit der höchsten iNKT-Zellzahl innerhalb dieser Patientengruppe handelt es sich um einen 21 Monate alten Jungen mit fulminantem Krankheitsverlauf, der zum Zeitpunkt der Untersuchung sowohl klinisch als auch laborchemisch Zeichen eines Infekts aufweist (CRP=13,6mg/l).

Für die oben genannten Patienten konnte der Einfluss des Alters, des Geschlechts oder des Phänotyps auf die iNKT-Zellpopulation nicht evaluiert werden.

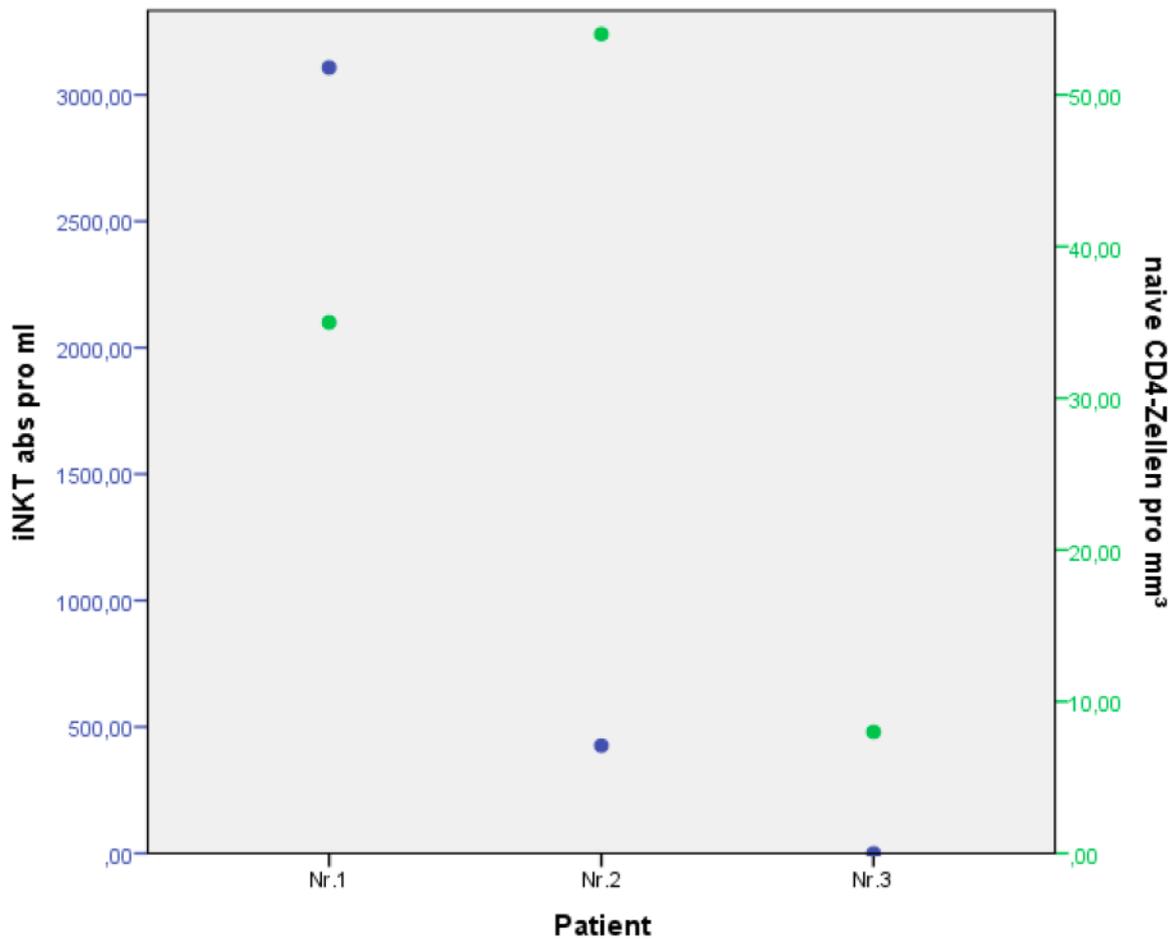
Die Darstellung der durchflusszytometrisch generierten iNKT-Zellzahl in Zusammenschau mit den gemessene T-Helferzellen zeigt ein einheitliches Bild: Patient Nr.1 weist sowohl die höchsten absoluten iNKT-Zellzahlen als auch die höchsten CD4-Zellzahlen (883 Zellen/mm<sup>3</sup>) auf, Patient Nr. 3 besitzt gleichermaßen die niedrigsten iNKT- und CD4-Zellniveaus (210 Zellen/mm<sup>3</sup>), die iNKT- und CD4-Zellzahlen (298 Zellen/mm<sup>3</sup>) von Patient Nr. 2 liegen jeweils zwischen den Wertepaarenden Patienten Nr. 1 und 3. Die oben genannten Beobachtungen sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

**Abbildung 24: Absolute iNKT-Zellzahl und CD4-Zellzahl bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia**



Die Darstellung der gemessenen iNKT-Zellzahlen im Kontext mit den erhobenen Zellniveaus naiver CD4-Zellen zeigt kein einheitliches Verteilungsmuster. Insgesamt zeichnet sich die Patientengruppe durch eine sehr niedrige Anzahl CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (22-54 Zellen pro mm<sup>3</sup>) aus (siehe Abbildung 25).

**Abbildung 25: Absolute iNKT-Zellzahl und Anzahl naiver CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-Zellen bei Patienten mit Ataxia telangiectasia**



Für die Patienten Nr.1 und Nr.2 konnten die Veränderung der iNKT-Werte im Zusammenhang mit den abgebildeten immunologischen Parametern anhand von Folgemessungen untersucht werden. Bei beiden Patienten veränderten sich die Parameter iNKT-Zellzahl und Anzahl an naiven CD4-Zellen gleichsinnig. Dementsprechend ging ein Anstieg der iNKT-Zellzahl (von 426 auf 1286 Zellen pro ml) mit einem Anstieg der naiven CD4-Zellen (von 54 auf 67 Zellen pro mm<sup>3</sup>) einher, während sinkende iNKT-Werte (von 3108 auf 261 Zellen pro ml) mit sinkenden Zellniveaus naiver CD4-Zellen (von 35 auf 22 Zellen pro mm<sup>3</sup>) einhergingen.

## 4 Diskussion

Repräsentative Ergebnisse, die Aufschluss über die Frequenz oder Funktion von invarianten NKT-Zellen im kindlichen Immunsystem geben, sind in der Literatur nur vereinzelt zu finden.

Die immunologische Arbeitsgruppe der Kinderklinik der HHU Düsseldorf etablierte Referenzwerte für iNKT-Zellen bei gesunden Kindern, die durch Bienemann et al. 2011 erstmalig publiziert wurden.<sup>45</sup> Im Anschluss an die oben genannte Veröffentlichung entstand diese retrospektive Studie, um den aktuellen Erkenntnisstand über iNKT-Zellen bei gesunden Kindern auf Kinder auszuweiten, deren Immunstatus durch erworbenen oder angeborenen Immundefekt maßgeblich beeinflusst ist. Basierend auf der systematischen Durchsicht von umfangreichen Patientendaten, konnten im Rahmen der retrospektiven Analyse iNKT-Werte für Kinder mit bekannter HIV-Infektion oder HIV-Exposition, sowie mit DiGeorge-Syndrom oder Ataxia teleangiectasia, abgebildet werden.

Die für die spezifische T-Zellsubpopulation typische, niedrige Frequenz im Gesamtblut bei gleichzeitig ausgeprägter Variabilität der iNKT-Werte<sup>44-46</sup>, zeigte sich auch in der vorliegenden Studie bei allen Patientengruppen. Der Messbereich absoluter iNKT-Zellzahlen besaß insgesamt eine enorm hohe Spannweite, die sich von 0 bis maximal 36404 Zellen pro ml Blut erstreckte. Die relative iNKT-Zellzahl in %CD3 wurde zum Zweck der Vergleichbarkeit mit den Referenzwerten ebenfalls berechnet. Für die erhobenen iNKT-Werte der in dieser Studie untersuchten Kinder wird konform mit Bienemann et al. jedoch die absolute iNKT-Zellzahl als richtungsweisend angesehen, um falsch niedrige relative iNKT-Werte bei altersbedingt hohen T-Zellzahlen auszuschließen.<sup>45,96,97</sup> Dennoch ist die Aussagekraft der durchflusszytometrisch erfassten, absoluten iNKT-Werte im unteren Messbereich durch die methodische Nachweisgrenze als limitiert zu erachten.

Die erhobenen iNKT-Zellzahlen HIV-exponierter und HIV-infizierter Kinder, zeigten teils deutliche Abweichungen von den an gesunden Kindern erhobenen Referenzwerten. Anhand der Gruppe HIV-exponierter Kinder ließen sich vergleichsweise niedrige, relative iNKT-Werte feststellen. Bei dieser Patientengruppe handelt es sich um junge Kinder, die typischerweise hohe T-Zellzahlen aufweisen.

Angeht diese Tatsache sind die gemessenen relativen iNKT-Werte in Abhängigkeit von der T-Zellzahl als falsch niedrig einzustufen. Als Ursache für die Abweichung der absoluten iNKT-Werte oberhalb des Normbereichs kann eine erhöhte Gesamtlymphozytenzahl angenommen werden.

Anhand des Kollektivs HIV-infizierter Patienten konnten im Vergleich zu den Ergebnissen von Bienemann et al. im Mittel deutlich höhere iNKT-Zellzahlen gemessen werden.<sup>45</sup> Die auffallend stark ausgeprägte iNKT-Zellvariabilität innerhalb der Gruppe HIV-infizierter Kinder sowie die fehlende statistische Vergleichbarkeit zwischen den beiden Studiengruppen erlauben im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf mögliche Ursachen für die beobachtete Abweichung. Dennoch ist anzunehmen, dass die oben genannten Beobachtungen auf die HI-Virusinfektion als potenzieller Einflussfaktor auf die iNKT-Zell-Frequenz und –Variabilität verweisen.

Die absoluten iNKT-Werte der Patientengruppe mit erworbenem Immundefekt lagen im Mittel oberhalb des Normbereichs.<sup>45</sup> Die statistische Unterscheidung zwischen der Patientengruppe immundefizienter Kinder und der gesunder Kinder in Bezug auf die Höhe der iNKT-Werte konnte im Rahmen dieser retrospektiven Studie nicht geleistet werden.<sup>45</sup> Hierzu wäre ein Studiendesign erforderlich, das sowohl die Patienten mit Immundefekt als auch eine gesunde Vergleichsgruppe einschließt.

Die Frage, inwiefern das Alter die iNKT-Zellpopulation bei Kindern beeinflusst, wurde anhand des Kollektivs HIV-exponierter Patienten untersucht. Hierbei zeigten sich keine altersspezifischen Unterschiede bezüglich der iNKT-Zellfrequenz. Diese Beobachtung stützt wiederum die Ergebnisse der immunologischen Arbeitsgruppe um Bienemann et al. auch insofern, dass sich die iNKT-Zellpopulation hierdurch deutlich von allen anderen routinemäßig erfassten Lymphozytensubpopulationen zu unterscheiden scheint.<sup>45</sup> Ferner konnte im Rahmen mehrerer, vergleichbarer Studienansätze die These stabiler iNKT-Zellzahlen im individuellen Verlauf formuliert werden.<sup>6,43,45,60,61</sup> Dieser Aspekt konnte anhand der vorliegenden Auswertung jedoch nicht bestätigt werden. Stattdessen zeigen die ausgewerteten Mehrfachmessungen teils enorme individuelle Schwankungen der iNKT-Zellzahl. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich vorrangig durch das im Rahmen der HI-Virusinfektion oder -exposition, eines Immundefekts oder einer immunologisch relevanten

medikamentösen Therapie, stark beeinflusste Immunsystems erklären und trifft für alle hier untersuchten Patienten zu - wenn auch in individuellem Maße.

In der Vergangenheit wurde der Einfluss ethnischer Faktoren auf die iNKT-Zellpopulation durch unterschiedliche Arbeitsgruppen bereits mehrfach postuliert.<sup>43,46,54</sup> Auf die Relevanz dieser Fragestellung konnte im Rahmen der aktuellen Studie durch die Feststellung einer Tendenz zu vergleichsweise höheren iNKT-Werten bei Kindern kaukasischen Phänotyps im Vergleich zu Kindern afrikanischen Phänotyps verwiesen werden. Mit Hilfe der statistischen Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Anzahl invarianter NKT-Zellen bei den - nach Phänotyp differenzierten Untergruppen HIV-exponierter Patienten - nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit Studienergebnissen von Montoya et al., Sandberg et al. sowie Bienemann et al. besteht auch in der vorliegenden Studie darüber hinaus kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten in Bezug auf die Höhe der invarianten NKT-Zellzahl.<sup>43,45,57</sup>

Die in Studien von Sandberg et al. sowie von Fernandez et al. an HIV infizierten Kindern gezeigte, deutliche selektive iNKT-Zelldepletion in der Frühphase der HIV-Infektion, war im Rahmen dieser Studie nicht nachvollziehbar.<sup>24,65</sup> Der Zeitpunkt der Erstinfektion mit dem HI-Virus bzw. der Therapiestart lagen bei allen Studienteilnehmern vor April 2009 und somit vor der Einführung routinemäßiger iNKT-Wert-Messungen per FACS-Analyse. Folglich konnten im Hinblick auf diese Fragestellung keine iNKT-Werte ausgewertet werden. Für zukünftige Studiendesigns wird diese Fragestellung jedoch aufgrund der möglichen Tragweite der Ergebnisse als durchaus wichtig erachtet. Die routinemäßige, durchflusszytometrische Erfassung der iNKT- Zellzahl zum Zeitpunkt der Erstinfektion sowie die Durchführung zeitlich standardisierte Folgemessungen zum Beispiel in den ersten vier Monaten nach HIV-Infektion, sind hierzu als sinnvolles Diagnostikum denkbar.

Bei HIV-infizierten Kindern konnte in der Vergangenheit in zwei Studien gleichermaßen die Korrelation zwischen iNKT-und CD4-Zellzahl belegt werden.<sup>24,65</sup> In Anlehnung an diese Studienergebnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Studie für HIV-infizierte Kinder signifikante Unterschiede hinsichtlich des iNKT-Niveaus in Abhängigkeit vom CD4-Level gezeigt werden. Die Patientengruppe mit

niedrigen CD4-Zellzahlen zeichnete sich dementsprechend durch deutlich niedrigere iNKT-Zellzahlen aus im Vergleich zur Patientengruppe mit hohem CD4-Level.

Der Zusammenhang zwischen Viruslast und iNKT-Zellzahl wird dagegen kontrovers diskutiert.<sup>24,65</sup> Die vorliegende retrospektive Analyse der iNKT-Frequenz bei HIV-infizierten Kindern in Abhängigkeit von der Viruslast ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit schwacher und ausgeprägter Virämie, so dass für die Patientengruppe mit niedriger Viruslast deutlich höhere iNKT-Werte im Vergleich zur Patientengruppe mit hoher Viruslast nachgewiesen werden konnten. Somit stützen die vorliegenden Ergebnisse die Erkenntnisse Sandbergs et al. aus dem Jahr 2002 und widersprechen gleichzeitig der 2014 publizierte These von Fernandez et al., die keine Korrelation zwischen Viruslast und iNKT-Zellzahl fordert.<sup>24,65</sup>

Die Auswertung und Fallbeschreibung extrem hoher iNKT-Zellzahlen einzelner HIV-infizierter Patienten konnten stimmige Beobachtungen zu oben genannten Thesen liefern: Im individuellen Untersuchungsverlauf zeichnete sich für alle Patienten eine ausgeprägte Variabilität der absoluten iNKT-Zellzahl ab. Bei fünf von sieben Patienten zeigten sich die Schwankungen der iNKT-Zellzahl abhängig vom CD4-Zellniveau. Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den hoch variablen iNKT-Werten und der gemessenen Viruslast konnten nicht nachgewiesen werden.

Als zentraler Aspekt dieser retrospektiven Studie gilt die systematische Auswertung der iNKT-Zellvariabilität in Abhängigkeit vom immunologischen Status im Beobachtungsverlauf anhand eines Gesamtkollektivs von 87 HIV-exponierten und HIV-infizierten Kindern. Nach Unterteilung des Gesamtkollektivs in die drei Gruppen: 1) HIV-Exponierte, 2) HIV-Infizierte ohne Viruslast und 3) HIV-Infizierte mit Viruslast, konnten diese entsprechend der iNKT-Zell-Variabilität um mehr oder weniger als 30% unterschieden werden. Die drei Gruppen unterschieden sich im Ausmaß der iNKT-Zellvariabilität signifikant voneinander. Zudem konnten anhand einer Mittelwertanalyse signifikant höhere, absolute iNKT-Zellzahl bei HIV-infizierten Patienten ohne Viruslast - im Vergleich zur Patientengruppe mit Viruslast - gezeigt werden. Dieser Unterschied erwies sich in bis zu drei Folgemessungen als signifikant.

Sowohl eine manifeste HIV-Infektion, als auch eine hohe Virusbelastung während einer aktiven HIV-Infektion sind somit nachweislich mit stark schwankenden iNKT-Werten assoziiert. Obgleich innerhalb dieser Studie entgegen der Erkenntnis Sandbergs et al. kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast und der Höhe des iNKT-Levels hergestellt werden konnte, verdeutlichen die oben genannten Beobachtungen nichtsdestotrotz den Stellenwert der Einflussgröße Viruslast. Auch wenn aufgrund des aktuellen Studiendesigns lediglich der indirekte Effekt antiretroviraler Therapie auf die iNKT-Zellpopulation gezeigt werden konnte, kann die für Erwachsene beschriebene, relevante Einflussnahme antiretroviraler Therapie auf die iNKT-Zellstabilität auch für pädiatrische Patienten postuliert werden.<sup>32-34</sup> Die effektive, antiretrovirale Therapie mit konsequenten Viruslastkontrollen wird folglich als relevantes Item zur Aufrechterhaltung der iNKT-Zell-Homöostase bei HIV-infizierten Kindern angesehen. Ferner erscheint ein regelmäßiges Monitoring der absoluten iNKT-Zellzahl im Rahmen der turnusmäßigen Routineuntersuchung bei HIV-exponierten und -infizierten Patienten sinnvoll. Der Nutzen von Mehrfachmessungen der iNKT-Zellzahl zur Beurteilung des iNKT-Niveaus im Beobachtungsverlauf konnte anhand dieser Studie für mindestens drei Folgemessungen gezeigt werden. Die wiederholte, standardisierte Erhebung von absoluten iNKT-Zellzahlen bei HIV-infizierten Patienten als Grundlage systematischer Analysen potenzieller Einflussfaktoren erscheint weiterhin als wegweisend. Zukünftig erscheint vor allem die zeitliche Standardisierung der Messpunkte für in Folgestudien eingeschlossene Patienten als zielführend. Mögliche relevante Messzeitpunkte stellen den Zeitpunkt zum Beispiel vor Therapiestart, zu Therapiebeginn, 3 Monate nach Therapiebeginn dar. Darüber hinaus könnten drastische Veränderungen der Viruslast oder klinische Zeichen einer schweren Infektion als mögliche Indikation zu erneuter Bestimmung der iNKT-Zellzahl dienen und somit die angeführte These untermauern.

Anhand der vorliegenden Studie konnten neue Informationen über iNKT-Zellzahlen bei Patienten mit angeborenem Immundefekt in Form eines DiGeorge- oder Louis-Bar-Syndroms (Ataxia teleangiectasia) gesammelt werden. Aufgrund des geringen Umfangs der jeweiligen Studiengruppe wurden die Beobachtungen im Rahmen von Fallbeschreibungen geschildert.

Die durchflusszytometrisch erfassten, absoluten iNKT-Zellzahlen innerhalb der Studiengruppe mit DiGeorge-Syndrom zeichneten sich durch eine hohe Variabilität aus. Bei fünf der sechs Patienten befanden sich die absoluten iNKT-Werte auf einem niedrigen Niveau, d.h. unterhalb 3000 Zellen pro ml Blut. Anhand zweier Patienten mit progredientem Krankheitsverlauf konnten ein umgekehrtes Verhalten von iNKT-Zellen zu reifen und naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden. Dies zeichnete sich durch die höchsten gemessenen iNKT-Werte aus bei zeitgleichem Vorhandensein niedrigster Zahlen an CD4<sup>+</sup>- und CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der Studiengruppe. Die Analyse der Folgemessungen lieferte aufgrund des begrenzten Datenumfangs keine belastbaren Ergebnisse.

Die Auswertung der anhand der Kinder mit Ataxia teleangiectasia erhobenen iNKT-Werte, zeigt für zwei von drei Patienten, sehr niedrige bzw. nicht nachweisbare Zellzahlen pro ml Blut (0 und 426 iNKT-Zellen/ml). Die absoluten iNKT-Werte eines Patienten mit fulminantem Krankheitsverlauf und deutlichen Infektzeichen zum Zeitpunkt der Untersuchung weichen hiervon mit 3108 iNKT-Zellen pro ml stark nach oben ab. Zeitgleich zeigt sich ein vergleichbares Verhalten für die CD4-Zellpopulation. Dementsprechend befinden sich die CD4-Zellzahlen bei Patient Nr. 2 und 3 auf niedrigem Niveau (210 und 298 Zellen/mm<sup>3</sup>), während die für Patient Nr.1 erhobene CD4-Zellzahl (883 Zellen/mm<sup>3</sup>) hiervon deutlich nach oben abweicht. Unter Berücksichtigung des Gesamtkontextes, legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass die Abhängigkeit des iNKT-Zellniveaus von der CD4-Zellzahl auch für die hier abgebildeten Patienten mit Ataxia teleangiectasia, angenommen werden kann. Für alle drei Patienten konnten bei einmaliger Erhebung gleichermaßen niedrige Zahlen an CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen (22-54 Zellen/mm<sup>3</sup>) festgestellt werden. Ein Trend bezüglich des möglichen Zusammenhangs zwischen der iNKT-Zellzahl und der Anzahl naiver CD4-Zellen, konnte hierbei nicht beschrieben werden. Anhand von Folgemessungen konnte dennoch für 2 von 3 Patienten ein gleichsinniges Verhalten von iNKT-Zellzahl und CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellzahl beobachtet werden. Um ein aussagkräftiges Ergebnis in Bezug auf den möglichen Zusammenhang zwischen den beiden genannten T-Zellsubpopulationen formulieren zu können, bedarf es jedoch eines deutlich größeren Patientenkollektivs.

Anhand der vorliegenden Daten der Patienten mit DiGeorge-Syndrom oder Ataxia teleangiectasia ließ sich keine Aussage über den Einfluss des Alters, des

Geschlechts oder des Phänotyps auf die Population invarianter NKT-Zellen treffen. Angesichts der im Rahmen dieser Studie formulierten Beobachtungen, könnte die standardisierte Erfassung und Verlaufsbeobachtung von iNKT-Zellzahlen bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom oder Ataxia teleangiectasia jedoch zukünftig als Grundlage für erkenntniserweiternde Folgestudien dienen.

Die zielführende Analyse direkter, potenzieller Effekte medikamentöser Therapie oder klinischer Infekte auf die iNKT-Zellfrequenz bei allen oben genannten Patientengruppen konnte anhand des vorliegenden Datensatzes nicht geleistet werden. Als mögliche Ursachen hierfür können z.B. das retrospektive Studiendesign, der geringe Umfang verzeichneter, klinischer Infekte, die fehlende Klassifikation des Infekts (z.B. bakteriell vs. viral), die Vielzahl an potenziellen Einflussfaktoren sowie die mangelnde Erfassung von iNKT-Zellzahlen in zeitlichem Zusammenhang mit medikamentösen Interventionen, angeführt werden.

Basierend, auf den im Rahmen dieser Arbeit formulierten Ergebnisse und der kritischen Auseinandersetzung mit den vorliegenden methodischen Limitationen, liefert diese Arbeit den Impuls für weiterführende Studien zur Klärung ausstehender, wissenschaftlich relevanter Fragestellungen im Hinblick auf die iNKT-Zell-Frequenz und – Funktion im kindlichen Immunsystem.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie konnten durch die systematische Analyse von patientenbezogenen Daten, absolute und relative iNKT-Zellzahlen für Kinder mit erworbenem Immundefekt - in Form einer HIV-Infektion bzw. -Exposition - sowie mit angeborenem Immundefekt - in Form eines DiGeorge-Syndroms bzw. einer Ataxia teleangiectasia - erhoben werden. Die für die iNKT-Zellpopulation typische niedrige Frequenz bei ausgeprägter Variabilität der iNKT-Werte konnte für alle Patientengruppen dokumentiert werden. Es konnten keine signifikanten, alters-, geschlechts-, oder phänotyp- spezifischen Unterschiede bezüglich des iNKT-Zellniveaus festgestellt werden. Da keine eindeutigen Hinweise auf altersbedingte Referenzbereiche für die iNKT-Zellpopulation vorliegen, scheint sich der Verdacht, dass sich die invarianten NKT-Zellen in diesem Aspekt von allen anderen routinemäßig erfassten Lymphozytensubpopulationen unterscheiden, zu erhärten. Anhand des Kollektivs HIV-infizierter Kinder konnte der Einfluss sowohl der CD4<sup>+</sup>-Zellzahl als auch der Viruslast auf die iNKT-Zellzahl bestätigt werden. Die Höhe der iNKT-Zellzahl bei HIV-infizierten Kindern unterscheidet sich signifikant zwischen den Patientengruppen mit niedriger und hoher CD4<sup>+</sup>-Zellzahl bzw. Viruslast. Als zentrales Ergebnis dieser Studie gilt darüber hinaus der Nachweis, dass zum einen eine aktive HIV-Infektion bei Kindern, zum anderen eine messbare Viruslast im Rahmen der Infektion, relevante Einflussgrößen auf die iNKT-Zell-Variabilität repräsentieren und signifikante Unterschiede bezüglich der iNKT-Zellzahl bedingen. Die effektive antiretrovirale Therapie mit regelmäßigen Kontrollen der Viruslast, stellt somit eine essenzielle Maßnahme zur Aufrechterhaltung der iNKT-Zell-Stabilität dar. Ein regelmäßiges Monitoring der absoluten iNKT-Zellzahl im Rahmen der turnusmäßigen Routinekontrollen sowie zeitlich standardisierte Folgemessungen erscheinen im klinischen Alltag bzw. als methodische Grundlage für mögliche Folgestudien als durchaus sinnvolles Vorgehen. Die Fallbeschreibungen liefern neue Informationen über die iNKT-Zell-Frequenz bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom bzw. Ataxia teleangiectasia, so dass somit ein Beitrag zur Erweiterung der bislang sehr begrenzten Datenlage zur Thematik - iNKT-Zellzahlen bei Kindern mit angeborenem Immundefekt - geleistet werden konnte. Die in der retrospektiven Analyse ermittelten Ergebnisse sollten nach Möglichkeit durch prospektive multizentrische Studien überprüft und ergänzt werden.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Lawson V. Turned on by danger: activation of CD1d-restricted invariant natural killer T cells. *Immunology* 2012;137:20-7.
2. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008;20:358-68.
3. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625-36.
4. Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 1995;7:529-34.
5. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, et al. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* 2003;198:1069-76.
6. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 2002;195:637-41.
7. Li D, Xu XN. NKT cells in HIV-1 infection. *Cell Res* 2008;18:817-22.
8. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297-336.
9. Michel ML, Keller AC, Paget C, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 2007;204:995-1001.
10. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2007;178:2827-34.
11. Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J Immunol* 2007;179:3452-62.
12. Mattner J, Debord KL, Ismail N, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005;434:525-9.
13. Kinjo Y, Wu D, Kim G, et al. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 2005;434:520-5.
14. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 2006;7:978-86.
15. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, et al. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med* 2002;8:588-93.
16. Bilenki L, Wang S, Yang J, Fan Y, Joyee AG, Yang X. NK T cell activation promotes *Chlamydia trachomatis* infection in vivo. *J Immunol* 2005;175:3197-206.
17. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002838.
18. Ishikawa H, Tanaka K, Kutsukake E, et al. IFN- $\gamma$  production downstream of NKT cell activation in mice infected with influenza virus enhances the cytolytic activities of both NK cells and viral antigen-specific CD8+ T cells. *Virology* 2010;407:325-32.
19. Ho LP, Denney L, Luhn K, Teoh D, Clelland C, McMichael AJ. Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection. *Eur J Immunol* 2008;38:1913-22.
20. De Santo C, Salio M, Masri SH, et al. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest* 2008;118:4036-48.
21. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000;192:921-30.
22. Inoue M, Kanto T, Miyatake H, et al. Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2006;45:190-6.
23. Fleuridor R, Wilson B, Hou R, Landay A, Kessler H, Al-Harathi L. CD1d-restricted natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection. *Immunology* 2003;108:3-9.

24. Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2002;76:7528-34.
25. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol* 2002;168:1490-5.
26. Berger EA, Doms RW, Fenyö EM, et al. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998;391:240.
27. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 1997;185:621-8.
28. Moutsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 2002;195:869-79.
29. Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, et al. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998;4:208-14.
30. Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, et al. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999;103:1391-8.
31. van der Vliet HJ, van Vonderen MG, Molling JW, et al. Cutting edge: Rapid recovery of NKT cells upon institution of highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *J Immunol* 2006;177:5775-8.
32. Moll M, Snyder-Cappione J, Spotts G, Hecht FM, Sandberg JK, Nixon DF. Expansion of CD1d-restricted NKT cells in patients with primary HIV-1 infection treated with interleukin-2. *Blood* 2006;107:3081-3.
33. Vasan S, Poles MA, Horowitz A, Siladji EE, Markowitz M, Tsuji M. Function of NKT cells, potential anti-HIV effector cells, are improved by beginning HAART during acute HIV-1 infection. *Int Immunol* 2007;19:943-51.
34. Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Semin Immunol* 2010;22:87-96.
35. Moll M, Kuylenstierna C, Gonzalez VD, et al. Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 2009;39:902-11.
36. Ishihara S, Nieda M, Kitayama J, et al. Alpha-glycosylceramides enhance the antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes obtained from cancer patients by activating CD3-CD56+ NK cells in vitro. *J Immunol* 2000;165:1659-64.
37. Tahir SM, Cheng O, Shaurov A, et al. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 2001;167:4046-50.
38. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, et al. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:3702-9.
39. Najera Chuc AE, Cervantes LA, Retiguin FP, Ojeda JV, Maldonado ER. Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1427-32.
40. Wilson MT, Van Kaer L. Natural killer T cells as targets for therapeutic intervention in autoimmune diseases. *Curr Pharm Des* 2003;9:201-20.
41. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, et al. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006;354:1117-29.
42. Ghazarian L, Simoni Y, Pingris K, Beaudoin L, Lehuen A. [Regulatory role of NKT cells in the prevention of type 1 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 2013;29:722-8.
43. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 2007;122:1-14.
44. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21:573-83.

45. Bienemann K, Iouannidou K, Schoenberg K, et al. iNKT cell frequency in peripheral blood of Caucasian children and adolescent: the absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood. *Scand J Immunol* 2011;74:406-11.
46. Fereidouni M, Farid Hosseini R, Jabbari Azad F, Schenkel J, Varasteh A, Mahmoudi M. Frequency of circulating iNKT cells among Iranian healthy adults. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:65-9.
47. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 1994;180:1171-6.
48. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000;192:741-54.
49. Sidobre S, Kronenberg M. CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Methods* 2002;268:107-21.
50. Gadola SD, Dulphy N, Salio M, Cerundolo V. Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alpha-beta(+) T lymphocytes. *J Immunol* 2002;168:5514-20.
51. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, et al. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol* 2001;167:5531-4.
52. Exley MA, Hou R, Shaulov A, et al. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. *Eur J Immunol* 2008;38:1756-66.
53. Peralbo E, DelaRosa O, Gayoso I, Pita ML, Tarazona R, Solana R. Decreased frequency and proliferative response of invariant Valpha24Vbeta11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly. *Biogerontology* 2006;7:483-92.
54. DelaRosa O, Tarazona R, Casado JG, et al. Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp Gerontol* 2002;37:213-7.
55. Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, et al. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Exp Gerontol* 2007;42:719-32.
56. Molling JW, Kölgen W, van der Vliet HJ, et al. Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer* 2005;116:87-93.
57. Sandberg JK, Bhardwaj N, Nixon DF. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol* 2003;33:588-96.
58. Jiang W, Kang L, Lu HZ, et al. Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:811-3.
59. Blum KS, Pabst R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett* 2007;108:45-51.
60. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002;110:793-800.
61. Lucas M, Gadola S, Meier U, et al. Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J Virol* 2003;77:2251-7.
62. Song L, Ara T, Wu HW, et al. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J Clin Invest* 2007;117:2702-12.
63. Casorati G, de Lalla C, Dellabona P. Invariant natural killer T cells reconstitution and the control of leukemia relapse in pediatric haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Oncoimmunology* 2012;1:355-7.
64. Yan-ming L, Lan-fang C, Chen L, Ya-qin L, Wei C, Wen-ming Z. The effect of specific immunotherapy on natural killer T cells in peripheral blood of house dust mite-sensitized children with asthma. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:148262.

65. Fernandez CS, Kelleher AD, Finlayson R, Godfrey DI, Kent SJ. NKT cell depletion in humans during early HIV infection. *Immunol Cell Biol* 2014;92:578-90.
66. Latour S. Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:510-4.
67. Huck K, Feyen O, Niehues T, et al. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* 2009;119:1350-8.
68. Fulcher DA, Avery DT, Fewings NL, et al. Invariant natural killer (iNK) T cell deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2009;157:365-9.
69. Sullivan KE. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:505-12.
70. Hong R. The DiGeorge anomaly (CATCH 22, DiGeorge/velocardiofacial syndrome). *Semin Hematol* 1998;35:282-90.
71. Markert ML, Hummell DS, Rosenblatt HM, et al. Complete DiGeorge syndrome: persistence of profound immunodeficiency. *J Pediatr* 1998;132:15-21.
72. Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 2001;139:715-23.
73. Barrett DJ, Ammann AJ, Wara DW, Cowan MJ, Fisher TJ, Stiehm ER. Clinical and immunologic spectrum of the DiGeorge syndrome. *J Clin Lab Immunol* 1981;6:1-6.
74. Land MH, Garcia-Lloret MI, Borzy MS, et al. Long-term results of bone marrow transplantation in complete DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:908-15.
75. Nowak R. Discovery of AT gene sparks biomedical research bonanza. *Science* 1995;268:1700-1.
76. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749-53.
77. McKinnon PJ. ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia. *Annu Rev Pathol* 2012;7:303-21.
78. Gatti RA, Berkel I, Boder E, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 1988;336:577-80.
79. Lakin ND, Weber P, Stankovic T, Rottinghaus ST, Taylor AM, Jackson SP. Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. *Oncogene* 1996;13:2707-16.
80. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 1995;4:2025-32.
81. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155-68.
82. BODER E, SEDGWICK RP. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 1958;21:526-54.
83. Boder E, Sedgwick RP. Ataxia-telangiectasia. (Clinical and immunological aspects). *Psychiatr Neurol Med Psychol Beih* 1970;13-14:8-16.
84. Boder E. Ataxia-telangiectasia: an overview. *Kroc Found Ser* 1985;19:1-63.
85. Gatti RA. Ataxia-telangiectasia. *Dermatol Clin* 1995;13:1-6.
86. Becker-Catania SG, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia. *Adv Exp Med Biol* 2001;495:191-8.
87. Biton S, Barzilai A, Shiloh Y. The neurological phenotype of ataxia-telangiectasia: solving a persistent puzzle. *DNA Repair (Amst)* 2008;7:1028-38.
88. Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM. Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. *J Pediatr* 2004;144:505-11.
89. Sedgwick RP BE. Ataxia-telangiectasia. In: Vinken P BG, Klawans H, ed. *Handbook of Clinical Neurology*. New York, USA: Elsevier; 1991:347-423.
90. Datta U, Sehgal S, Kumar L, et al. Immune status in ataxia telangiectasia. *Indian J Med Res* 1991;94:252-4.

91. Chopra C, Davies G, Taylor M, et al. Immune deficiency in Ataxia-Telangiectasia: a longitudinal study of 44 patients. *Clin Exp Immunol* 2014;176:275-82.
92. Paganelli R, Scala E, Scarselli E, et al. Selective deficiency of CD4+/CD45RA+ lymphocytes in patients with ataxia-telangiectasia. *J Clin Immunol* 1992;12:84-91.
93. Pashankar F, Singhal V, Akabogu I, Gatti RA, Goldman FD. Intact T cell responses in ataxia telangiectasia. *Clin Immunol* 2006;120:156-62.
94. Beichert M, Buchholz B, Gingelmaier A, Grubert T, Haberl A, Marcus U. Deutsch-Österreichische Leitlinie zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft und bei HIV-exponierten Neugeborenen AWMF-Register-Nr.055-002 Klasse: 2sk. AWMF online: Deutsche Aids Gesellschaft und Österreichische Aids Gesellschaft; 2011.
95. From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *JAMA* 1993;269:729-30.
96. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:973-80.
97. Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin Immunol* 2005;116:192-7.

## **7 Eidstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ort, Datum

Christine Bongartz

## **8 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Hans-Jürgen Laws, für die freundliche Überlassung des Themas und der Möglichkeit während meiner Famulatur in der Immunologischen Ambulanz, im direkten Patientenkontakt wertvolle Einblicke in die individuellen Krankheitsverläufe zu gewinnen. Bei meiner Betreuerin Dr. Kirsten Bienemann bedanke ich mich besonders für die zuverlässige und geduldige Unterstützung, die geschätzte, konstruktive Kritik und die angenehme Zusammenarbeit über den gesamten Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Team der Immunologischen Ambulanz für das Verständnis und die Unterstützung während der Datenerhebung und für die Integration der Aufklärungsgespräche in den klinischen Alltag bedanken.

Herrn Prof.Dr.Löhrer gilt mein ausgesprochener Dank für die zielführende Beratung in statistischen Fragen, für die er die freie Zeit mit seiner lieben Familie mehrfach opferte.

Bei Frau Beate M.J.Kau bedanke ich mich herzlich für die zahlreichen Aufmunterungen, den beharrlichen Glauben an das Gelingen meines Vorhabens sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner gesamten Familie für die tatkräftige und vielfältige Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich zutiefst für die Ermöglichung des Studiums, den Rückhalt und den Glauben an das Gelingen meiner Dissertation. Meinen Eltern, Schwiegereltern, Geschwistern und deren Familien bin ich sehr dankbar für die liebevolle Betreuung meiner Töchter Luise und Hannah.

Meiner Zwillingschwester Monika Hambach und meinem Schwager Dr. Norbert Hambach danke ich vielmals für die technische Unterstützung, kritischen Korrekturen bezüglich Format und Inhalt und die motivierenden Worte in jeder Lebenslage.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Ehemann Elmar Bongartz für die unermüdliche und großzügige Unterstützung, die rationalen Ratschläge, sowie den nötigen Freiraum zur Fertigstellung meiner Dissertation.