

Aus dem Institut für
Transplantationsdiagnostik und
Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
Leiter: Dr. med. Johannes Fischer

Innate lymphoid cells (ILCs) in peripherem Blut – Ermittlung der
Normwerte bei Kindern und Jugendlichen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thi Xuan Uyen Pham

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Tim Niehues

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Uhrberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Thi Xuan Uyen Pham, Sabrina B. Bennstein, Judith Klumb, Tim Niehues, Markus Uhrberg
(2022), Circulating Innate Lymphoid Cells (ILCs) in Healthy Children: Reference
Values for Evaluation of Treatment in Immunocompromised Pediatric
Patients, Journal of Clinical Immunology 42:1405–1408

Zusammenfassung

Angeborene lymphatische Zellen (ILC) sind mononukleäre Zellen, die keine variablen Antigenrezeptoren exprimieren und einen wichtigen Bestandteil der Schleimhautimmunität, mit Einfluss auf Gewebereparatur sowie Regulierung der Autoimmunität und Tumorummunität, sind. Bei Erwachsenen machen sie etwa 0,2 % der zirkulierenden Lymphozyten aus. Auf der Grundlage ihrer Expression von Transkriptionsfaktoren und ihrer Zytokinproduktion werden sie in verschiedene Gruppen unterteilt (ILC1, ILC2, ILC3, NK-Zellen, LT α -Zellen). ILCs wurden mit der Pathogenese seltener immunologischer und autoinflammatorischer Erkrankungen im Kindesalter in Verbindung gebracht. Systematisch erhobene ILC-Normwerte im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen gab es zu Beginn der Studie jedoch noch nicht.

In dieser Arbeit wurden absolute und relative Werte für ILCs im peripheren Blut verschiedener Altersgruppen - von 0 bis 18 Jahren - durchflusszytometrisch bestimmt (n = 148). Der Anteil der ILCs an den zirkulierenden Lymphozyten bei Kindern und Jugendlichen beträgt in dieser Kohorte 0,52 % ($\pm$ 0,4 SD). Damit ist der Anteil der ILC an den Lymphozyten bei Kindern und Jugendlichen deutlich höher als der für Erwachsene publizierte Wert von (Spits, H. & Cupedo T., 2012). Sowohl der prozentuale Anteil von ILCs und ILC1 in den Lymphozyten als auch ihre Anzahl pro μ l Blut nehmen signifikant mit zunehmendem Alter deutlich ab (0-1 Jahre [0,82% ILCs $\pm$ 0,65; 44,69 ILCs/ μ l Blut $\pm$ 58,71; 0,69% ILC1 $\pm$ 0,5; 37,62 ILC1s/ μ l Blut $\pm$ 55,42], 2-5 Jahre: [0,46% $\pm$ 0,34; 20,26/ μ l $\pm$ 18,1; 0,42% $\pm$ 0,41; 13,59/ μ l $\pm$ 15,59], 6-12 Jahre: [0,41% $\pm$ 0,55; 13,49/ μ l $\pm$ 13,09; 0,26% $\pm$ 0,55; 9,02/ μ l $\pm$ 11,57], 13-18 Jahre: [0,39% $\pm$ 0,4; 13,4/ μ l $\pm$ 10,26; 0,22% $\pm$ 0,39; 8,8/ μ l $\pm$ 8,7]; p-value < 0,05). Die gleiche Entwicklung ist bei ILC2 und ILC3 zu beobachten, obwohl hier die Abnahme der Frequenz mit dem Alter nicht signifikant ist: (0-1 Jahre [3,07 ILC2/ μ l Blut $\pm$ 2,21], 13-18 Jahre [2,29/ μ l $\pm$ 2,52] & 0-1 Jahre [4 ILC3/ μ l $\pm$ 3,44], 13-18 Jahre [2,4/ μ l $\pm$ 1,71]).

Die Kenntnis dieser Normalwerte bildet eine wichtige Grundlage für die Interpretation der Verringerung oder Vermehrung der ILCs im Zusammenhang mit Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter.

Abstract

Innate lymphoid cells (ILC) are mononuclear cells that do not express variable antigen receptors and are an important component of mucosal immunity, influencing tissue repair and regulating autoimmunity and tumor immunity. In adults, they make up about 0.2 % of circulating lymphocytes. Based on their expression of transcription factors and their cytokine production, they are divided into different groups (ILC1, ILC2, ILC3, NK cells, LT α i cells). ILCs have been implicated in the pathogenesis of rare immunologic and autoinflammatory diseases in childhood. Systematically collected ILC standard values in the peripheral blood of children and adolescents did not exist at the beginning of the study.

In this study, absolute and relative values for ILCs in peripheral blood of different age groups - from 0 to 18 years - were determined by flow cytometry (n = 148). The proportion of ILCs in the circulating lymphocytes in children and adolescents in this cohort was 0.52 % ($\pm$ 0.4 SD). This means that the percentage of ILCs in lymphocytes in children and adolescents is significantly higher than the value published for adults by (Spits, H. & Cupedo T., 2012). Both the percentage of ILCs and ILC1 in the lymphocytes and their number per μ l of blood decrease significantly with increasing age (0-1 years [0.82% ILCs $\pm$ 0.65; 44.69 ILCs/ μ l blood $\pm$ 58.71; 0.69% ILC1 $\pm$ 0.5; 37.62 ILC1s/ μ l blood $\pm$ 55.42], 2-5 years: [0.46% $\pm$ 0.34; 20.26/ μ l $\pm$ 18.1; 0.42% $\pm$ 0.41; 13.59/ μ l $\pm$ 15.59], 6-12 years: [0.41% $\pm$ 0.55; 13.49/ μ l $\pm$ 13.09; 0.26% $\pm$ 0.55; 9.02/ μ l $\pm$ 11.57], 13-18 years: [0.39% $\pm$ 0.4; 13.4/ μ l $\pm$ 10.26; 0.22% $\pm$ 0.39; 8.8/ μ l $\pm$ 8.7]; p-value < 0.05). The same trend is observed for ILC2 and ILC3, although here the decrease in frequency with age is not significant: (0-1 years [3.07 ILC2/ μ l blood $\pm$ 2.21], 13-18 years [2.29/ μ l $\pm$ 2.52] & 0-1 years [4 ILC3/ μ l $\pm$ 3.44], 13-18 years [2.4/ μ l $\pm$ 1.71]).

Knowledge of these normal values forms an important basis for the interpretation of the reduction or increase in ILCs in connection with diseases in childhood and adolescence.

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AG	Aktiengesellschaft
APC	Allophycocyanin
ASK	Arthroskopie
AT	Adenotomie
ATO	Adenotonsillektomie
BCR	B-Zell-Rezeptor
bds.	beidseitig
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	cord blood
CC	Zirkumzision
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
CILP	common innate lymphoid precursor
CHILP	common helper innate lymphoid precursor
CLP	common lymphoid precursor
CMP	common myeloid precursor
CRP	C-reaktives Protein
CRTH2	chemo-attractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells
DC	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EILP	early innate lymphoid cell precursor
engl.	englisch
ESIN	elastische stabile intramedulläre Nagelung
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	flow cytometry standard data
FSC	forward scatter

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK	Fremdkörper
g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HSC	hematopoietic stem cells
Id2	inhibitor of dna binding 2
IL	Interleukine
ILC	innate lymphoid cell
ILCP	innate lymphoid cells precursor
IOL	Intraokularlinse
ITN	Intubationsnarkose
ITZ	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
kg	Kilogramm
KIR	killerzellenimmunglobulinähnliche Rezeptoren
KLR	killerzellenlektinähnliche Rezeptoren
li.	links
Lin⁻	Lineage negative
LJ	Lebensjahr
LTs	Lymphotoxine
LTi	lymphoid tissue inducer
MHC	major histocompatibility complex
ME	Metallentfernung
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NCR	natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren
NRI	Nasenracheninspektion
OP	Operation
OSG	oberes Sprunggelenk

PB	peripheres Blut
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PC	Parazentese
PE	Phycoerythrin
PR	Paukenröhrchen
Proc.	Processus
prox.	proximal
PRR	pattern recognition receptors
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger
RCF	relative centrifugal force
re.	rechts
Re-	wiederholt
rpm	revolutions per minute
s.	siehe
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SH	Schenkelhals
sog.	sogenannten
SSC	side scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TO	Tonsillektomie
TW	Tränenweg
US	Unterschenkel
USTO	Umstellungsosteotomie
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach
°C	Grad Celsius
%	Prozent
#	Fraktur

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	3
1.2 Entdeckung der ILCs	4
1.3 Charakterisierung der innaten Lymphozyten	4
1.4 ILC1	5
1.5 ILC2	6
1.6 ILC3	8
1.7 NK-Zellen	9
1.8 LTαi-Zellen	10
1.9 ILCs in der Schwangerschaft	11
1.10 Entwicklung der Immunzellen und ILCs im weiteren Leben	12
1.11 Klinische Relevanz	13
1.12 Geweberesidente vs. zirkulierende ILCs	15
1.13 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Medien	18
2.1.3 Chemikalien	19
2.1.4 Antikörper	19
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.6 Software	21
2.1.7 Angaben zum Patientenkollektiv	21
2.1.8 Probengewinnung	29
2.2 Aktenzeichen des Ethikvotums	30
2.3 Methoden	30
2.3.1 Protokoll zur Aufarbeitung der gewonnenen Blutproben	30
2.3.2 Vorbereitung des Antikörper-Mixes	32

2.4 Prinzip der Durchflusszytometrie	33
2.5 Analyse der Studienproben mittels Durchflusszytometrie.....	34
2.6 Statistik.....	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Normwerte der ILCs bei Kindern und Jugendlichen	38
3.1.1 Abnahme der absoluten und relativen ILC-Gesamtzellzahl	38
3.1.2 Signifikante Abnahme der absoluten ILC1-Zellzahl	39
3.1.3 Keine signifikante Abnahme der relativen als auch der absoluten ILC2-Zellzahl	40
3.1.4 Keine signifikante Abnahme der relativen und absoluten ILC3-Zellzahl	41
3.2 Normwerte weiterer ILC-Subpopulationen	45
3.2.1 Signifikante Abnahme der relativen und absoluten ILC1 mit CD5 ⁺ CD161 ⁻ -Expression	45
3.2.2 Signifikante Zunahme der relativen Zellzahl der ILC1 CD5 ⁺ CD161 ⁺	46
3.3 Fazit	50
4 Diskussion	53
4.1 Ermittlung der Normwerte bei Kindern und Jugendlichen	53
4.2 Limitation.....	55
4.3 Referenzwerte für die Pädiatrie.....	55
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	58
6 Anhang	74
6.1 Einverständniserklärungen und Patienteninformation.....	74

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem wird in ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem unterteilt. Diese beiden Anteile des Immunsystems arbeiten eng miteinander zusammen, um Infektionen des Körpers zu verhindern und falls Infektionen auftreten, gravierende Folgen von Infektionen abzuwenden (Medina, 2016).

Die Zellen des Immunsystems entstehen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Es gibt eine myeloische und lymphatische Zellreihe. Aus den myeloischen Vorläuferzellen entwickeln sich Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Mastzellen, Granulozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten (aus denen später Thrombozyten entstehen); aus den lymphatischen Vorläuferzellen die NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen und ILCs (*innate lymphoid cells*) (Aggarwal et al., 2012, Eberl et al., 2015).

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem (Synonym: unspezifisches Immunsystem) arbeitet bereits bei Geburt und kann direkt nach wenigen Minuten bis Stunden nach Exposition pathogener Mikroorganismen, wie z. B. Viren und Bakterien, auf diese effektiv und protektiv reagieren (Medina, 2016).

Für die Protektion des Körpers stehen verschiedenen Mechanismen bzw. Barrieren des Körpers zur Verfügung (McComb et al., 2019). Die Haut und die Schleimhäute des Körpers stellen die erste Barriere gegen pathogene Erreger dar. Ein weiterer Mechanismus des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem.

Eine der wichtigen Immunzellen des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten Phagozyten. Diese können Mikroorganismen oder andere extrazelluläre unbekannte Stoffe aufnehmen und abtöten. Zu den Phagozyten zählen die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die Granulozyten.

Die Makrophagen (engl. *scavenger cells*) induzieren eine Inflammation an der Körperstelle, an der ein pathogener Erreger in den Körper gedrunen ist. Die Induktion einer Inflammation ist wichtig für eine erfolgreiche lokale Immunantwort und verhindert somit eine systemische Ausbreitung der Infektion. Phagozyten werden von IFN γ aktiviert (Le Page et al., 2000). IFN γ werden in die Gruppe der Zytokine eingeordnet, die sowohl autokrin, parakrin als auch endokrin wirken können. Zytokine, die insbesondere von Leukozyten aktiviert werden oder auf sie reagieren, werden als Interleukine (IL) bezeichnet. Ein gängiges Interleukin, das unter anderem bei der Diagnostik einer Infektion im Neugeborenenalter hinzugezogen wird, ist das Interleukin-6 (IL-6). Das IL-6 ist in Kombination mit dem C-reaktiven Protein, ein valider Marker für eine early onset sepsis/neonatale Sepsis (Eichberger and Resch, 2022).

Die dendritischen Zellen (DC) werden auch antigenpräsentierende Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC) genannt. Sie können, wie der Name schon sagt, den Lymphozyten Antigene präsentieren und bilden somit ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. DC spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem: Bei Detektion von Erregern können sie verschiedene Zytokine ausschütten, die dann andere Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren und die Immunantwort effektiv verstärken können.

Zu der Gruppe der Granulozyten (Synonym: polymorphkernige Leukozyten) gehören die basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Die basophilen und eosinophilen Granulozyten sind essenziell für die Abwehr von Parasiten. Die wichtigste Granulozytenpopulation im angeborenen Immunsystem sind die neutrophilen Granulozyten (McComb et al., 2019). Da sie wie oben beschrieben zur Gruppe der Phagozyten gehören, können sie pathogene Mikroorganismen in ihre Zelle aufnehmen und in intrazellulären Vesikeln mithilfe von verschiedenen Enzymen abtöten.

Eine weitere wichtige Zellpopulation der angeborenen Immunität sind die *innate lymphoid cells*. Die fünf Gruppen der *innate lymphoid cells* (ILC1, NK-Zellen, ILC2, ILC3 und LTi-Zellen) und deren Funktionen werden in den Kapiteln 1.4-1.8 besprochen.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird parallel zum angeborenen aktiviert. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive Immunsystem meist erst nach mehreren Stunden bis Tagen aktiv, dafür aber spezifischer als das angeborene, z. B. durch eine spezifischere Antigenantwort durch B- und T-Lymphozyten.

Die Lymphozyten zirkulieren im Blut und in der Lymphflüssigkeit, wobei eine besonders hohe Anzahl im lymphatischen Gewebe oder lymphatischen Organen zu finden ist. Zu den primär-zentralen lymphatischen Organen gehören der Thymus und das Knochenmark; zu den sekundär-peripheren zählen die Lymphknoten, die Milz und das mukosale lymphatische Gewebe wie z. B. des Darms, der Atemwege und des Urogenitaltrakts (Breslin et al., 2018, Ansel and Cyster, 2001).

Sobald ein Antigen an den T-Zell-Rezeptor (TCR) eines T-Lymphozyten bindet, entsteht aus einer naiven bzw. ungeprägten T-Zelle eine T-Effektorzelle. Das Besondere an T-Zellen ist, dass sie nur Peptidfragmente erkennen können, wenn diese auf den Oberflächen körpereigener Zellen präsentiert werden (Smith-Garvin et al., 2009). T-Effektorzellen, die über den spezifischen Antigenrezeptor ihr Antigen erkannt haben, vermehren sich klonal, sodass aus einer Effektorzelle eine ganze Kolonie entstehen kann. Man teilt die T-Effektorzellen in zytotoxische, regulatorische und T-Helferzellen ein, die jeweils verschiedene Funktionen haben.

Das Besondere an B-Lymphozyten ist, dass sie zum einen selbst Antigene erkennen und zum anderen Antigene den T-Lymphozyten präsentieren können. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche den sog. B-Zell-Rezeptor (BCR) (Treanor, 2012). Sobald ein Antigen an ein B-Lymphozyt und dessen BCR bindet, bilden sich Plasmazellen durch Proliferation und Differenzierung aus. Diese Plasmazellen sezernieren dann Antikörper (oder auch Immunglobuline), die dann spezifisch das Antigen erkennen, mit dem sie vorher Kontakt hatten und können bei einem späteren erneuten Kontakt eine effektive spezifische Immunantwort für dieses Antigen auslösen.

1.2 Entdeckung der ILCs

In den Jahren 2008/2009 entdeckten mehrere unabhängige Forschungsgruppen eine lymphoide Zellpopulation, die zuvor noch nie beschrieben wurde (Vivier et al., 2016, Spits et al., 2013). Diese Zellen wurden als *innate lymphoid cells* (ILCs) deklariert. Die ILCs konnten nicht zu den B- oder T-Zellen zugeordnet werden, weil ihnen antigenspezifische Rezeptoren fehlten (Spits et al., 2013, Walker et al., 2013). Sie exprimieren somit kein CD1a und CD123 (Expression auf DC), CD14 (Expression auf Makrophagen bzw. Monozyten), CD19 (Expression auf B-Zellen und DC), CD20 (Expression auf B-Zellen), CD3, TCR $\alpha\beta$ und TCR $\gamma\delta$ (T-Zellen), Fc ϵ R1 α (Expression auf Mastzellen und basophilen Zellen), CD94 (Expression auf NK- und T-Zellen) und CD34 (Expression auf hämatopoetischen Stammzellen) (Bianca Bennstein et al., 2019, Swieboda et al., 2019). Somit kann man die ILCs auch als *Lineage-negative* (Lin⁻)-Zellen bezeichnen. ILCs exprimieren den Interleukin 7 Rezeptor, IL-7R α (auch: CD127) (Spits et al., 2013), wobei IL-7 als essentiell für die Entwicklung aller ILC-Populationen beschrieben wird (Diefenbach, 2013).

Zu Beginn dieser Arbeit im Jahre 2019 existierten bereits Daten zu ILCs in murinen Studien. Humane Daten, zu zirkulierenden ILCs bei Menschen und besonders bei Kindern und Jugendlichen, waren in der Literatur rar (Hazenberg and Spits, 2014, Bianca Bennstein et al., 2019, Vely et al., 2016).

1.3 Charakterisierung der innaten Lymphozyten

Die ILCs wurden initial definiert als Lin⁻CD127⁺CD161⁺-Zellen (Bjorklund et al., 2016, Artis and Spits, 2015, Montaldo et al., 2016, Mjosberg and Spits, 2016).

Anhand ihrer Expression von Transkriptionsfaktoren, ihrer Zytokinproduktion und funktionalen Eigenschaften (Klose et al., 2014) wurden die ILCs initial in drei Gruppen unterteilt: die Gruppe 1 ILC oder ILC1 (beinhalten NK-Zellen und ILC1), die Gruppe 2 ILC oder ILC2 und die Gruppe 3 ILCs oder ILC3 (beinhalten LT_i-Zellen und ILC3).

Im Laufe der Jahre und mit weiterer Forschung an den ILCs wurden sie im Jahre 2018 in fünf verschiedene Gruppen unterteilt (Vivier et al., 2018). Diese Unterteilung gilt bis heute. Die NK- und LT_i-Zellen zählen nun als einzelne Gruppen der ILCs (Vivier et al., 2018),

sodass nun die ILC1, NK-Zellen, ILC2, ILC3 und LTi-Zellen als die fünf Gruppen der ILCs beschrieben werden.

In unserer Arbeitsgruppe werden die ILC1, ILC2 und ILC3 definiert als $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD94}^-$. Einfachheitshalber werden die ILC1-ILC3 als ILCs in dieser Arbeit deklariert. Die NK- und LTi-Zellen werden der Vollständigkeit halber in den Kapiteln 1.7 und 1.8 ebenfalls kurz thematisiert, werden jedoch nicht tiefergehend analysiert.

1.4 ILC1

ILC1 wurden initial als $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD117}^- \text{CRTH2}^-$ -Zellen beschrieben (Bernink et al., 2013, Spits et al., 2013, Bjorklund et al., 2016). In unserer Arbeitsgruppe werden die ILC1 als $\text{Lin}^- \text{CD127}^+ \text{CD94}^- \text{CD161}^{+/-} \text{CD5}^{+/-} \text{CD117}^- \text{CRTH2}^-$ definiert (Bennstein and Uhrberg, 2021, Uyen Pham et al., 2022).

Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor (TF) T-bet und sind bei Stimulation durch IL-12 und IL-18 dazu in der Lage, $\text{IFN}\gamma$ zu produzieren. IL-12 wird von Makrophagen und dendritischen Zellen bei Infektionen mit verschiedenen Krankheitserregern produziert und wirkt mit IL-18 synergistisch stimulierend auf die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion (Schroder et al., 2004). Beim Menschen findet man die ILC1 in verschiedenen Geweben des Körpers (Juelke and Romagnani, 2016): im MALT der Tonsillen und des Gastrointestinaltrakt (Bernink et al., 2013, Fuchs et al., 2013), in hepatischen Zellen (Marquardt et al., 2015), im Endometrium und der Dezidua des Uterus (Vacca et al., 2015) und eine geringe Frequenz in der Haut (Villanova et al., 2014).

Ihnen wird neben der protektiven Rolle bei der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen eine pathophysiologische Rolle in der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zugeschrieben. Eine ILC1-Akkumulation wurde im Darm von Patienten mit Morbus Crohn (Bernink et al., 2013) und mit Colitis ulcerosa (Forkel et al., 2019) detektiert. Im terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn wurde eine bis zu 15-fache höhere $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration gemessen (Li et al., 2016).

Interessanterweise findet man Moleküle, die von T-Zellen exprimiert werden, wie CD5 (Nagasawa et al., 2017) und CD28 (Bjorklund et al., 2016, Bennstein et al., 2021, Roan et al., 2016), die ebenfalls von den ILC1 exprimiert werden.

In unserer Arbeitsgruppe detektierten wir aus dem Nabelschnurblut (engl. *cord blood/CB*) vier ILC1-Subpopulationen: $CD5^+CD161^-$, $CD5^+CD161^+$, $CD5^-CD161^-$, $CD5^-CD161^+$ (Bennstein et al., 2020). CD5 wird von naiven T-Zellen, Effektor-T-Zellen und Thymozyten exprimiert (Voisinne et al., 2018). Es verstärkt Signale, die T-Zellen aktivieren und ist erforderlich für die optimale Th2- und Th17-Differenzierung (Smith-Garvin et al., 2009). Der Oberflächenmarker CD161 (auch KLRB1) wird außer auf ILCs noch auf NK-Zellen und T-Zellen exprimiert. Auf NK-Zellen reguliert CD161 deren Zytotoxizität (Kurioka et al., 2018). Die Mehrheit der ILC1 im CB zeigte eine $CD5^+CD161^-$ -Expression, die Minderheit eine $CD5^-CD161^+$ -Expression. Die Produktion von $IFN\gamma$ war nur bei $CD161^+$ zu detektieren, womit die Mehrheit der ILC1 im CB funktional unreif sind, dafür aber durch Expression von Chemokinen wie CCR4, CCR7 und CCR9 eine gewisse Migrationsfähigkeit in verschiedene Gewebe besitzen (Bennstein et al., 2020). Bemerkenswert war außerdem, dass alle vier ILC1-Subpopulationen die Fähigkeit hatten, sich in reife NK-Zellen zu differenzieren. Deswegen werden in unserer Arbeitsgruppe die ILC1 als $Lin^-CD127^+CD94^-CD161^{+/-}CD5^{+/-}CD117^-CRTH2^-$ definiert (Bennstein and Uhrberg, 2021, Uyen Pham et al., 2022).

Das Molekül CD28 ist als costimulierender Rezeptor auf der Oberfläche von naiven T-Zellen bekannt. Es bindet an die Liganden CD80 und CD86, die von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden und aktivieren somit die T-Zelle, fördert die Proliferation, die Zytokinproduktion und das Überleben der Zelle (Smith-Garvin et al., 2009). Die Funktion von CD28 bei ILC1, aber auch bei ILC2 und ILC3, ist bisher ungeklärt (Roan et al., 2016, Bennstein et al., 2021).

1.5 ILC2

ILC2 werden als $Lin^-CD127^+CD94^-CRTH2^+CD117^{+/-}$ beschrieben (Spits et al., 2013, Mjosberg et al., 2011, Uyen Pham et al., 2022). Initial wurden die ILC2 auch als *innate helper 2 cells*, *nuocytes* oder *natural helper cells* bezeichnet (Moro et al., 2010, Neill et al., 2010). Sie exprimieren den TF GATA-3. Unter Stimulation von IL-25 und IL-33 sind sie dazu in der Lage, Th2-vermittelte Zytokine wie IL-5 und IL-13 auszuschütten (McKenzie et al., 2014). IL-33 aktiviert nicht nur ILC2, sondern auch Mastzellen (Lefrancais et al., 2014).

Das Molekül CRTH2 (engl. *chemo attractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells*), auch CD294 (Swieboda et al., 2019), ist nur bei den ILC2 von allen ILC-Gruppen zu finden und ist somit entscheidender und spezifischer Faktor für die Definition der ILC2. Außerdem kann man die ILC2 anhand ihrer quantitativen CD117-Expression in ILC2 mit (CD117^{high}) oder fehlender Expression von CD117 (CD117^{low}) einteilen: Die CD117^{low} ILC2 haben ein hohes Potenzial Th2-vermittelte Zytokine zu produzieren (IL-5 und IL-13). Im Vergleich dazu haben die CD117^{high} ILC2 ein höheres Potenzial IFN γ (unter Stimulation von IL-12 und IL-2) und IL-17A (unter Stimulation von IL-2, IL-1 β , IL-23) zu produzieren. Somit kann man die ILC2 in zwei Gruppen unterteilen, die verschiedene Zytokinmerkmale haben und den Körper auf verschiedene Arten beeinflusst (Hochdorfer et al., 2019).

ILC2 befinden sich in verschiedenen Körpergeweben (Juelke and Romagnani, 2016). Beim Menschen findet man die ILC2 in der Lunge (Monticelli et al., 2011), im Gastrointestinaltrakt (Mjosberg et al., 2011, Diefenbach, 2013), in der Haut (Kim, 2015, Teunissen et al., 2014), im Fettgewebe (Brestoff et al., 2015), in den Tonsillen (Bernink et al., 2013), in den nasalen Polypen (Mjosberg et al., 2011) und in der Dezidua des Endometriums bei schwangeren Frauen (Vacca et al., 2018). Die ILC2 wurden bisher von einigen Arbeitsgruppen als der größte Anteil an zirkulierenden ILCs im peripheren Blut bei Erwachsenen beschrieben (Hazenbergh and Spits, 2014, Spits and Cupedo, 2012), nehmen mit dem Alter jedoch signifikant ab (Vely et al., 2016).

ILC2 haben, wie alle anderen ILCs auch, sowohl protektive als auch krankheitsfördernde Wirkungen auf den Körper. Anhand ihres Zytokinprofils mit IL-5 und IL-13 können sie, zum einen protektiv bei Parasiten- und Wurmbefall wirken (Fallon et al., 2006), zum anderen begünstigen sie allergische Reaktionen und Asthma bronchiale (Yu et al., 2014, Kim et al., 2016, Morita et al., 2016).

Bei Adipositas-Patienten konnte eine verminderte ILC2-Frequenz im Fettgewebe ermittelt werden. ILC2 können somit den Fettmetabolismus regulieren, fördern die Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe und wirken somit protektiv gegen Adipositas (Brestoff et al., 2015, Moro et al., 2010). Eine Beteiligung von ILC2 wird auch bei chronischen Erkrankungen im Menschen beschrieben (Serafini et al., 2015). Dazu gehören die Entstehung bzw. Aggravierung einer atopischen Dermatitis (Salimi et al., 2013), einer hepatischen Fibrose (McHedlidze et al., 2013) und einer pulmonalen Fibrose (Hams et al., 2014). Eine

Akkumulation von ILC2 findet sich bei dem Krankheitsbild der chronischen Rhinosinusitis in den nasalen Polypen bei betroffenen Patienten (Mjosberg et al., 2011).

Das Feld der ILC2 wurde in den letzten Jahren besonders stark erforscht, weitere Erkenntnisse sind jedoch noch notwendig, um mehr zu den Funktionen, besonders auch den protektiven und nicht nur den pathologisch-fördernden, zu erkennen und zu behandeln.

1.6 ILC3

Initial wurden ILC3 als Lin⁻CD127⁺CD161⁺CD117⁺CD56^{+/-}-Zellen beschrieben (Cella et al., 2009, Spits et al., 2013).

Sie exprimieren den TF ROR γ t und reagieren auf IL-1 β und IL-23 mit einer IL-17- und/oder IL-22-Produktion (Crellin et al., 2010). IL-17A ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Produktion von antimikrobiellen Peptiden induziert und neutrophile Granulozyten rekrutiert (Spits and Di Santo, 2011). Zu hohe IL-17A-Produktion kann jedoch im Gewebe eine entzündungsfördernde Wirkung haben (Eyerich et al., 2010). IL-22 ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, das eine interaktive Funktion mit z. B. Epithelzellen des Darms und Keratinozyten der Haut besitzt und darauffolgend antimikrobielle Peptide wie β -Defensin ausschütten kann, um somit einen Schutz gegen Pathogene zu bilden (Sonnenberg et al., 2011, Spits and Di Santo, 2011). Eine unkontrollierte übermäßige IL-22-Produktion jedoch wurde in Zusammenhang mit Auftreten von kolorektalen Karzinomen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet (Kirchberger et al., 2013). IL-17A und IL-22 haben somit protektive und schädigende Funktionen. Beispielhaft wurde die Zytokinsituation bei pathologischer Atemwegsentszündung nach Bleomycin-Gabe (Medikament zur Behandlung von Lymphomen) beobachtet (Sonnenberg et al., 2011): Sind IL-17A und IL-22 vorhanden, wirken sie eher synergistisch und eine entzündende, gewebeschädigende Wirkung überwiegt. Bei einem Fehlen von IL-17A wurde eine Gewebereparatur durch IL-22 beobachtet. Ob dieser Mechanismus auf weitere Gewebe des Körpers übertragen werden kann, ist noch zu erforschen.

Man findet sie in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers (Montaldo et al., 2015a): in den Tonsillen (Cupedo et al., 2009, Cella et al., 2009), in der Lamina propria des Darms (Cupedo et al., 2009, Cella et al., 2009, Satoh-Takayama et al., 2008), in der Milz

(Magri et al., 2014), im Endometrium und der Dezidua des Uterus (Vacca et al., 2015, Vacca et al., 2018). Unter inflammatorischen Bedingungen sind die ILC3 auch in der Haut (Teunissen et al., 2014), in der Lunge (Kim et al., 2014) und in der Leber (Matsumoto et al., 2013) zu detektieren.

Die ILC3 spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von extrazellulären Pathogenen, in der Gewebemöostase und in der Regulation von entzündlichen pathologischen Erkrankungen (Spits and Cupedo, 2012, McKenzie et al., 2014). Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Sonnenberg and Artis, 2012) konnte eine verminderte Frequenz von ILC3 und dafür eine Akkumulation von ILC1 festgestellt werden (Bernink et al., 2013). Eine Akkumulation von ILC3 findet man in Hautläsionen und im PB von Patienten mit Psoriasis (Teunissen et al., 2014, Villanova et al., 2014).

Ein großer Unterschied zwischen zirkulierenden und geweberesidenten ILC3 ist die IL-17A und IL-22 Expression. Sowohl zirkulierende ILC3 im CB als auch im PB schütten kein IL-17A und IL-22 aus, bei den geweberesidenten ILC3 sind diese beiden Zytokine jedoch Hauptmerkmal der ILC3 (Lim et al., 2017, Bennisstein et al., 2021). Deswegen werden sie in unserer Arbeitsgruppe als Lin⁻CD127⁺CD94⁻CD117⁺ definiert (Bennisstein et al., 2021, Uyen Pham et al., 2022).

1.7 NK-Zellen

NK-Zellen wurden im Jahre 1975 entdeckt (Kiessling et al., 1975).

Die CD127⁺CD161⁺CD94⁺CD56⁺-Zellen (Caligiuri, 2008, Artis and Spits, 2015) sind unersetzbar in ihrer Funktion im angeborenen Immunsystem. Sie können infizierte und potenziell entartete Körperzellen, ohne spezifische Antigenrezeptoren, erkennen und eliminieren (Ljunggren and Karre, 1990, Cooper et al., 2001a, Biron et al., 1999).

Die NK-Zellen können anhand ihrer quantitativen CD56-Expression in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden. Die NK-Zellen mit hoher CD56-Expression (CD56^{bright} NK-Zellen) produzieren eine große Menge an Zytokinen wie IFN γ und TNF α , sind dafür aber kaum zytotoxisch aktiv (Trinchieri, 1989, Cooper et al., 2001a, Serafini et al., 2015). Die NK-Zellen mit niedriger CD56-Expression (CD56^{dim} NK-Zellen) sind die dominantere

Population der NK-Zellen und zytotoxisch wirksam (Cooper et al., 2001b, Montaldo et al., 2013, Montaldo et al., 2014, Montaldo et al., 2016). Im peripheren Blut können die NK-Zellen bis zu 15% an den Gesamtlymphozyten ausmachen. Davon sind um die 90% von ihnen CD56^{dim} NK-Zellen (Montaldo et al., 2016).

Sie besitzen aktivierende und inhibitorische Rezeptoren, die essenziell für die Interaktion mit anderen Körperzellen sind (Quatrini et al., 2021). Die zwei großen Rezeptorfamilien der NK-Zellen sind die killerzellenimmunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR) und die killerzellenlektinähnliche Rezeptoren (KLR) (Arase and Lanier, 2002). Die beiden Rezeptorfamilien der NK-Zellen können, je nach Signallage, aktivierend oder inhibitorisch wirken. Andere aktivierende Rezeptoren sind die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs), wie z. B. NKp46 (Quatrini et al., 2021).

Körperzellen exprimieren normalerweise *Major Histocompatibility Complex* (auch: MHC)-I-Moleküle (außer die Erythrozyten), die sie auf ihrer Oberfläche tragen. Zirkulieren NK-Zellen um diese Körperzellen werden diese nicht abgetötet, da die inhibitorischen Rezeptoren auf den NK-Zellen die MHC-I-Moleküle erkennen und die NK-Zelle nicht aktiviert wird. Eine infizierte Körperzelle, z. B. durch einen Virus, oder eine Körperzelle mit Entartungspotenzial, weist ein verändertes MHC-Molekül auf. Das MHC-Molekül wird vermindert oder gar nicht mehr exprimiert (so genanntes *missing self*). Diese Körperzellen weisen dann kein MHC-I-Molekül auf der Oberfläche auf. Infolgedessen werden die NK-Zellen nicht inhibiert, eine pathologische Veränderung wird erkannt und die entsprechende Zelle eliminiert. Die Veränderungen der Zelle bezeichnet man als *stress-induced self* (Quatrini et al., 2021, Ljunggren and Karre, 1990). Die Elimination der pathologischen Zellen erfolgt durch die Ausschüttung von Granulainhalten aus den NK-Zellen: porenbildendes Perforin und Granzym. Sie induzieren bei der infizierten oder geschädigten Körperzelle einen programmierten Zelltod (Synonym: Apoptose).

1.8 LTi-Zellen

Erstmals wurden die Lymphgewebeinduktorzellen, auch: LTi-Zellen (engl. *lymphoid tissue inducer cells*), in neonatalen Lymphknoten von Mäusen beschrieben (Kelly and Scollay, 1992). Bei den Menschen werden diese Zellen als Lin⁻CD127⁺CD117⁺RORγt⁺CD4⁻

identifiziert. Sie entwickeln sich aus der fetalen Leber, zirkulieren im Blut und wandern zu den Orten der Lymphknotenbildung (Mebius et al., 1997, Mebius et al., 1996) und in den Darm, um die Bildung von Peyer'schen Plaques (Yoshida et al., 1999, Montaldo et al., 2015a) zu initiieren. Eine Interaktion mit Stromazellen und die Produktion von verschiedenen Zytokinen macht die Bildung der vorher genannten Körperstrukturen möglich. Die Moleküle, die für die Entwicklung von Lymphknoten und von Peyer'schen Plaques benötigt werden, sind die sogenannten Lymphotoxine (LTs) (Mebius et al., 1997, Mebius et al., 1996, Mebius, 2003), die zu der TNF-Familie gehören. Die Art der Lymphknotenbildung hängt von den verschiedenen Signalen und Proteinen ab, die zum einen selbst von den LT_i-Zellen gebildet und ausgeschüttet werden und zum anderen von den umliegenden Stromazellen, die bei Stimulation von den LT_i-Zellen ebenfalls verschiedene Zytokine ausschütten können. Zur beispielhaften Darstellung wird die Entwicklung von zervikalen und mesenterialen Lymphknoten, möglicherweise auch von Lymphknoten im Bereich des Sakrums und der Lenden, vom LT- α_3 initiiert (Mebius, 2003).

Das Heterotrimer LT $\alpha_2\beta_1$, meist vereinfacht auch nur als LT β bezeichnet, wird von den LT_i-Zellen exprimiert, bindet an den LT β -Rezeptor an den verschiedenen Lymphknotenanlagen und ist für die Entwicklung von allen Lymphknoten notwendig (Mebius, 2003, Honda et al., 2001). Nach Bindung an die Rezeptoren produzieren die umliegenden Stromazellen verschiedene Zytokine, die weitere LT_i-Zellen rekrutieren und die Bildung von Lymphknoten und Peyer'sche Plaques weiter hervorbringen.

1.9 ILCs in der Schwangerschaft

Während der Schwangerschaft sind ILCs in der Dezidua des Endometriums der Gebärmutter, in der Amnionflüssigkeit, aber auch im peripheren Blut der Mutter zu finden (Mendes et al., 2020, Zhao et al., 2022). Die ILC1, die eine wichtige Rolle in der Abwehr intrazellulärer Erreger anhand ihrer IFN γ -Expression spielen, sind besonders in hoher Frequenz in der 9.-12. Schwangerschaftswoche in der Dezidua des Endometriums zu finden (Vacca et al., 2015, Vacca et al., 2018, Montaldo et al., 2015b). Eine erhöhte ILC2-Frequenz wurde besonders in der Dezidua bei schwangeren Frauen mit vorzeitigen Wehen gemessen: Die Vermutung der Arbeitsgruppe war, dass die proinflammatorischen Zytokine (IL-5, IL-13) vorzeitige Wehen

pathologisch fördern könnten (Xu et al., 2018). Die ILC3 sind reichlich bis zum Ende des 2. Trimesters in der Amnionflüssigkeit zu finden. Danach sinkt ihre Frequenz (Marquardt et al., 2016). Für den Fetus sind die LT_i-Zellen von besonderer Bedeutung, weil sie eine essenzielle Rolle für die Lymphknotenbildung und die Bildung von den Peyer'schen Plaques haben (Kyriazis and Esterly, 1970, Cupedo et al., 2009). Die NK-Zellen sind wichtig bei der Plazentation des Embryos (Hanna et al., 2006, Tirado-Gonzalez et al., 2012).

Eine Arbeitsgruppe detektierte die zirkulierenden ILC2 als die am höchsten frequente ILC-Gruppe bei schwangeren Frauen (Zhao et al., 2022).

1.10 Entwicklung der Immunzellen und ILCs im weiteren Leben

Die Zusammensetzung der Immunzellen im Blut nach einer Lebenswoche bei Neugeborenen unterscheidet sich schon komplett von dem Nabelschnurblut, welches bei Geburt gewonnen wurde (Olin et al., 2018). Somit kann CB zwar eine Entwicklungsrichtung von Immunzellen im späteren Leben bzw. eine neonatale Konstellation der Immunzellen geben, aber keine exakte Vorhersage, wie das Immunsystem im Kindes- und Erwachsenenalter aufgestellt ist. Eine Analyse der Konstellation der Immunzellen und allgemein des Immunsystems muss für jedes Lebensalter genau analysiert werden.

Die B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten der Neugeborenen zeigen zum Ende des dritten Lebensmonats einen Phänotyp, der auch bei den Eltern der Neugeborenen im Erwachsenenalter beobachtet werden konnte. Somit sind die ersten drei Monate eine kritische und wichtige Phase für die Entwicklung der Immunzellen, sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Pathologien oder Störungen, sei es von intrinsisch oder extrinsisch, könnten eine lebenslange Folge haben (Olin et al., 2018).

Unsere Arbeitsgruppe beschrieb bereits die Differenzierung von B-Zellen bei gesunden und Kindern und Jugendlichen mit Immundefizienz: Die Memory-B-Zellen nehmen bei gesunden Kindern und Jugendlichen mit Zunahme des Lebensalters stetig zu. Bei Kindern mit Immundefizienz liegen die Memory-B-Zell-Werte signifikant deutlich unter der altersabhängigen 10. Perzentile (Huck et al., 2009).

Dass das Immunsystem noch unreif sein kann, sieht man an frühgeborenen Kindern, die unter der 37. Schwangerschaftswoche geboren wurden. Frühgeburtlichkeit kann verschiedene

Ursachen haben: Dazu gehören beispielsweise eine ascendierende Infektion, eine Risikoschwangerschaft (wie Mehrlingsschwangerschaften), ein Schwangerschaftsintervall von unter 12 Monaten und Z. n. spontaner Frühgeburt (Berger et al., 2019). Je höher die Gestationswoche und somit reifer der Fetus, desto niedriger ist die gemessene Neutrophilenzahl im peripheren Blut des Kindes (Olin et al., 2018), was die Wahrscheinlichkeit für entzündliche Reaktionen im Körper vermindert.

Die häufigste zirkulierende ILC-Population im CB sind die ILC1. Diese nehmen mit zunehmendem Gestationsalter signifikant ab (Bennstein et al., 2020). Die ILC1, ILC2 und ILC3 sind mit 0,05 bis maximal 0,5 % der zirkulierenden Lymphozyten vertreten. Im Erwachsenenalter sinkt die Frequenz bereits signifikant, sodass sie nur noch mit max. 0,3% an Gesamtlymphozyten vertreten sind. Die ILC1-Population bleibt im Erwachsenenalter ebenfalls die häufigste zirkulierende ILC-Population mit bis im Schnitt 0,05 bis 0,1 % (Bennstein et al., 2020). Mit dem Alter nehmen die ILC2 und ILC3 signifikant ab (Bennstein et al., 2020, Vely et al., 2016). In einer Arbeitsgruppe wurden zirkulierende ILC-Daten zu Kindern erhoben, jedoch erst ab einem Alter von 6 Jahren und mit einer Probandenanzahl von 29 (Vely et al., 2016). Diese Probandenanzahl und das Fehlen der Altersklassen 0-6 Jahre machen eine aussagekräftige Dynamik der zirkulierenden ILCs bei Kindern und Jugendlichen nicht möglich.

1.11 Klinische Relevanz

Die ILCs sind, wie der Name schon andeutet, dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie agieren mit beim Schutz der Epithelbarriere, sind beteiligt an Gewebeumbauvorgängen, sowie an der Geweberegeneration und -reparatur (Spits and Di Santo, 2011). Ihnen wird jedoch auch eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Autoimmunität und -inflammation zugesprochen. Zusammenhänge mit der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (McKenzie et al., 2014, Yazdani et al., 2015, Forkel et al., 2019), Asthma bronchiale (Andrea et al., 2020, Bartemes and Kita, 2021, Entwistle et al., 2020) und COPD (Silver et al., 2016) wurden bereits beschrieben. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die mögliche Involvierung von den ILCs in der Entstehung von malignen Erkrankungen (Artis and Spits, 2015, Carrega et al., 2016, Vallentin et al.,

2015). Eine Dysbalance zwischen den ILC-Gruppen könnte zu Karzinomen wie dem Kolonkarzinom führen.

Den ILC1 wird neben der protektiven Rolle bei der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen eine pathophysiologische Rolle in der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zugeschrieben. Eine ILC1-Akkumulation wurde im Darm von Patienten mit Morbus Crohn (Bernink et al., 2013) und mit Colitis ulcerosa (Forkel et al., 2019) detektiert. Im terminalen Ileum von Patienten mit Morbus Crohn wurde eine bis zu 15-fache höhere IFN γ -Konzentration gemessen (Li et al., 2016). Außerdem ist bereits bekannt, dass bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nicht nur eine ILC1-Akkumulation im betroffenen Gewebe zu messen ist, sondern auch eine Akkumulation von ILC1 im peripheren Blut (Forkel et al., 2019).

ILC2 haben, wie alle anderen ILCs auch, sowohl protektive als auch krankheitsfördernde Wirkungen auf den Körper. Anhand ihres Zytokinprofils mit IL-5 und IL-13 können sie, zum einen protektiv bei Parasiten- und Wurmbefall wirken (Fallon et al., 2006), zum anderen begünstigen sie allergische Reaktionen und Asthma bronchiale (Yu et al., 2014, Kim et al., 2016, Morita et al., 2016). Bei Adipositas-Patienten konnte eine verminderte ILC2-Frequenz im Fettgewebe ermittelt werden. ILC2 können somit den Fettmetabolismus regulieren, fördern die Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe und wirken somit protektiv gegen Adipositas (Brestoff et al., 2015, Moro et al., 2010). Eine Beteiligung von ILC2 wird auch bei chronischen Erkrankungen im Menschen beschrieben (Serafini et al., 2015). Dazu gehören die Entstehung bzw. Aggravierung einer atopischen Dermatitis (Salimi et al., 2013), einer hepatischen Fibrose (McHedlidze et al., 2013) und einer pulmonalen Fibrose (Hams et al., 2014). Eine Akkumulation von ILC2 findet sich bei dem Krankheitsbild der chronischen Rhinosinusitis in den nasalen Polypen bei betroffenen Patienten (Mjosberg et al., 2011). Den ILC2 wird jedoch auch eine wundheilende Funktion zugesprochen (Rak et al., 2016).

Die ILC3 spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von extrazellulären Pathogenen, in der Gewebekomöostase und in der Regulation von entzündlichen pathologischen Erkrankungen (Spits and Cupedo, 2012, McKenzie et al., 2014). Bei chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Sonnenberg and Artis, 2012) konnte eine verminderte Frequenz von ILC3 und dafür eine Akkumulation von ILC1 festgestellt werden (Bernink et al., 2013). Eine Akkumulation von ILC3 findet man in Hautläsionen und im PB von Patienten mit Psoriasis (Teunissen et al., 2014, Villanova et al., 2014).

Eine genauere Analyse der Zahl und Funktion der ILCs, insbesondere der zirkulierenden, ist besonders wichtig, da diese Zellen wie in bisheriger Forschung gezeigt, eine klinische Relevanz in der Entwicklung bzw. Förderung und Verhinderung von Erkrankungen haben. Die Zahl der zirkulierenden ILCs könnte einen Anhalt dafür geben, ob z. B. ein Patient droht, in einen septischen Schock zu gleiten (Carvelli et al., 2019).

1.12 Geweberesidente vs. zirkulierende ILCs

Wie in den Kapiteln 1.4-1.8 bereits beschrieben, sind die meisten ILCs geweberesident (Bernink et al., 2013, Orimo et al., 2021). Sie sind essenziell als Schutzmechanismen für die initiale Abwehr gegen pathogene Erreger (Hazenbergh and Spits, 2014) und spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von sekundären lymphoiden Strukturen (Montaldo et al., 2015a). Während die ersten Arbeiten über ILCs auf Erkenntnissen über Mäuse basierten, wurde im letzten Jahrzehnt immer mehr Augenmerk auf humane Daten gelegt. Besonders an zirkulierenden ILCs bei Menschen wurde viel geforscht.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten jedoch kaum Daten zu zirkulierenden ILCs an Menschen, besonders kaum Daten zu Kindern und Jugendlichen.

Im letzten Jahrzehnt forschten zunehmend Arbeitsgruppen, unsere dazugehörend, an zirkulierenden ILCs im Blut (Geier et al., 2017, Carvelli et al., 2019, Darboe et al., 2020, Bennis et al., 2021, Bennis and Uhrberg, 2021).

Die häufigste zirkulierende ILC-Population im CB sind die ILC1. Diese nehmen mit zunehmendem Gestationsalter signifikant ab (Bennis et al., 2020). Die ILC1, ILC2 und ILC3 sind mit 0,05 bis maximal 0,5 % der zirkulierenden Lymphozyten vertreten. Im Erwachsenenalter sinkt die Frequenz bereits signifikant, sodass sie nur noch mit max. 0,3 % an Gesamtlymphozyten vertreten sind. Die ILC1-Population bleibt im Erwachsenenalter

ebenfalls die häufigste zirkulierende ILC-Population mit bis im Schnitt 0,05 bis 0,1 % (Bennstein et al., 2020). Mit dem Alter nehmen die ILC2 und ILC3 signifikant ab (Bennstein et al., 2020, Vely et al., 2016). In einer Arbeitsgruppe wurden zirkulierende ILC-Daten zu Kindern erhoben, jedoch erst ab einem Alter von 6 Jahren und mit einer Probandenanzahl von 29 (Vely et al., 2016). Diese Probandenanzahl und das Fehlen der Altersklassen 0-6 Jahre machen eine aussagekräftige Dynamik der zirkulierenden ILCs bei Kindern und Jugendlichen nicht möglich.

Im Jahre 2017 stellte eine Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass zirkulierende ILC3 sich zu Effektorzellen entwickeln können (Lim et al., 2017). Unsere Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus belegen, dass CB ILC1 potenzielle Vorläufer für NK-Zellen sind (Bennstein et al., 2020). Somit haben zirkulierende ILCs keine Effektorfunktion und unterscheiden sich somit von den geweberesidenten ILCs.

In dieser Arbeit wurde besonders ein Augenmerk auf die zirkulierenden ILC1, ILC2 und ILC3 bei Kindern und Jugendlichen gelegt. Die ILCs sind in Tabelle 1 definiert:

ILC-Population	Phänotypische Charakterisierung
ILC1	Lin ⁻ CD127 ⁺ CD94 ⁻ CD117 ⁻ CRTH2 ⁻ CD161 ^{+/-}
ILC2	Lin ⁻ CD127 ⁺ CD94 ⁻ CD117 ^{+/-} CRTH2 ⁺
ILC3	Lin ⁻ CD127 ⁺ CD94 ⁻ CD117 ⁺ CRTH2 ⁻

Tabelle 1: Phänotypische Charakterisierung der ILC-Populationen. Modifiziert nach (Caligiuri, 2008, Mebius et al., 1997, Bjorklund et al., 2016, Mjosberg et al., 2011, Spits et al., 2013, Bianca Bennstein et al., 2019)

1.13 Ziele der Arbeit

Die bisherige Forschung legte ihr Augenmerk vorwiegend auf die geweberesidenten ILC-Populationen in Erwachsenen, während nur wenige Arbeiten zu zirkulierenden ILCs im CB von Neugeborenen sowie PB von Erwachsenen existierten. Weiterhin gibt es bisher keine detaillierten Daten zu der Entwicklung der ILCs im Kindes- und Jugendalter. Da bei Kindern sowohl das myeloische als auch das lymphatische Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist, ist es generell von großem Interesse, die Zusammensetzung bzw. die Verteilung der verschiedenen ILC-Populationen im Vergleich zu denen in Erwachsenen zu ermitteln (Olin et al., 2018, Dowling, 2016, Dowling and Levy, 2014, Davis, 2008).

Ziel der Arbeit war es daher, den relativen und absoluten Anteil der zirkulierenden ILC1, ILC2 und ILC3 an den Lymphozyten im peripheren Blut bei gesunden Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 bis 18 Jahren zu bestimmen. Die erwartete Dynamik ist hierbei die Abnahme der ILC-Frequenzen mit zunehmendem Alter. Da in unserer Arbeitsgruppe in CB und auch in PB von Erwachsenen Subpopulationen der ILCs mit CD5/CD161-Expression detektiert wurden (Bennstein et al., 2021, Roan et al., 2016), war weiterer Teil dieser Studie, zu erforschen, ob diese Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen ebenfalls zu messen sind. Falls sie vorhanden wären, galt es zu erörtern, wie sie sich mit zunehmendem Lebensalter entwickeln. Somit sollten erstmals umfassende Normwerte für ILCs und deren bisher bekannten Subpopulationen bei Kindern und Jugendlichen ermittelt werden.

Vor dem Hintergrund, dass die ILCs eine protektive Aufgabe im angeborenen Immunsystem haben und in der Pathogenese immunologischer und autoinflammatorischer Erkrankungen involviert sind, hat die Erforschung der ILCs bei Kindern und Jugendlichen einen besonderen Stellenwert. Die ermittelten Normwerte aus dieser Studie können mit in Zukunft erhobenen ILC-Werten von kranken Kindern und Jugendlichen abgeglichen werden. Eine mögliche Akkumulation oder Dezimierung von ILCs bei gesunden vs. kranken Kindern könnte Hinweise darauf geben, wie die ILCs sich bei Krankheit entwickeln. Da Kinder eine deutlich höhere intraindividuelle Variation der Immunzellen als Erwachsene haben (Olin et al., 2018, Carr et al., 2016), ermöglicht die Studie Kenntnisse über die Norm. Das Wissen kann so zum Verständnis der Pathogenese bezüglich Dysbalance der ILCs und der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen im Bezug zu den ILCs bei Kindern und Jugendlichen beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Rotina 46R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
VWR Mini Star silverline	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Werkbank Mahlberg Analytik	Biochrom AG, Dinslaken, Deutschland
Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Cell Dyn 3500R	Abbott Laboratories, Illinois, USA
CytoFLEX	Beckman Coulter GmbH, Brea, Kalifornien, USA

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Geräte

2.1.2 Medien

Medium	Zusammensetzung
Staining Buffer	2,5g 100%-iges Bovines Serumalbumin (BSA), 2ml 0,5 Mol EDTA, 500ml PBS

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Medien

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Ort
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (ohne Calcium- und Magnesiumchlorid), 500ml	Lufe Technologies Europe B.V., Bleiswijk, Niederlande
Lymphocyte Separation Medium (Dichte 1,077-1,080 g/ml), 500ml	Mediatech Inc., Manassas, USA
Lyse Puffer pH 7,4 (1ml enthält 8,29mg Ammoniumchlorid, 1mg Kaliumhydrogencarbonat; 0,0375mg Na-EDTA, Wasser für Injektionszwecke), 500ml	Universitätsklinikum Düsseldorf Zentralapotheke, Deutschland
Albumin Fraktion V, 200g	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Life Science, St. Louis, USA

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Chemikalien

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller, Ort
CD1a	FITC	HI149	BioLegend, San Diego, USA
CD14	FITC	HCD14	BioLegend, San Diego, USA
CD19	FITC	HIB19	BioLegend, San Diego, USA
CD20	FITC	2H7	BioLegend, San Diego, USA
CD3	FITC	UCHT1	BioLegend, San Diego, USA
TCR $\alpha\beta$	FITC	IP26	BioLegend, San Diego, USA
TCR $\gamma\delta$	FITC	B1	BioLegend, San Diego, USA
CD123	FITC	6H6	BioLegend, San Diego, USA
CD235a	FITC	HI264	BioLegend, San Diego, USA
Fc ϵ R1 α	FITC	AER-37 (CRA-1)	BioLegend, San Diego, USA
CD94	PE/Cy7	DX22	BioLegend, San Diego, USA

CD56	BV650	HCD56	BioLegend, San Diego, USA
CD5	APC/Cy7	L17F12	BioLegend, San Diego, USA
CD34	FITC	581	BioLegend, San Diego, USA
CD127	PE/Cy5	R34.34	BioLegend, San Diego, USA
CD117	BV421	104D2	BioLegend, San Diego, USA
CRTH2	PE/Dazzle594	BM16	BioLegend, San Diego, USA
CD28	APC	CD28.2	BioLegend, San Diego, USA
CD161	PE	HP-3G10 191B8	BioLegend, San Diego, USA Beckman Coulter, Kalifornien, USA

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Antikörper

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
Reagiergefäß / Micro-Tube, 1,5ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Tube 75x12mm, 5ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Tubes, 15 und 50ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (0,2-2µl, 2-10µl, 100- 1000µl)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Transferpipetten, 3,5ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Original Perfusor® Syringe 50ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Acrodisc® Syringe Filter 0,45µm	Pall Life Sciences, New York, USA

Cryo.s™	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
---------	---

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien

2.1.6 Software

Software	Hersteller, Ort
Kaluza Analysis 2.1	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
GraphPad Prism 5.03	GraphPad, San Diego, USA

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Softwares

2.1.7 Angaben zum Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden gesunde Kinder und Jugendliche von 0-18 Jahren, ohne anamnestische Hinweise auf eine akute Infektion oder mit einem negativen C-reaktiven Protein-Wert (CRP), eingeschlossen. Das CRP gehört zu den Akut-Phase-Proteinen. Es ist ein unspezifischer Laborparameter für akute und chronische Infektionen, sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Ätiologie (Nehring et al., 2021). Es wurden ausschließlich Patienten in diese Arbeit eingeschlossen, die sich für einen elektiven operativen Eingriff am Helios Klinikum Krefeld vorstellten und bei denen eine mündliche oder schriftliche Einwilligung der Eltern bzw. Sorgeberechtigten vorlag (s. Anhang 6.1). Die Patientenproben wurden im Zeitraum vom 07.05.2019 bis zum 09.04.2021 gewonnen. Insgesamt konnten 163 Patientenproben gewonnen werden, eingeschlossen in die Analyse wurden 148 Patientenproben.

Jede Patientenprobe wurde mit einer Teilnehmernummer versehen. Gestartet wurde bei Patientenprobe PB (peripheres Blut) 1 mit der zufällig gewählten Teilnehmernummer 555.

Die 148 Patientenproben wurden in 4 unterschiedliche Alterskohorten aufgeteilt: Säuglinge (0-1 Jahre), Kleinkinder (2-5 Jahre), Kinder (6-12 Jahre), Jugendliche (13-18 Jahre), s. Abb. 1.

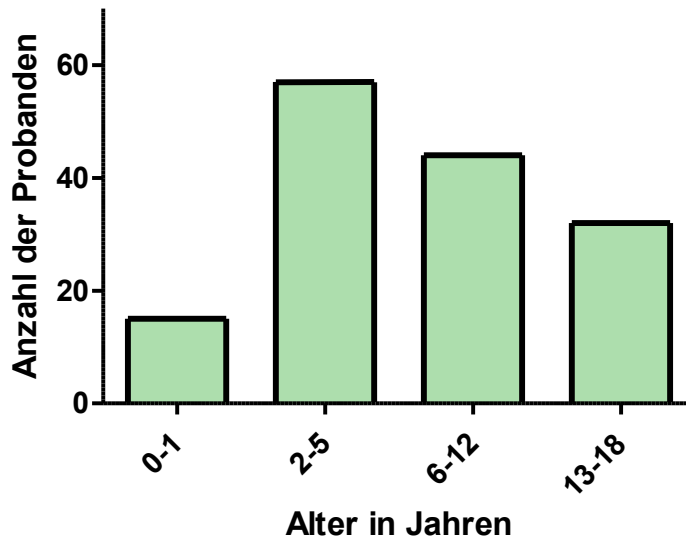


Abb. 1: Darstellung der Probandenanzahl anhand vier Altersgruppen.

0-1 Jahre n = 15, 2-5 Jahre n = 57, 6-12 Jahre n = 44, 13-18 Jahre n = 32

Die Definition der Altersangaben lautete wie folgt: Ein 1,2 Jahre alter Proband war ein Proband, der 1 Jahr und 2 Monate alt war.

In Tabelle 8 sind das Alter, das Prozedere bzw. der Operationsgrund und das Geschlecht der jeweiligen Probanden aufgelistet.

Probanden- nummer	Alter in Jahren	Prozedere / Operationsgrund	Geschlecht
641	0,11	Leistenherniotomie + Hodenverlagerung rechts	1
667	1	umbilikale Herniotomie	2
555	1	Orchidopexie + Funikolyse bds.	1
596	1	Hypospadie-OP	1
635	1,1	rituelle Zirkumzision	1
575	1,2	rituelle Zirkumzision	1
586	1,3	laparoskopische Hodensuche links	1
688	1,3	TW-Spülung - Sondierung ITN	2
636	1,5	Orchidopexie rechts	1
581	1,6	Zirkumzision	1
676	1,6	Hodenverlagerung rechts, Zirkumzision	1
571	1,7	Orchidopexie bds.	1
642	1,9	Leistenherniotomie rechts	1
653	1,9	AT, PC, ggf. PR bds.	1
650	1,9	AT, ggf. PC/PR bds. + Rhinoskopie	1
598	2	Re-OP offener Processus + Zirkumzision	1
654	2	TW-Spülung + Sondierung	1
589	2,1	Zirkumzision	1
669	2,1	Ringspaltung linker Daumen	1
565	2,2	Zirkumzision	1
683	2,3	rituelle Zirkumzision	1
563	2,4	Orchidpexie + Funikolyse bds.	1
576	2,4	Orchidpexie bds.	1
600	2,5	Zirkumzision	1
637	2,5	Verschluss offener Proc. vaginalis rechts	1
645	2,5	AT bds., ggf. PC bds.	1
573	2,7	Verschluss offener Proc. vaginalis rechts	1

580	2,7	Zirkumzision	1
660	2,8	Verschluss offener Proc. vaginalis rechts	1
583	2,11	rituelle Zirkumzision	1
567	3	Zirkumzision	1
655	3	NRI, ggf. AT, TO	1
564	3,1	Zirkumzision	1
691	3,1	PC/PR bds. + NRI ggf. Re-AT, TO bds.	1
664	3,3	PC, ggf. PR bds.	1
697	3,3	AT + PC, ggf. PR bds.	1
639	3,4	Entfernung mediane Halszyste	1
687	3,4	AT, TO bds. + ggf. PC/PR bds.	1
708	3,4	AT, TO bds.	1
711	3,4	Entfernung Dermoidzyste linke Augenbraue	2
590	3,6	Orchidolyse + Orchidopexie, Zirkumzision	1
713	3,7	Entfernung Fremdkörper Fußsohle rechts	2
611a	3,9	Hinterhaupt Faden ex in Narkose	2
620	3,9	Leistenherniotomie rechts	1
709	3,9	NRI, ggf. Re-AT, TO bds.	1
674	4	ME 2 Nägel linke UA Ulna + Radius, rituelle Zirkumzision	1
594	4,1	Orchidopexie und Funikolyse links	1
629	4,1	Hodenverlagerung bds.	1
686	4,1	AT, ggf. PC/PR bds.	2
603	4,3	Fäden ex, Z. n. mediane Halszyste	2
639	4,4	Zirkumzision	1
741	4,4	Hornhaut Fremdkörper-Entfernung	2
574	4,5	Zirkumzision	1
592	4,6	Antirefluxplastik links	2
718	4,6	AT, TO	1
730	4,9	AT, PC, ggf. PR bds.	2

651	4,10	laparoskopische Leistenherniorrhaphie links, ggf. bds. umbilikale Herniotomie	1
694	4,10	Re-AT, Re-PC, ggf. PR bds.	1
634	4,11	ME nach Fraktur ESIN linke Ulna	2
720	5	Fensterung Funikulozele rechts	1
720.1	5	Schiel-OP	1
577	5,4	rituelle Zirkumzision	1
644	5,6	AT + PC/PD bds.	1
659	5,7	ME 2 Nägel linke UA, Z. n. ESIN	1
656	5,9	NRI, AT, ggf. PC + PR	1
721	5,9	Entfernung PR bds.	2
743	5,9	NRI, ggf. Re-AT, PC, T-Tube bds.	1
638	5,11	Zirkumzision	1
657	5,11	Schiel-OP	2
699	5,11	AT, ggf. PC/PR bds.	1
715	5,11	Re-AT, PR bds.	1
643	6	Nabelherniotomie	2
672	6	laparoskopische Leistenherniotomie links + Zirkumzision	1
582	6,1	rituelle Zirkumzision	1
668	6,1	AT, PC, ggf. PR bds., evtl. TO	1
616	6,2	Zirkumzision	1
647	6,2	ATO, PC/PR bds.	1
612	6,3	ME Platte prox. Femur rechts	1
605	6,7	Tonsillektomie	1
617	6,7	Leistenherniotomie	1
693	6,8	NRI, ggf. Re-AT + OMI ggf. PC/PR bds.	1
610	6,9	Schiel-OP	1
607	7,7	Granulom ex	1
584	7,8	Zirkumzision	1

698	8	ME 1 Schraube Ellenbogen links, Z. n. Condylus radii Fraktur	2
611b	8,1	ME nach Radiusfraktur rechts ESIN	2
595	8,5	Re-Zirkumzision	1
737	8,9	Myofasziotomie Achillessehne bds., Anlage US-Orthese	1
585	8,10	IOL-Austausch und evtl. Nachstarrresektion	2
700	8,10	ATO	2
599	8,11	Hypospadie-OP	1
593	9,1	Nasenbeinreposition	1
557	9,5	Zirkumzision	1
561	9,8	Zirkumzision	1
569	9,9	Zirkumzision	1
744	9,10	USTO distale Tibia rechts, ggf. Osteotomie Fibula rechts	2
685	9,11	ME nach Fraktur ESIN 09/20 linke Ulna	1
663	10	Hodenverlagerung rechts	1
681	10,2	Stopperschrauben + Myofasziotomie bds.	1
736	10,4	Entfernung Glassplitter linker UA/ linkes Handgelenk	1
749	10,4	ME Stopperschrauben links	1
746	10,8	Nasenreposition	1
591	10,9	Orchiektomie rechts	1
615	10,10	ME 2 K-Drähte links	1
728	10,10	Abtragung Re-Exostose Basis Grundgelenk rechter Ringfinger	2
588	10,11	Nasenbeinreposition	2
619	11,11	ME nach Fraktur; Entfernung 2 K-Drähte Innenknöchel links	2

677	11,3	Anbohrung Osteochondrosis dissecans mediale Talusschulter rechts	2
618	11,4	Entfernung 2 K-Drähte linker Radius distal	2
703	11,7	8-Plates mediales distales Femur	1
735	11,8	ME UA links	2
633	11,9	Leistenherniotomie links	2
630	12,11	Stopperschrauben bds.	1
673	12,2	ME Stopperschrauben bds.	2
755	12,6	ME K-Drähte rechtes OSG medial + lateral	1
678	13	8-Plates proximale laterale Tibia bds.	1
680	13	ME K-Draht MHK V rechts	1
716	13	ASK Knie rechts, Semi-T, AM-Naht	2
712	13,3	antero-mediale Maxillektomie, Abtragung Prämaxilla	1
747	13,3	8-Plates prox. Tibia bds.	2
754	13,5	Stopperschrauben BV BS	1
587	13,6	Nasenbeinreposition	1
731	13,6	PC/PR links	2
725	13,7	Myofasziotomie US	2
734	13,9	ME rechter UA ESIN	1
556	13,10	prox. Femurumstellung, Rotationsosteotomie	2
558	13,11	Zirkumzision	1
695	13,11	T-Tube rechts	2
705	14,1	Stopperschrauben bds.	1
684	14,10	USTO prox. Femur rechts Blade Platte	2
723	14,2	geschlossene Reposition + intramedulläre K-Drahtosteosynthese MHK V rechts	1
679	14,4	USTO distales Femur links lateral mit Tomofix Platte	2

729	14,4	plastische Deckung nach Sinus pilonidalis	1
682	14,8	Entfernung Keloid rechtes Ohrläppchen	2
568	15	Stopperschrauben Calcaneus bds.	1
738	15,1	Entfernung 1 Nagel linke Ulna	1
808	15,3	Verschraubung distale Tibia bei triplaner Fraktur rechts	1
753	15,4	ME 8-Plates bds. distales mediales Femur	1
652	15,9	Exzision laterale Halszyste links	2
750	16	ME Stopperschrauben bds.	1
609	16,11	ME Schrauben Olecranon rechts	1
710	16,4	ME SH-Schrauben bds.	1
748	16,5	ME 8-Plates distales mediales Femur bds.	1
559	17	Zirkumzision	1
675	17	ME Platte Schrauben linkes distales Femur	2
704	17,1	Zirkumzision	2
608	17,10	Zirkumzision	1
751	18,5	Miniplatte bei MHK V Schaftfraktur rechts	1

Tabelle 8: Darstellung der eingeschlossenen Probanden in dieser Arbeit. Aufgelistet sind die zu jedem Probanden zugeordneten Nummern mit Alter, OP-Grund oder Prozedere. Beim Geschlecht wird das männliche Geschlecht mit der 1 kodiert, das weibliche mit der 2. Sortiert nach Alter (n = 148)

In Tabelle 9 sind die wichtigsten Charakteristika der teilnehmenden Probanden aufgelistet.

Alter [Jahre]	0-1	2-5	6-12	13-18
Mittelwert	1,4	3,8	8,2	14,8
± SD [Jahre]	± 0,4	± 1,2	± 2,4	± 1,6
Median	1,3	3,9	8,1	14,4
n =	15	57	44	32
männlich	13	45	30	21
weiblich	2	12	14	11

Tabelle 9: Charakteristika des Patientenkollektivs. Einteilung in vier verschiedene Altersgruppen (n = 148).

2.1.8 Probengewinnung

Für die Analyse der ILCs wurde jeweils ca. 1-10ml EDTA-Blut verwendet. Die Blutentnahme erfolgte über eine bereits vorhandene Venenverweilkanüle, die für eine geplante Operation benötigt wurde. Eine Voraussetzung für die Blutentnahme war eine schriftliche oder mündliche Einverständniserklärung durch den Patienten bzw. der Patientin und/oder durch die Erziehungsberechtigten. Der Abnahmeort befand sich im Helios Klinikum Krefeld (Lutherplatz 40, 47805 Krefeld).

Die gewonnenen Blutproben wurden bei Zimmertemperatur und im Dunkeln für maximal 24 Stunden gelagert. Der Transport der Blutproben vom Helios Klinikum Krefeld zum Institut für Zelltherapeutika und Transplantationsdiagnostik Düsseldorf erfolgte noch am selben oder einen Tag nach der Blutentnahme.

Die Aufarbeitung der Proben wurde entweder am Tag der Blutentnahme oder am folgenden Tag, aber spätestens 20 Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Uhrberg (Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, Gebäude 14.80).

2.2 Aktenzeichen des Ethikvotums

Für die vorliegende Arbeit lag ein positives Ethikvotum von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor. Die Studien-ID lautet 2018014562 und hat das Aktenzeichen „2018-12-Klinische Forschung ohne genetische Untersuchungen Innate Lymphoid Cells (ILCs) in peripherem Blut – Ermittlung der Normwerte von Kindern und Jugendlichen“ (s. Anhang 6.2).

2.3 Methoden

2.3.1 Protokoll zur Aufarbeitung der gewonnenen Blutproben

Das gewonnene Vollblut wurde aus den EDTA-Röhrchen in 15 ml Falcon-Tubes umpipettiert. Zusätzlich wurde 250 µl Vollblut zur Bestimmung der Zellzahl (Ermittlung der Gesamtlymphozyten) in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert. Das Vollblut im 15 ml Falcon-Tube wurde im Verhältnis eins zu eins (1:1) mit 1 x *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) verdünnt. Ein neues 15 ml Falcon-Tube wurde mit 3 ml *Lymphocyte Separation Medium* befüllt. Im nächsten Schritt erfolgte das Schichten der 1:1-Verdünnung auf das *Lymphocyte Separation Medium*. Die untere Schicht enthielt das *Lymphocyte Separation Medium* und die obere Schicht die 1:1-Verdünnung. Nach dem Schichten wurden die Proben für 20 Minuten bei 2000 rpm (bzw. 1000 g) und ohne Bremse zentrifugiert. Während der 20-minütigen Zentrifugation wurde der Antikörper-Mix vorbereitet (s. 2.3.2).

Nach der Zentrifugation wurde der entstandene Lymphozytenring mit einer Transferpipette vorsichtig abgenommen, in ein neues 15 ml Falcon-Tube gefüllt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von ca. 12 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit

1320 rpm (bzw. 380g) und mit Bremse. Nach der Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet, nach Verwerfen des Überstandes, mit einer 200 µl-Pipette resuspendiert. Zur Erythrozytenlyse wurde 3 ml, bei 4°C gekühlte, Ammoniumchloridlösung bei Raumtemperatur in das resuspendierte Pellet hinzugegeben. Die Inkubation wurde für max. 5 Minuten durchgeführt, um die Lyse anderer Zellen zu verhindern. Nach der 5-minütigen Erythrozytenlyse wurde das Falcon-Tube mit PBS auf ca. 12ml aufgefüllt und erneut bei 1320 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das Pellet resuspendiert. Erneut wurde das Falcon-Tube mit PBS auf ca. 12 ml aufgefüllt und bei 1320 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einer 200 µl-Pipette resuspendiert. Zu dem Zellpellet wurden 6 ml *Staining-Buffer* hinzugegeben. Für das Herstellen des *Staining-Buffers* benötigte man 2,5 g 100%-iges Bovines Serumalbumin (BSA), 2 ml 0,5 Mol EDTA und 500 ml 1 x PBS. Aus dem Falcon-Tube, in dem das resuspendierte Zellpellet und 6 ml *Staining-Buffer* enthalten sind, wurden 250 µl abgenommen und in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert, um die Zellzahlbestimmung nach den Aufreinigungsschritten durchzuführen. Das Falcon-Tube wurde nun bei 1320 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden die zwei Reagiergefäße zur Zellzahlbestimmung (Reagiergefäß mit 250 µl Vollblut und Reagiergefäß mit 250 µl aufgereinigtes Blut) am CellDyn gemessen.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen, das Pellet durch leichtes Klopfen gegen das Tube gelockert und in ein Durchflusszytometrie-Tube (FACS-Tube) umpipettiert. Der bereits vorbereitete Antikörper-Mastermix (s. 2.3.2) wurde unter einer sterilen Werkbank im Dunkeln zu dem Zellpellet in das FACS-Tube dazugegeben. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln.

Nach der Inkubation wurden 2 ml PBS in das FACS-Tube hinzugegeben und eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1320 rpm und 4°C erfolgte anschließend. Der Überstand im FACS-Tube wurde nach Zentrifugation abgekippt und gelockert, indem man leicht gegen das Tube klopfte. Die aufgearbeitete Probe im FACS-Tube wurde bis zur Auswertung auf Eis und im Dunkeln gelagert.

2.3.2 Vorbereitung des Antikörper-Mixes

Die in Tabelle 10 aufgeführten Antikörper wurden alle zusammen in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert, um die Auswertung mittels Durchflusszytometrie durchführen zu können.

Antikörper	Expression / Oberflächenrezeptor auf	Verdünnung 1:100
CD1a	dendritischen Zellen	4
CD14	Monozyten, Makrophagen	1
CD19	B-Zellen, dendritischen Zellen	1
CD20	B-Zellen	1
CD3	T-Zellen	1
TCR $\alpha\beta$	T-Zellen	1
TCR $\gamma\delta$	T-Zellen	4
CD123	dendritischen Zellen	1
CD235a	Erythrozyten, erythroide Vorläuferzellen	2
Fc ϵ R1 α	Mastzellen, basophile Zellen	2
CD94	NK-Zellen, T-Zellen	1
CD56	NK-Zellen, T-Zellen, ILC1, ILC3	1
CD5	T-Zellen, B-Zellen	1
CD34	hämatopoetische Stammzellen	1
CD127	ILC-Zellen (alle)	1
CD117	ILC3-Zellen	1
CRTH2	ILC2-Zellen	1
CD28	ILC-Zellen (alle)	2
CD161	ILC1, ILC2, ILC3	4
		➔ 29 bzw. 31

Tabelle 10: Übersicht der genutzten Antikörper mit Mengenangaben

Der Oberflächenmarker CD235a wird hauptsächlich von erythroiden Vorläuferzellen exprimiert (Mao et al., 2016). Bei Kindern unter 2 Jahren wurde zusätzlich der Antikörper CD235a mit in die Färbung genommen, um Störfaktoren durch erythroide Vorläuferzellen in der FACS-Analyse zu verringern.

Insgesamt wurde für eine zu analysierende Probe 29µl, bzw. 31µl bei Proben von Kindern unter 2 Jahren, Antikörper benötigt.

Das Pipettieren der Antikörper erfolgte unter einer sterilen Werkbank im Dunkeln, um die Funktionen der Antikörper zu erhalten. Nach der Fertigstellung des Antikörper-Mixes wurde es bis zur weiteren Auswertung im Dunkeln bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt.

2.4 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. *FACS = fluorescence-activated cell sorting*) ist ein Messverfahren, um einzelne Zellen oder Zellpopulationen im Blut und Gewebe zu messen. Sie ermöglicht es die Größe, die Granularität und weitere Eigenschaften der Zellen zu bestimmen (Adan et al., 2017).

Aufgearbeitete Proben in Zellsuspension werden durch eine Messkammer (engl. *flow cell*) geführt. Meistens bestehen die Messkammern aus Glas und die durchfließenden Zellen werden von Laserlicht angestrahlt. Trifft das Laserlicht auf die Zelle, die sich gerade in der Messkammer befindet, wird ein Streulicht (engl. *light scatter*) erzeugt. Dieses Streulicht kann, abhängig davon, wo man das Streulicht misst bzw. detektiert, verschiedene Informationen über die Zelle geben. Die zwei wichtigsten Detektoren sind der Vorwärtsstreulicht-Detektor (engl. *forward light scatter/FSC*) und der Seitwärtsstreulicht-Detektor (engl. *sideward light scatter/SSC*). Der FSC befindet sich in etwa 90°-Winkel zum ursprünglichen Laserstrahl und gibt Informationen über die Größe der Zelle. Der SSC befindet sich in Richtung des ursprünglichen Strahls und gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Das Ergebnis kann in einem Punktdiagramm, sog. *Dot-Plot*, dargestellt werden. Dabei steht jeder Punkt für ein gemessenes Ereignis.

Damit die Zellen in der Durchflusszytometrie gemessen werden können, müssen sie mit Antikörpern markiert werden. Diese Antikörper sind an Fluoreszenzen gekoppelt, sodass sie ein Signal in der Messung geben, wenn diese von einem Laser angestrahlt werden.

An dem benutzten Durchflusszytometrie-Gerät können bis zu 13 Farben detektiert und gemessen werden.

Um die zu interessierende Zellpopulation genauer in den Blick nehmen zu können, macht man sich im nächsten Schritt das „Gating“ zunutze. Mit dem Gating kann man sich auf nur bestimmte Zellpopulationen konzentrieren (z. B. Lymphozyten) und nicht-relevante Zellpopulationen (z. B. Granulozyten oder Monozyten) komplett ausschließen (s. Abb. 2, S. 35).

2.5 Analyse der Studienproben mittels Durchflusszytometrie

Insgesamt wurden 148 Proben von Kindern und Jugendlichen von 0-18 Jahre mittels Durchflusszytometrie analysiert (Gerät CytoFLEX, Beckman Coulter GmbH, Kalifornien, USA). Die Analyse erfolgte entweder am selben Tag der Probenabnahme oder einen Tag später im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Gebäude 14.88, Etage 2. Für die Auswertung der verschiedenen FCS-Dateien (*FCS = flow cytometry standard data*) wurde die Software Kaluza Analysis Version 2.1 verwendet.

Die frisch aufgereinigten PBMCs wurden mit dem in 2.3.2 beschriebenem Antikörper-Mix gefärbt. In Abb. 2 ist die Gatingstrategie der ILCs dargestellt.

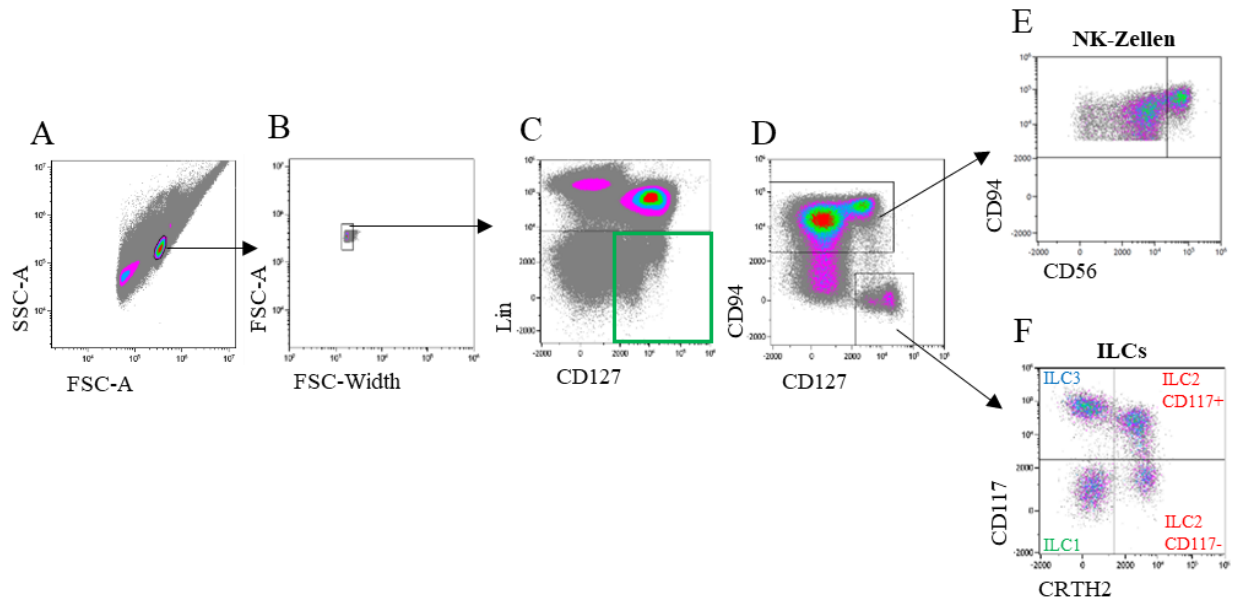


Abb. 2: Durchflusszytometrie und Gatingstrategie zur Detektion der ILC1-3. Die frisch aufgereinigten PBMCs wurden mit einem speziellen Antikörper-Mix gefärbt (s. 2.3.2). (A) Gating auf die Lymphozyten mittels Auftragung von forward (FSC-A) gegen side scatter (SSC-A). (B) Nur einzelne, nicht aneinanderklebende Zellen, werden zur weiteren Analyse verwendet (= singlets). (C) CD127⁺ und Lineage-negative (Lin⁻) Zellen werden als ILCs identifiziert (grünes Rechteck). (D) Klare Trennung von CD127⁺ ILCs und CD127⁺CD94⁺ NK-Zellen (E) Aufteilung der NK-Zellen in NK^{bright} und NK^{dim} (F) Die CD127⁺ ILCs werden in ILC1 = CD127⁺ CD94⁻ CD117⁻ CRTH2⁻; ILC2 = CD127⁺ CD94⁻ CD117^{+/-} CRTH2⁺ und ILC3 = CD127⁺ CD94⁻ CD117⁺ CRTH2⁻) aufgeteilt.

Abkürzungen: ILC (innate lymphoid cells), CD (cluster of differentiation), PBMCs (peripheral blood mononuclear cells).

2.6 Statistik

Für die Erstellung von Abbildungen der erhobenen Daten und die Ermittlung der statistischen Werte und Signifikanzen wurde das Programm GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Version 5.03, San Diego, USA) verwendet.

Für die Berechnung der absoluten und relativen Zellzahl der ILCs an Gesamtlymphozyten werden folgende Werte benötigt, die mittels FACS-Analyse bestimmt wurden:

1. Anzahl der Lymphozytenanzahl [$10^3/\mu\text{l}$ Blut] im Vollblut (s. S. 37, 2.3.1)
2. Anzahl der Zielzellen
3. Anzahl der Gesamt-ILCs
4. Anzahl der ILC1, ILC2, ILC3

Die Formeln zur Berechnung der Zellzahlen aller ILCs sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

- I. Anzahl der Lymphozyten [$10^3/\mu\text{l}$] * 1000 = α
- II. Ermittlung der ILC-Gesamtanzahl = β
- III. Ermittlung der Zielzelle = γ
- IV. $\beta / \gamma * 100 = \% \text{ ILC an Gesamt-Lymphozyten}$
- V. $\beta / \gamma * \alpha = \text{Anzahl ILC}/\mu\text{l Blut}$

Beispielrechnung (s. Abb. 3):

- I. $1,31 [10^3/\mu\text{l Blut}] * 1000 = 1310 \text{ Lymphozyten}/\mu\text{l Blut}$
- II. Ermittlung der ILC-Anzahl = 11742
- III. Ermittlung der Zielzellen = 2188892
- IV. $11742 / 2188892 * 100 = 0,54 \% \text{ ILCs/Lymphozyten}$
- V. $11742 / 2188892 * 1310 = 7,03 \text{ ILCs}/\mu\text{l Blut}$

Proben-ID	PB156_UP_VB	
Pat.-Name		
Pat.-ID		
Arzt		
Kommentar		
WBC	<u>3.24</u>	10e3/uL
NEU	<u>1.57</u>	48.5 %
LYM	<u>1.31</u>	40.4 %
MONO	<u>301</u>	9.29 %
EOS	<u>.026</u>	<u>.811 %</u>
BASO	<u>.034</u>	1.05 %
RBC	<u>4.80</u>	10e6/uL
HGB	<u>14.6</u>	g/dL
HCT	<u>40.9</u>	%
MCV	<u>85.2</u>	fL
MCH	<u>30.5</u>	pg
MCHC	<u>35.8</u>	g/dL
RDW	<u>10.6</u>	%
PLT	<u>200.</u>	10e3/uL
MPV	<u>7.58</u>	fL

Abb. 3: Exemplarisches Blutbild einer Studienprobe

Probandennummer: 749. Im roten Kasten sind die Lymphozytenzahlen dargestellt.

Diese Berechnung wurde bei den NK-Zellen, gesamten ILCs und bei den jeweiligen Gruppen (ILC1, ILC2 und ILC3) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Normwerte der ILCs bei Kindern und Jugendlichen

3.1.1 Abnahme der absoluten und relativen ILC-Gesamtzellzahl

In der vorliegenden Arbeit wurden Normwerte der ILCs für Kinder und Jugendliche ermittelt. Insgesamt wurden 148 Kinder und Jugendliche von 0-18 Jahre in die Studie eingeschlossen, die in vier Altersgruppen aufgeteilt wurden. Die Altersgruppe 0-1 Jahre umfasst Säuglinge (n = 15), 2-5 Jahre Kleinkinder (n = 57), 6-12 Jahre Kinder (n = 44) und 13-18 Jahre Jugendliche (n = 32).

Abbildung 4 zeigt die relativen und absoluten Zellzahlen der gesamten ILCs (ILC1-3): Auf der X-Achse ist das Alter in Jahren und die Aufteilung in vier verschiedene Altersgruppen gezeigt, auf der Y-Achse der absolute Zellanteil an Lymphozyten (Abb. 4A) und der relative Zellanteil an Lymphozyten (Abb. 4B).

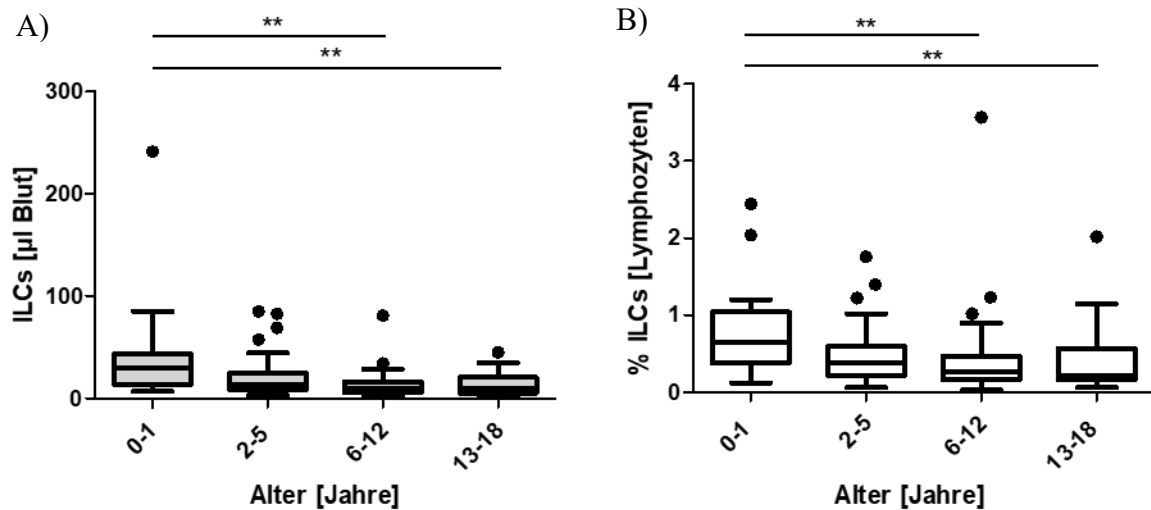


Abb. 4: Relativer und absoluter Zellanteil der Gesamt-ILCs an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. (A) Darstellung der absoluten Zellzahl aller ILCs und der (B) relativen Zellzahl aller ILCs der Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's und Bonferroni Post-Test berechnet. * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$.

Sowohl die absolute als auch die relative Zellzahl der Gesamt-ILCs nimmt mit dem Alter signifikant kontinuierlich ab. Bei Säuglingen (0-1 Jahre) sind durchschnittlich 0,82 % ILCs an den Gesamtymphozyten im peripheren Blut detektierbar, wobei sich die relative Gesamt-ILC-Population bis zum Alter von 6-12 Jahren bereits signifikant halbiert mit durchschnittlich 0,41% (p-Wert 0,0058). Eine deutliche signifikante Reduktion der relativen Zellzahl kann ebenfalls zwischen der Altersgruppe 0-1 vs. 13-18 Jahren gesehen werden. In der Adoleszenz sind noch 0,39% ILCs an den Gesamtymphozyten zu detektieren (p-Wert 0,0086).

Die gleiche Dynamik zeigt sich bei der absoluten Zellzahl (ILCs/ μ l Blut): Bei den Säuglingen sind es im Schnitt 44,69 ILCs/ μ l Blut. Die absolute Frequenz der Gesamt-ILCs sinkt signifikant mit dem Alter, sodass noch durchschnittlich 13,49 ILCs/ μ l Blut bei den 6-12-Jährigen (p-Wert 0,0015) und 13-18-Jährigen (p-Wert 0,0046) zu messen sind, s. Abb. 4.

3.1.2 Signifikante Abnahme der absoluten ILC1-Zellzahl

Eine signifikante Abnahme der Zellzahl sieht man nicht nur bei den Gesamt-ILCs, sondern auch bei der ILC1-Population. Diese Dynamik zeigt sich jedoch nur in der absoluten Zellzahl, die relative Zellzahl nimmt nicht signifikant mit dem Alter ab. Im Säuglingsalter sind im Schnitt 37,62 ILC1/ μ l zu detektieren, wobei die Zellzahl bis zu den 6-12-Jährigen um $\frac{3}{4}$ abnimmt, sodass noch durchschnittlich 9,02/ μ l Blut zu messen sind (p-Wert 0,001). Im Jugendalter (ab 13 Jahren) bis zum Eintritt des Erwachsenenalters sind durchschnittlich noch 8,8/ μ l Blut zu finden (0-1 Jahre vs. 13-18 Jahre, p-Wert 0,0018), s. Abb. 5.

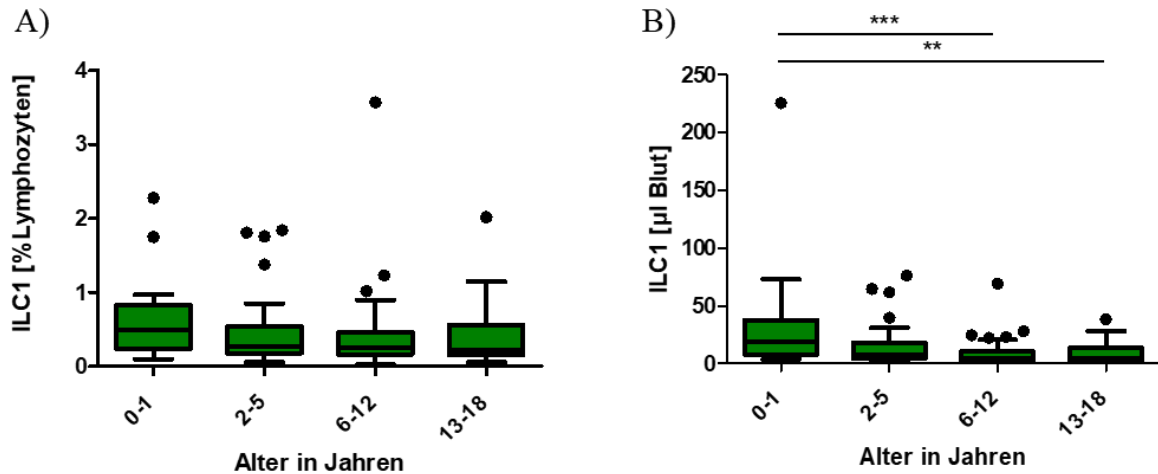


Abb. 5: Relativer und absoluter Zellanteil der ILC1 an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. (A-C) Darstellung der relativen Zellzahl (A) und der absoluten Zellzahl (B) der ILC1 für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, *** p-Wert $\leq 0,001$.

3.1.3 Keine signifikante Abnahme der relativen als auch der absoluten ILC2-Zellzahl

Bei Betrachtung der analysierten Werte für die ILC2-Population ist bei der relativen Zellzahl eine steigende, jedoch nicht signifikante, Tendenz mit dem Alter zu verzeichnen. Im Säuglingsalter sind durchschnittlich 0,07% ILC2 an Gesamtlymphozyten zu messen, im Teenager- bis zum Erwachsenenalter liegt die Anzahl bei 0,10% ILC2 an Gesamtlymphozyten. Bei der Entwicklung der absoluten Zellzahl sieht man eine ähnliche Dynamik wie bei den ILC1: Im Säuglingsalter ist eine Zellzahl von 3,07 ILC2/ μ l Blut zu messen, kurz vor dem Erreichen des Erwachsenenalters liegt die Zellzahl bei 2,29/ μ l Blut. Eine Besonderheit bei dieser Zellpopulation ist, dass die absolute Zellzahl zwischen den Altersgruppen 6-12 und 13-18 Jahre wieder minimal ansteigt: 6-12 Jahre 1,70/ μ l Blut $\pm$ 1,26 vs. 13-18 Jahre 2,29/ μ l Blut $\pm$ 2,52, s. Abb. 6.

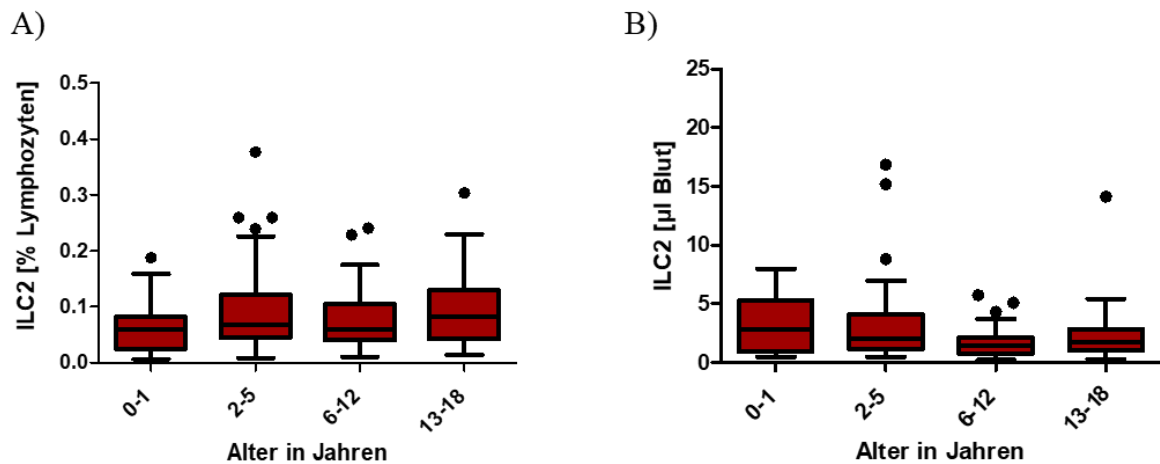


Abb. 6: Relativer und absoluter Zellanteil der ILC2 an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. Darstellung der relativen Zellzahl (A) und der absoluten Zellzahl (B) der ILC2 für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, *** p-Wert $\leq 0,001$.

3.1.4 Keine signifikante Abnahme der relativen und absoluten ILC3-Zellzahl

Im Schnitt sind im Säuglingsalter 0,08% ILC3 an Gesamtlymphozyten zu detektieren. Mit zunehmendem Lebensalter verändert sich der prozentuale Anteil kaum: 2-5 Jahre 0,12%, 6-12 Jahre 0,12% und 13-18 Jahre 0,11% ILC3 an den Gesamtlymphozyten.

Die absolute Zellzahl zeigt einen Rückgang der Zellen mit dem Alter auf. Durchschnittlich sind im Säuglingsalter 4 ILC3/ μ l Blut zu detektieren. Kurz vor dem Erwachsenenalter reduziert sich die absolute Zellzahl bis auf die Hälfte mit im Schnitt 2,4 ILC3/ μ l Blut.

Die Dynamiken sind jedoch nicht signifikant, s. Abb. 7.

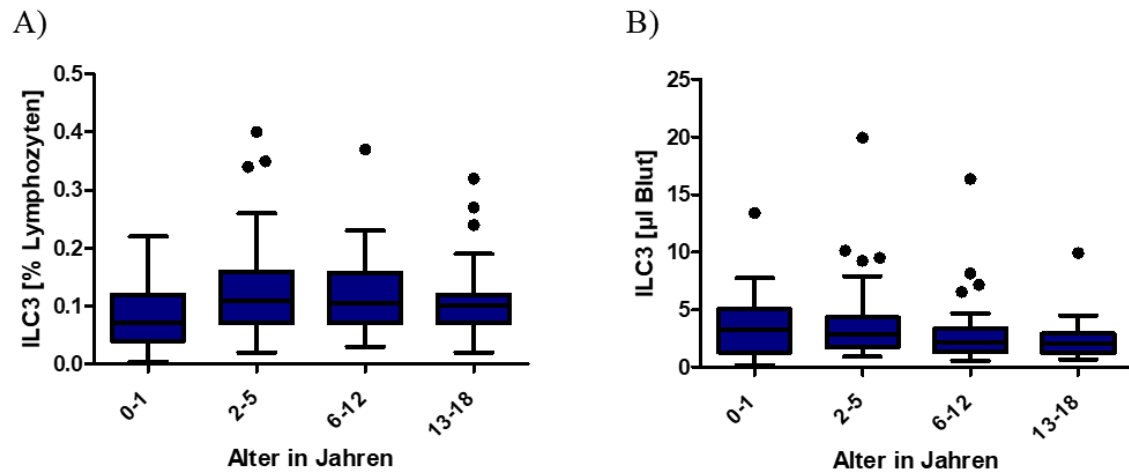


Abb. 7: Relativer und absoluter Zellanteil der ILC3 an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. Darstellung der relativen Zellzahl (A) und der absoluten Zellzahl (B) der ILC3 für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, *** p-Wert $\leq 0,001$.

In Abb. 8 und Tabelle 11 sind die ILC1-ILC3 nochmal zusammen dargestellt.

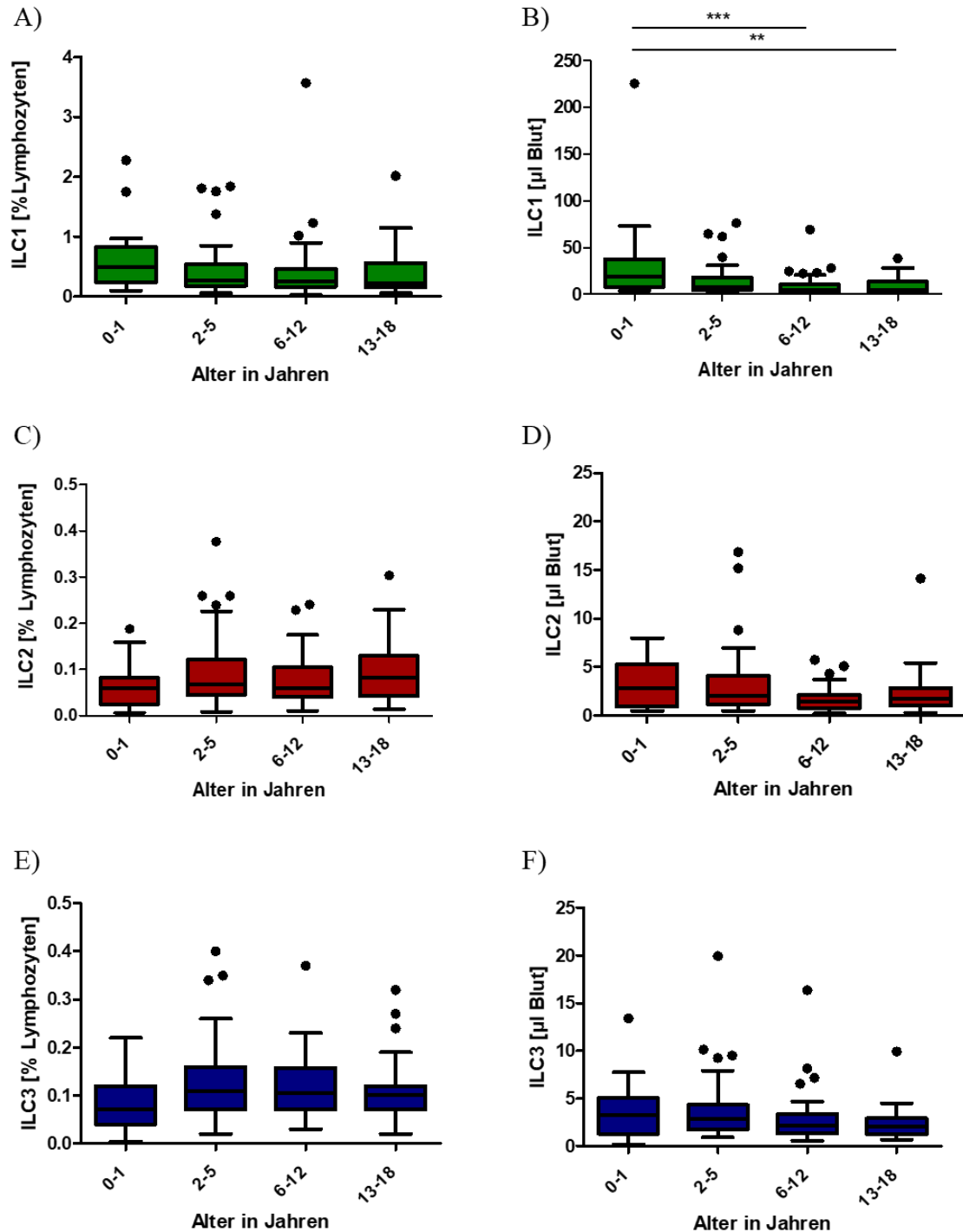


Abb. 8: Relativer und absoluter Zellanteil der ILC1, ILC2, ILC3 an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. (A-C) Darstellung der relativen Zellzahl und (D-F) der absoluten Zellzahl der ILC1, ILC2, ILC3 für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, *** p-Wert $\leq 0,001$.

ILC-Population	0-1 Jahre	2-5 Jahre	6-12 Jahre	13-18 Jahre
Gesamt-ILC [% Lymphozyten] ± SD	0,82 ± 0,65	0,46 ± 0,34	0,41 ± 0,55	0,39 ± 0,40
Gesamt-ILC [µl Blut] ± SD	44,69 ± 58,71	20,26 ± 18,10	13,49 ± 13,09	13,49 ± 10,26
ILC1 [% Lymphozyten] ± SD	0,69 ± 0,99	0,46 ± 0,34	0,41 ± 0,55	0,39 ± 0,40
ILC1 [µl Blut] ± SD	37,62 ± 55,42	13,59 ± 15,59	9,02 ± 11,57	8,80 ± 8,71
ILC2 [% Lymphozyten] ± SD	0,07 ± 0,05	0,09 ± 0,07	0,08 ± 0,06	0,10 ± 0,07
ILC2 [µl Blut] ± SD	3,07 ± 2,21	3,00 ± 3,09	1,70 ± 1,26	2,29 ± 2,52
ILC3 [% Lymphozyten] ± SD	0,08 ± 0,06	0,12 ± 0,08	0,12 ± 0,06	0,11 ± 0,07
ILC3 [µl Blut] ± SD	4,00 ± 3,44	3,69 ± 3,13	2,85 ± 2,66	2,40 ± 1,71

Tabelle 11: Relativer und absoluter Zellanteil der Gesamt-ILCs, ILC1, ILC2 und ILC3 an den Lymphozyten. Gezeigt sind die relativen und absoluten Zahlen der ILCs an den Lymphozyten aufgeteilt in die vier definierten Altersgruppen. Die Werte wurden mittels Graph Pad Prism5 berechnet. Darstellung der Mittelwerte. (n = 158)

3.2 Normwerte weiterer ILC-Subpopulationen

Unter den ILC-Populationen lassen sich weitere Subpopulationen anhand ihrer Expression definieren (Bennstein et al., 2020).

Die Subpopulation, die in dieser Studie noch genauer analysiert wurde, sind die ILC1-Subpopulation mit CD5/CD161-Expression. Diese Subpopulation lässt sich in vier Gruppen unterteilen: CD5⁺CD161⁺, CD5⁺CD161⁻, CD5⁻CD161⁺ und CD5⁻CD161⁻.

3.2.1 Signifikante Abnahme der relativen und absoluten ILC1 mit CD5⁺CD161⁻-Expression

Die ILC1 mit CD5⁺CD161⁻-Expression machen, sowohl in der relativen als auch absoluten Zellzahl, die größte Gruppe der Subpopulation aus.

Im Säuglingsalter beträgt der prozentuale Anteil von CD5⁺CD161⁻-Zellen an ILC1 durchschnittlich 71,18 %, kurz vor dem Beginn des Erwachsenenalter 68,8 %. Eine signifikante Abnahme der relativen Zellzahl kann besonders zwischen der Altersgruppe 2-5 vs. 6-12 Jahren (p-Wert 0,0376) und 2-5 vs. 13-18 Jahren (p-Wert 0,028) verzeichnet werden, s. Abb. 9.

Die gleiche Dynamik zeigt sich bei der absoluten Zellzahl. In der Altersgruppe 0-1 Jahre beträgt die durchschnittliche Zellzahl 20,21/μl Blut, bei der Altersgruppe 13-18 Jahre nur noch durchschnittlich 4,98/μl Blut (p-Wert 0,0038). Somit reduziert sich die absolute Zellzahl der CD5⁺CD161⁻ Population auf fast ein Fünftel bei den Jugendlichen im Vergleich zu den Säuglingen, s. Abb. 9.

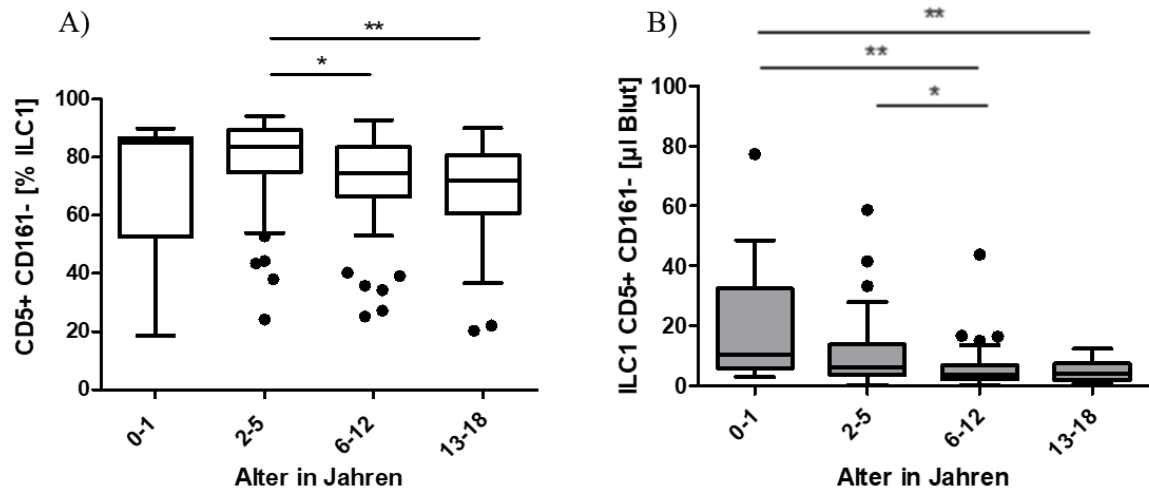


Abb. 10: Relativer Zellanteil der Subpopulation ILC1 CD5⁺CD161⁻ an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. Darstellung der relativen Zellzahl (A) und absoluten Zellzahl (B) für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, *** p-Wert $\leq 0,001$.

3.2.2 Signifikante Zunahme der relativen Zellzahl der ILC1 CD5⁺CD161⁺

Einen signifikanten Anstieg mit dem Alter sieht man bei den ILC1 CD5⁺CD161⁺. Bei den Säuglingen beträgt die relative Anzahl 11,27 % und in der Altersgruppe 2-5 10,98 %. Zwischen diesen beiden Altersgruppen ist noch kein großer Unterschied zu detektieren. Ab dem 7. Lebensjahr beträgt die ILC1-Gruppe mit CD5⁺CD161⁺-Expression durchschnittlich 15,03 % und ab dem Alter des Jugendlichen (13-18 Jahre) ist der Anteil der CD5⁺CD161⁺-Zellen bei durchschnittlich 21,37 %. Innerhalb von 18 Jahren nehmen die CD5⁺CD161⁺ an etwa 10 % im relativen Anteil an den ILC1 zu.

Betrachtet man die absolute Zellzahl ist eine signifikante Abnahme mit dem Alter zu detektieren: Während es im Säuglingsalter noch 3,27/ μ l Blut sind, beträgt die Anzahl in der Altersgruppe 6-12 Jahre 1,77/ μ l Blut. Somit nimmt die Anzahl innerhalb von 6-12 Jahren um fast die Hälfte ab.

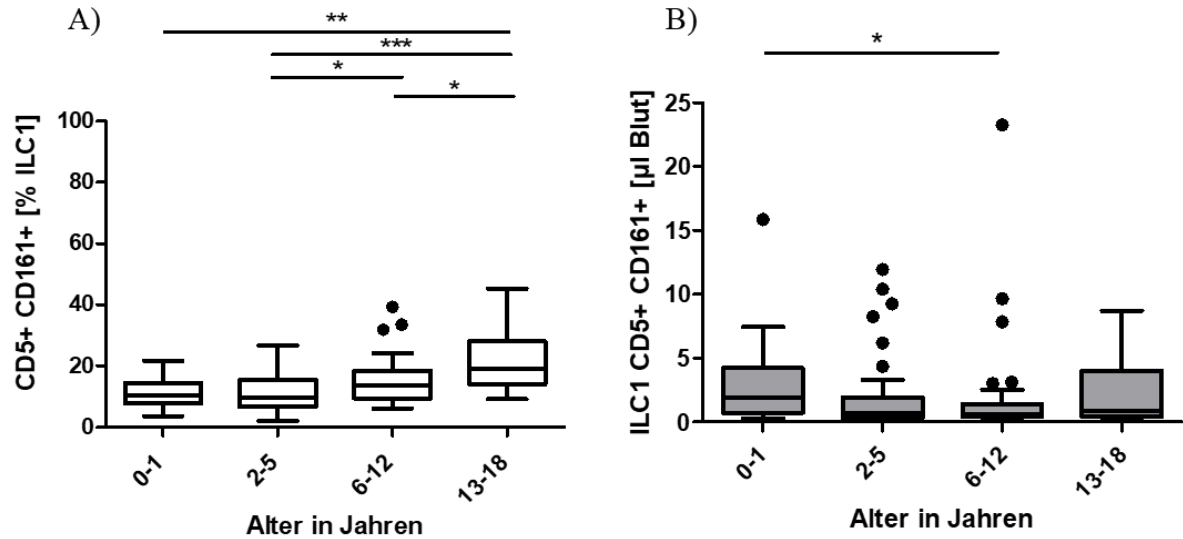


Abb. 11: Relativer und absoluter Zellanteil der Subpopulation ILC1 CD5⁺CD161⁺ an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. Darstellung der relativen Zellzahl (A) und absoluten Zellzahl (B) für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert ≤ 0,05, ** p-Wert ≤ 0,01, *** p-Wert ≤ 0,001.

Die Gruppen CD5⁻CD161⁺ und CD5⁻CD161⁻ zeigen keine signifikante Veränderung mit zunehmendem Lebensalter. Betrachtet man die Dynamik, nehmen sowohl die CD5⁻CD161⁻ und CD5⁻CD161⁺ mit zunehmendem Alter ab, s. Abb. 11.

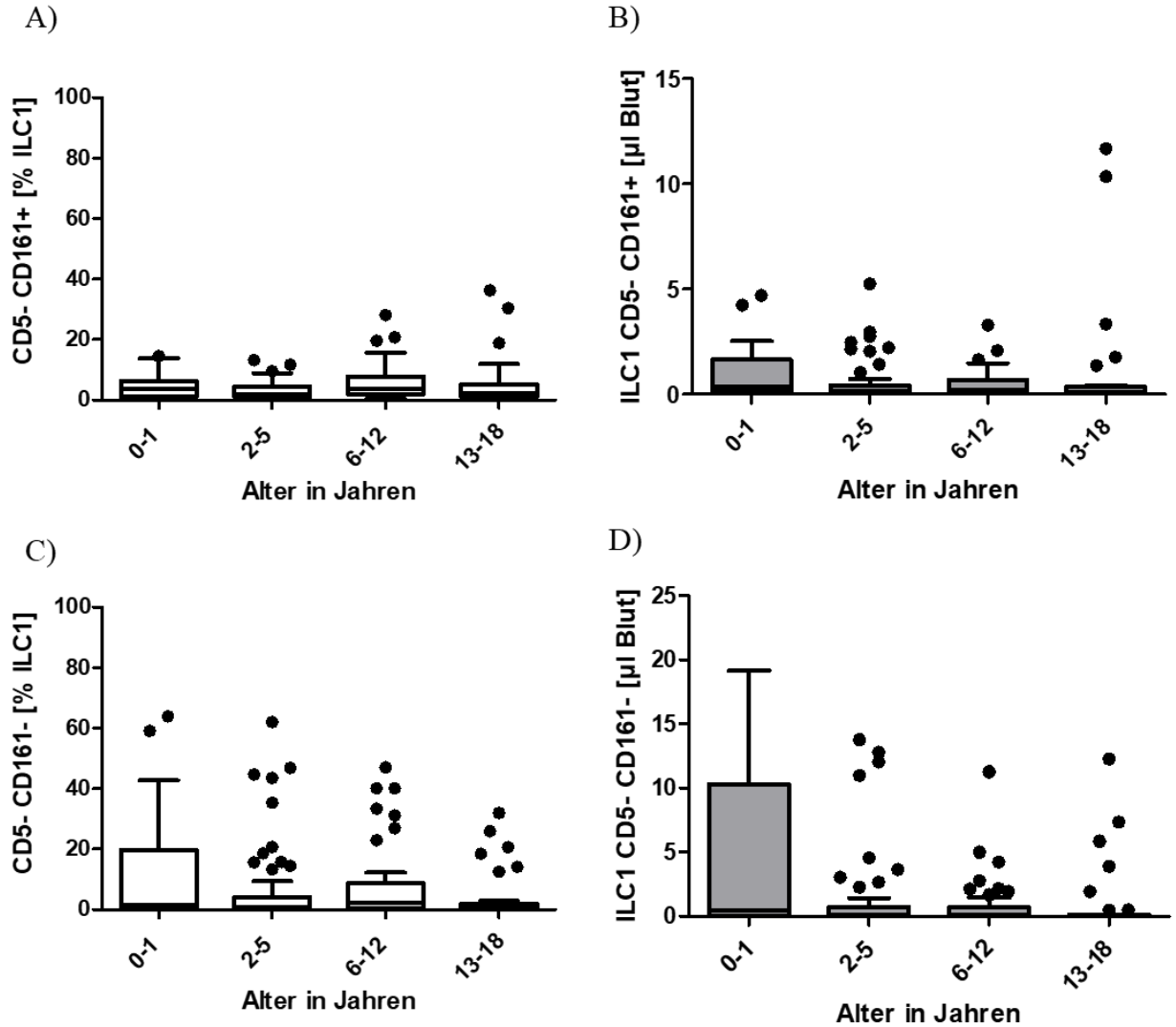


Abb. 11: Relativer und absoluter Zellanteil der Subpopulation ILC1 CD5⁻CD161⁺ und CD5⁻CD161⁻ an den Lymphozyten in verschiedenen Altersgruppen. Darstellung der relativen Zellzahl (A) und absoluten Zellzahl (B) ILC1 CD5⁻CD161⁺ und der relativen (C) und absoluten Zellzahl (D) ILC1 CD5⁻CD161⁻ für die Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre in Form von Tukey box plots. Das Signifikanzniveau wurde mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's und Bonferroni-Post-Test berechnet. * p-Wert ≤ 0,05, ** p-Wert ≤ 0,01, *** p-Wert ≤ 0,001.

In Tabelle 12 sind zusammenfassend die verschiedenen ILC1 Subpopulationen mit CD5 und CD161 Expression dargestellt.

ILC1-Population	0-1 Jahre	2-5 Jahre	6-12 Jahre	13-18 Jahre
CD5 ⁺ CD161 ⁻ [% ILC1] ± SD	71,18 ± 24,85	78,93 ± 14,97	71,25 ± 17,74	68,80 ± 17,46
CD5 ⁺ CD161 ⁻ [µl Blut] ± SD	20,10 ± 21,17	10,03 ± 10,58	6,14 ± 7,28	4,98 ± 3,40
CD5 ⁺ CD161 ⁺ [% ILC1] ± SD	11,27 ± 5,03	10,98 ± 5,73	15,03 ± 7,28	21,37 ± 9,39
CD5 ⁺ CD161 ⁺ [µl Blut] ± SD	3,27 ± 3,99	1,71 ± 2,58	1,77 ± 3,78	2,15 ± 2,35
CD5 ⁻ CD161 ⁺ [% ILC1] ± SD	4,45 ± 4,54	3,26 ± 3,07	5,90 ± 6,09	5,44 ± 8,35
CD5 ⁻ CD161 ⁺ [µl Blut] ± SD	1,13 ± 1,53	0,54 ± 0,98	0,50 ± 0,68	1,00 ± 2,72
CD5 ⁻ CD161 ⁻ [% ILC1] ± SD	13,10 ± 22,74	6,83 ± 13,62	7,82 ± 12,58	4,40 ± 8,47
CD5 ⁻ CD161 ⁻ [µl Blut] ± SD	4,02 ± 6,45	3,26 ± 3,07	5,90 ± 6,09	5,44 ± 8,35

Tabelle 12: Relativer und absoluter Zellanteil der ILC1 mit CD5+CD161+, CD5+CD161-, CD5-CD161+ und CD5-CD161- Expression. Gezeigt sind die relativen und absoluten Zahlen aufgeteilt in die vier definierten Altersgruppen. Die Werte wurden mittels Graph Pad Prism5 berechnet. Darstellung der Mittelwerte. (n = 158)

3.3 Fazit

Zusammenfassend konnte aufgezeigt werden, dass alle ILC-Populationen in ihrer Frequenz mit dem Alter abnehmen. Der signifikante Rückgang der Zellen konnte jedoch nur an den ILC1, sowohl in der absoluten als auch in der relativen Zellzahl, detektiert werden. Die höchste ILC-Frequenz ist bei den Säuglingen zu finden, die niedrigste bei den Jugendlichen. Wie bei allen ILC-Populationen zu sehen ist (s. Abb. 8), scheint bei der absoluten Zellzahl ein besonders starker Rückgang zwischen den Altersgruppen 2-5 und 6-12 zu sein.

Die am häufigsten im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen vorkommende ILC-Population ist die ILC1-Population: Im Mittel machen sie bis zu 0,49 % der Lymphozyten und bis zu 17 Zellen pro μl im peripheren Blut aus. Die ILC2 und ILC3 machen im Schnitt einen deutlich geringeren Zellanteil im peripheren Blut bei Kindern und Jugendlichen aus. Die ILC3 haben durchschnittlich einen Anteil von 0,11 % an Lymphozyten bzw. 3,24 ILC3 pro μl . Bei den ILC2 sind es nur noch einen Anteil von 0,09 % an Gesamtlymphozyten bzw. 2,52 ILC2 pro μl Blut. Betrachtet man alle ILC-Gruppen zusammen, hat die ILC1-Population eine 4- bis 5-fach höhere Anzahl sowohl in der relativen als auch in der absoluten Zellzahl verglichen mit der Zellzahl der ILC2 und ILC3.

Die höchste ILC-Frequenz ist bei den Säuglingen zu finden, die niedrigste bei den Jugendlichen. Nach Datenauswertung der zirkulierenden ILC1-, ILC2- und ILC3-Frequenzen in PB-Proben von 148 Kindern und Jugendlichen zeigen Abb. 13 und Tabelle 13 folgende Verteilung:

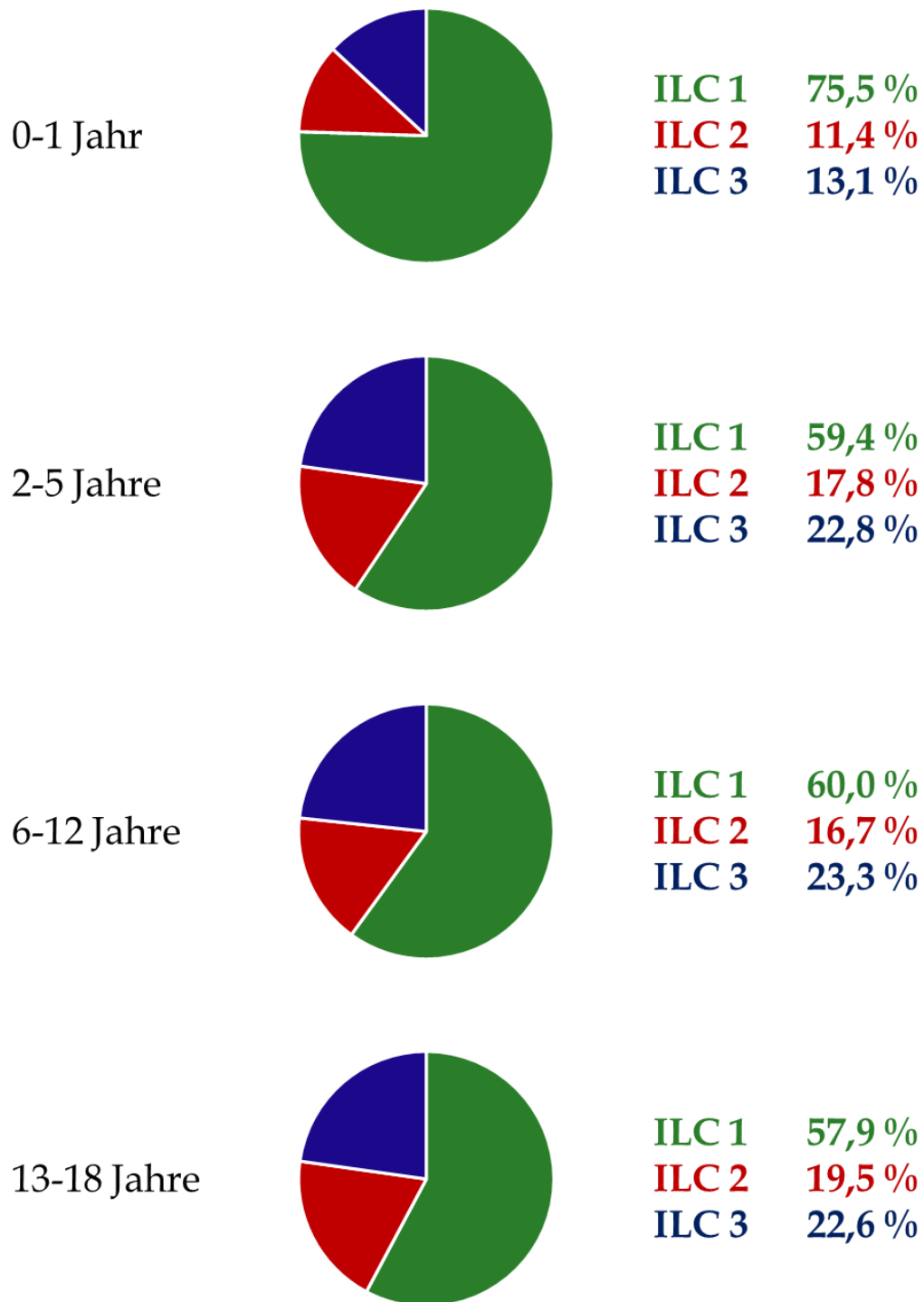


Abb. 13: Prozentuale Verteilung der ILC1, ILC2 und ILC3 im peripheren Blut. Darstellung in Form von Kuchendiagrammen. Altersgruppen 0-1 (n = 15), 2-5 (n = 57), 6-12 (n = 44) und 13-18 (n = 32) Jahre.

ILC-Population	0-1 Jahre	2-5 Jahre	6-12 Jahre	13-18 Jahre
Gesamt-ILC [% Lymphozyten]	0,82	0,46	0,41	0,39
Gesamt-ILC [μ l Blut]	44	20	13	13
ILC1 [% Lymphozyten]	0,70	0,46	0,41	0,39
ILC1 [μ l Blut]	37	13	9	8
ILC2 [% Lymphozyten]	0,07	0,09	0,08	0,09
ILC2 [μ l Blut]	3	3	1	2
ILC3 [% Lymphozyten]	0,08	0,12	0,12	0,11
ILC3 [μ l Blut]	4	3	2	2

Tabelle 13: Relativer und absoluter Zellanteil der Gesamt-ILCs, ILC1, ILC2 und ILC3 an den Lymphozyten. Gezeigt sind die relativen und absoluten Zahlen der ILCs an den Lymphozyten aufgeteilt in die vier definierten Altersgruppen. Die Werte wurden mittels Graph Pad Prism5 berechnet. Darstellung der Mittelwerte. (n = 158)

4 Diskussion

4.1 Ermittlung der Normwerte bei Kindern und Jugendlichen

In dieser Arbeit wurde der relative und absolute Zellanteil der zirkulierenden ILC1, ILC2 und ILC3 an den Lymphozyten im peripheren Blut bei gesunden Kindern und Jugendlichen in verschiedenen Altersgruppen von 0 bis 18 Jahren bestimmt.

2016 analysierte bereits eine Arbeitsgruppe die Frequenz verschiedener ILC-Populationen (NK-Zellen, ILC1, ILC2 und ILC3) (Vely et al., 2016). Die Arbeit umfasste jedoch nur Daten von 29 Kindern und zeigte keine Dynamik im Alter von 6 bis 18 Jahren. Eine Auswertung zu dem Alter 0 bis 6 Jahren gab es bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht. Es ist bereits bekannt, dass die Frequenzen der zirkulierenden ILCs mit zunehmendem Alter abnehmen (Vely et al., 2016, Bennis et al., 2020). Die in der Literatur bereits beschriebene abnehmende Dynamik der ILC-Frequenzen beginnend von CB bis ins hohe Alter konnte in dieser Arbeit im Kindes- und Jugendalter ebenfalls beobachtet werden.

Die am häufigsten im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen vorkommende ILC-Population ist die ILC1-Population. Sie nehmen mit dem Alter ab, bleiben aber die höchstvertretene ILC-Population im Kindes- und Jugendalter. Im Mittel machen sie bis zu 70 % der Gesamt-ILCs im peripheren Blut aus (s. Abb. 8).

Auch im Erwachsenenalter bleibt die ILC1-Population die häufigste zirkulierende ILC-Population mit bis im Schnitt 0,05 bis 0,1 % (Bennis et al., 2020). In der Literatur gab es jedoch Arbeitsgruppen, die die ILC2s als am häufigsten zirkulierende ILC-Population im Blut detektiert haben (Hazenberg and Spits, 2014, Spits and Cupedo, 2012, Darboe et al., 2020). Diese Diskrepanz könnte von verschiedenen Patientenkohorten mit unterschiedlichem Lebensalter oder der Variabilität in den Experimenten durch verschiedene Gatingstrategien zustande kommen.

ILC1 im CB wurden als Zellen detektiert, die ein großes Potenzial haben, je nach Zytokin-Stimulation oder Zytokin-Umgebung, in NK-Zellen, zu differenzieren (Bennis et al.,

2020). Das Immunsystem der Kinder und Jugendlichen befindet sich noch im stetigen Wandel und wird von vielen intrinsischen und extrinsischen Faktoren beeinflusst (Dowling and Levy, 2014, Brodin and Davis, 2017, Brodin et al., 2015). Das Potenzial der CB-ILC1 sich in andere Zellen differenzieren zu können, wäre ein Mechanismus, der auch im Blut von Kindern und Jugendlichen ein enormer Vorteil wäre und die ILC1-Dominanz im Blut erklären könnte. Die Entwicklung der immunologischen Zellpopulationen, besonders der ILCs, würde zu eigenem Vorteil gelenkt werden. Je nach Bedarf würde die Differenzierung der ILCs gefördert werden, die der Körper in verschiedenen Lebenssituationen benötigt. Ein weiterer möglicher Grund für die ILC1-Dominanz im peripheren Blut bei Kindern und Jugendlichen, und mit dem Alter absinkende Frequenzen dieser Population, könnte sein, dass ILC1 ihre potenzielle Migrationsfähigkeit ausnutzen (Bennstein et al., 2020). Somit könnten sie mit zunehmendem Alter zu Gewebe wandern, dort migrieren und sich im Gewebe differenzieren. Nach Differenzierung würden sie sich zu gewebe-residenten ILCs entwickeln und z. B. einen schützenden Beitrag zur Gewebefunktion leisten. Durch die Möglichkeit zur IFN γ -Produktion können gewebe-residente ILC1 besonders effektiv gegen pathogene Erreger wirken (Artis and Spits, 2015).

In dieser Arbeit wurden nicht nur die ILC1-, ILC2- und ILC3-Populationen analysiert. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits nachweisen können, dass es noch Subpopulationen in den einzelnen ILC-Gruppen gibt, die Oberflächenmarker besitzen, die auch von T-Zellen exprimiert werden. Das wirft die Frage auf, wieso ILCs T-Zell-Marker exprimieren und welche Funktion sie bei den ILCs haben. Bei den ILC1 wurden vier verschiedene Subpopulationen mit CD5/CD161-Expression im CB beschrieben: CD5⁺CD161⁺ ILC1, CD5⁻CD161⁺ ILC1, CD5⁻CD161⁻ ILC1 und CD5⁺CD161⁻ ILC1 (Bennstein et al., 2020). Die Mehrheit der ILC1 im CB zeigte eine CD5⁺CD161⁻ Expression, die Minderheit eine CD5⁻CD161⁺ Expression. Die Produktion von IFN γ war nur bei CD161⁺ zu detektieren, womit die Mehrheit der ILC1 im CB funktional unreif sind, dafür aber durch Expression von Chemokinen wie CCR4, CCR7 und CCR9 eine gewisse Migrationsfähigkeit in verschiedene Gewebe besitzen können (Bennstein et al., 2020). CD5 wird von naiven T-Zellen, Effektor-T-Zellen und Thymozyten exprimiert (Voisinne et al., 2018, Nagasawa et al., 2017). Der Oberflächenmarker CD161 (auch KLRB1) wird außer auf ILCs noch auf NK-

Zellen und T-Zellen exprimiert. Auf NK-Zellen reguliert CD161 deren Zytotoxizität. In dieser Arbeit konnten die vier verschiedenen Gruppen mit CD5- und CD161-Expression bei Kindern und Jugendlichen auf den ILC1 detektiert und analysiert werden. Die häufigste gemessene Population war die $CD5^+CD161^-ILC1$. Die Kinder und Jugendlichen zeigen somit, wie im CB auch, dass die meisten ILC1 wahrscheinlich ebenfalls nicht funktional sind, weil sie kein CD161 exprimieren. Die ILC1-Subpopulation mit $CD5^+CD161^-$ Expression nahm im Kindes- und Jugendalter stetig ab. Ein signifikanter Anstieg der $CD5^+CD161^+ILC1$ konnte in dieser Arbeit mit steigendem Alter detektiert werden. Somit hätten die ILC1 mit steigendem Alter bei Kindern und Jugendlichen das Potenzial, funktional (mittels $IFN\gamma$ -Produktion) wirksam zu sein. Diese Erkenntnis gibt einen Anreiz für die weitere Erforschung dieser ILC1-Subpopulation im peripheren Blut. Besonders wäre es interessant zu wissen, ob Erwachsene (Alter > 18 Jahre) ebenfalls diese ILC1-Konstellation zeigen oder ob sich die Verteilung von CD5 und CD161 wieder verändert. Die Funktion von CD5 bei den ILC1 müsste in Zukunft ebenfalls weiter erforscht werden, da CD5 bis jetzt hauptsächlich auf T-Zellen exprimiert wird.

4.2 Limitation

Eine Limitation unserer Studie ist, dass die Studie mehr männliche als weibliche Probanden in die Studie eingeschlossen hat. Das liegt daran, dass Jungen mehr von Erkrankungen, wie Leistenhernien oder Zirkumzisionen, erkranken und elektiv behandelt werden können bzw. müssen, als Mädchen. Außerdem wurden keine Patienten mit Infektions- oder Entzündungskrankheiten oder Patienten mit Immundefekten eingeschlossen, da das Ziel dieser Studie die Erfassung der Normwerte für gesunde Kinder und Jugendliche war.

4.3 Referenzwerte für die Pädiatrie

Mit der Ermittlung der Normwerte von zirkulierenden ILC1, ILC2 und ILC3 im peripheren Blut von Kindern und Jugendlichen von 0 bis 18 Jahren wurde erstmals eine valide Referenz geschaffen, die in Zukunft wichtigen klinischen Nutzen in der Pädiatrie bietet. In den letzten

Jahren wurden mehr und mehr die zirkulierenden ILCs in Augenmerk genommen. Die Zahl der zirkulierenden ILCs könnte einen Anhalt dafür geben, ob z. B. ein Patient droht, in einen septischen Schock zu gleiten (Carvelli et al., 2019). Normwerte für Kinder und Jugendliche für andere zirkulierende immunologische Zellpopulationen existieren bereits (Garcia-Prat et al., 2019, Ding et al., 2018, Huck et al., 2009). Daten zu den ILC1, ILC2 und ILC3 bei Kindern und Jugendlichen gab es vor Beginn dieser Arbeit bisher noch nicht.

Ein kritischer Aspekt in dieser Arbeit war die Probengewinnung. Bei Kindern und Jugendlichen ist es nicht ethisch vertretbar, viel Blutvolumen abzunehmen. Säuglinge haben ein Blutvolumen von ca. 80-100 ml pro kg Körpergewicht (Howie, 2011). Ein Kind mit 4 kg Körpergewicht hat ein Blutvolumen von durchschnittlich 360 ml. Somit kann man nicht, wie bei den Erwachsenen, für Studienzwecke 10 oder 20 ml Blut abnehmen. Ein Kind mit 4 kg Körpergewicht würde bei 20 ml Blutentnahme bis zu 6 % seines Blutvolumens verlieren. In der Literatur schwanken die Werte der maximalen Volumina, die bei Kindern und Jugendlichen bei einer Blutentnahme gewonnen werden können (Howie, 2011). Bei Säuglingen (0-1 Jahre) wurden in dieser Arbeit im Schnitt 1 ml, max. 2 ml, Blut abgenommen, sodass durch die Teilnahme an dieser Studie keine gesundheitlichen Nachteile für die Probanden entstanden sind, wie z. B. zu hoher Blutverlust. Die Blutentnahmen in dieser Arbeit wurden so geplant, dass die Probanden kein zusätzliches Prozedere einer Blutentnahme durchmachen mussten. Alle Blutentnahmen wurden direkt nach dem Legen einer peripheren Venenverweilkanüle, die für die geplante Operation essenziell war, gewonnen. Mithilfe des Panels für die Färbung der ILCs und die Messung mittels FACS (Bianca Bennstein et al., 2019) war es möglich auch mit Proben von 1 ml aussagekräftige Informationen über die Normwerte der ILC1, ILC2 und ILC3 zu ermitteln.

Im nächsten Schritt wäre die Analyse der ILCs von PB-Proben von kranken Kindern interessant. Mit dem Wissen über die in dieser Arbeit generierten Referenzwerte könnten Veränderungen und Dynamiken der ILCs bei Proben von kranken Kindern analysiert werden. Die Relevanz und das Prozedere einer Blutentnahme müssten bei diesen Probanden ebenfalls genau erörtert werden. Bei kranken Kindern und Jugendlichen ist eine Blutentnahme risikobehafteter. Mit einer Blutentnahme nur für Studienzwecke würden

höchstwahrscheinlich die meisten Angehörigen und Sorgeberechtigten nicht einverstanden sein. Man könnte jedoch restliches Blut von den Routineuntersuchungen verwenden, die die chronisch kranken Kinder regelmäßig erhalten. Die hohe Probandenanzahl in dieser Arbeit (n = 148 Kinder und Jugendliche) war nur möglich, weil den Sorgeberechtigten zugesichert wurde, dass die Kinder kein zusätzliches Prozedere einer Blutentnahme mitbekommen würden und dass die Blutentnahme im Rahmen eines Routineeingriffes erfolgte.

In dieser Arbeit lag das Augenmerk auf zirkulierenden ILCs. Die gewebe-residenten ILCs von Kindern und Jugendlichen wurden bisher noch nicht analysiert. In der Zukunft wäre es äußerst interessant zu beobachten und zu analysieren, wie sich die gewebe-residenten ILCs, zum einen im gesunden und zum anderen im kranken Gewebe, bei Kindern und Jugendlichen verhalten. Eine Möglichkeit wäre Schleimhaut im Nasopharyngealbereich. Zum einen ist der Zugang zu einer Schleimhautprobe simpel, zum anderen sind jedoch häufig Dauerbesiedler in der Rachen-Schleimhautflora, die eine gewisse Entzündung im Gewebe auslösen könnten und damit die Normwerte verfälschen könnten. Wie bereits bei CB oder bei PB von Erwachsenen gezeigt wurde, haben zirkulierende ILCs andere Funktionen als gewebe-residente ILCs (Bennstein et al., 2021, Di Santo et al., 2017, Lim and Di Santo, 2019, Lim et al., 2017, Bennstein and Uhrberg, 2024).

Die in dieser Arbeit ermittelten Normwerte zeigen zum einen die absolute Zellzahl ILC an den Gesamtlymphozyten und zum anderen die relative Zellzahl ILC an den Gesamtlymphozyten. Damit könnten in Zukunft alle Arbeitsgruppen, die die in dieser Arbeit ermittelten Werte als Referenz nutzen, um zu überprüfen, welche Unterschiede bei erkrankten Kindern zu sehen sind.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ADAN, A., ALIZADA, G., KIRAZ, Y., BARAN, Y. & NALBANT, A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 37, 163-176.
- AGGARWAL, R., LU, J., POMPILI, V. J. & DAS, H. 2012. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. *Curr Mol Med*, 12, 34-49.
- ANDREA, M., SUSANNA, B., FRANCESCA, N., ENRICO, M. & ALESSANDRA, V. 2020. The emerging role of Type 2 inflammation in asthma. *Expert Rev Clin Immunol*.
- ANSEL, K. M. & CYSTER, J. G. 2001. Chemokines in lymphopoiesis and lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol*, 13, 172-9.
- ARASE, H. & LANIER, L. L. 2002. Virus-driven evolution of natural killer cell receptors. *Microbes Infect*, 4, 1505-12.
- ARTIS, D. & SPITS, H. 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517, 293-301.
- BARTEMES, K. R. & KITA, H. 2021. Roles of innate lymphoid cells (ILCs) in allergic diseases: The 10-year anniversary for ILC2s. *J Allergy Clin Immunol*, 147, 1531-1547.
- BENNSTEIN, S. B., SCHERENSCHLICH, N., WEINHOLD, S., MANSER, A. R., NOLL, A., RABA, K., KOGLER, G., WALTER, L. & UHRBERG, M. 2021. Transcriptional and functional characterization of neonatal circulating ILCs. *Stem Cells Transl Med*.
- BENNSTEIN, S. B. & UHRBERG, M. 2021. Biology and therapeutic potential of human innate lymphoid cells. *FEBS J*.
- BENNSTEIN, S. B. & UHRBERG, M. 2024. Circulating innate lymphoid cells (cILCs): Unconventional lymphocytes with hidden talents. *J Allergy Clin Immunol*, 154, 523-536.
- BENNSTEIN, S. B., WEINHOLD, S., MANSER, A. R., SCHERENSCHLICH, N., NOLL, A., RABA, K., KÖGLER, G., WALTER, L. & UHRBERG, M. 2020. Umbilical

- cord blood-derived ILC1-like cells constitute a novel precursor for mature KIR(+)NKG2A(-) NK cells. *Elife*, 9.
- BERGER, R., ABELE, H., BAHLMANN, F., BEDEI, I., DOUBEK, K., FELDERHOFF-MUSER, U., FLUHR, H., GARNIER, Y., GRYLKA-BAESCHLIN, S., HELMER, H., HERTING, E., HOOPMANN, M., HOSLI, I., HOYME, U., JENDREIZECK, A., KRENTTEL, H., KUON, R., LUTJE, W., MADER, S., MAUL, H., MENDLING, W., MITSCHDORFER, B., NICIN, T., NOTHACKER, M., OLBERTZ, D., RATH, W., ROLL, C., SCHLEMBACH, D., SCHLEUSSNER, E., SCHUTZ, F., SEIFERT-KLAUSS, V., STEPPAT, S. & SURBEK, D. 2019. [Prevention and Therapy of Preterm Birth. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k Level, AWMF Registry Number 015/025, February 2019) - Part 1 with Recommendations on the Epidemiology, Etiology, Prediction, Primary and Secondary Prevention of Preterm Birth]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 223, 304-316.
- BERNINK, J. H., PETERS, C. P., MUNNEKE, M., TE VELDE, A. A., MEIJER, S. L., WEIJER, K., HREGGVIDSDOTTIR, H. S., HEINSBROEK, S. E., LEGRAND, N., BUSKENS, C. J., BEMELMAN, W. A., MJOSBERG, J. M. & SPITS, H. 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol*, 14, 221-9.
- BIANCA BENNSTEIN, S., RICCARDA MANSER, A., WEINHOLD, S., SCHERENSCHLICH, N. & UHRBERG, M. 2019. OMIP-055: Characterization of Human Innate Lymphoid Cells from Neonatal and Peripheral Blood. *Cytometry A*, 95, 427-430.
- BIRON, C. A., NGUYEN, K. B., PIEN, G. C., COUSENS, L. P. & SALAZAR-MATHER, T. P. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17, 189-220.
- BJORKLUND, A. K., FORKEL, M., PICELLI, S., KONYA, V., THEORELL, J., FRIBERG, D., SANDBERG, R. & MJOSBERG, J. 2016. The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol*, 17, 451-60.

- BRESLIN, J. W., YANG, Y., SCALLAN, J. P., SWEAT, R. S., ADDERLEY, S. P. & MURFEE, W. L. 2018. Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Compr Physiol*, 9, 207-299.
- BRESTOFF, J. R., KIM, B. S., SAENZ, S. A., STINE, R. R., MONTICELLI, L. A., SONNENBERG, G. F., THOME, J. J., FARBER, D. L., LUTFY, K., SEALE, P. & ARTIS, D. 2015. Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*, 519, 242-6.
- BRODIN, P. & DAVIS, M. M. 2017. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*, 17, 21-29.
- BRODIN, P., JOJIC, V., GAO, T., BHATTACHARYA, S., ANGEL, C. J., FURMAN, D., SHEN-ORR, S., DEKKER, C. L., SWAN, G. E., BUTTE, A. J., MAECKER, H. T. & DAVIS, M. M. 2015. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell*, 160, 37-47.
- CALIGIURI, M. A. 2008. Human natural killer cells. *Blood*, 112, 461-9.
- CARR, E. J., DOOLEY, J., GARCIA-PEREZ, J. E., LAGOU, V., LEE, J. C., WOUTERS, C., MEYTS, I., GORIS, A., BOECKXSTAENS, G., LINTERMAN, M. A. & LISTON, A. 2016. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. *Nat Immunol*, 17, 461-468.
- CARREGA, P., CAMPANA, S., BONACCORSI, I. & FERLAZZO, G. 2016. The Yin and Yang of Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Immunol Lett*, 179, 29-35.
- CARVELLI, J., PIPEROGLOU, C., BOURENNE, J., FARNARIER, C., BANZET, N., DEMERLE, C., GAINNIER, M. & VELY, F. 2019. Imbalance of Circulating Innate Lymphoid Cell Subpopulations in Patients With Septic Shock. *Front Immunol*, 10, 2179.
- CELLA, M., FUCHS, A., VERMI, W., FACCHETTI, F., OTERO, K., LENNERZ, J. K., DOHERTY, J. M., MILLS, J. C. & COLONNA, M. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, 457, 722-5.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A. & CALIGIURI, M. A. 2001a. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22, 633-40.

- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A., TURNER, S. C., CHEN, K. S., GHADERI, B. A., GHAYUR, T., CARSON, W. E. & CALIGIURI, M. A. 2001b. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97, 3146-51.
- CRELLIN, N. K., TRIFARI, S., KAPLAN, C. D., CUPEDO, T. & SPITS, H. 2010. Human NKp44+IL-22+ cells and LTI-like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells. *J Exp Med*, 207, 281-90.
- CUPEDO, T., CRELLIN, N. K., PAPAZIAN, N., ROMBOUTS, E. J., WEIJER, K., GROGAN, J. L., FIBBE, W. E., CORNELISSEN, J. J. & SPITS, H. 2009. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol*, 10, 66-74.
- DARBOE, A., NIELSEN, C. M., WOLF, A. S., WILDFIRE, J., DANSO, E., SONKO, B., BOTTOMLEY, C., MOORE, S. E., RILEY, E. M. & GOODIER, M. R. 2020. Age-Related Dynamics of Circulating Innate Lymphoid Cells in an African Population. *Front Immunol*, 11, 594107.
- DAVIS, M. M. 2008. A prescription for human immunology. *Immunity*, 29, 835-8.
- DI SANTO, J. P., LIM, A. I. & YSSEL, H. 2017. 'ILC-poiesis': generating tissue ILCs from naive precursors. *Oncotarget*, 8, 81729-81730.
- DIEFENBACH, A. 2013. Innate lymphoid cells in the defense against infections. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 3, 143-51.
- DING, Y., ZHOU, L., XIA, Y., WANG, W., WANG, Y., LI, L., QI, Z., ZHONG, L., SUN, J., TANG, W., LIANG, F., XIAO, H., QIN, T., LUO, Y., ZHAO, X., SHU, Z., RU, Y., DAI, R., WANG, H., WANG, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S., GAO, C., DU, H., ZHANG, X., CHEN, Z., WANG, X., SONG, H., YANG, J. & ZHAO, X. 2018. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China. *J Allergy Clin Immunol*, 142, 970-973 e8.
- DOWLING, D. J. 2016. Early life immune ontogeny - understanding how we build and sustain immunity to infection. *Perspect Public Health*, 136, 205-7.
- DOWLING, D. J. & LEVY, O. 2014. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol*, 35, 299-310.

- EBERL, G., COLONNA, M., DI SANTO, J. P. & MCKENZIE, A. N. 2015. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science*, 348, aaa6566.
- EICHBERGER, J. & RESCH, B. 2022. Reliability of Interleukin-6 Alone and in Combination for Diagnosis of Early Onset Neonatal Sepsis: Systematic Review. *Front Pediatr*, 10, 840778.
- ENTWISTLE, L. J., PUTTUR, F., GREGORY, L. G. & LLOYD, C. M. 2020. Group 2 ILC Functional Assays in Allergic Airway Inflammation. *Methods Mol Biol*, 2121, 99-114.
- EYERICH, S., EYERICH, K., CAVANI, A. & SCHMIDT-WEBER, C. 2010. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol*, 31, 354-61.
- FALLON, P. G., BALLANTYNE, S. J., MANGAN, N. E., BARLOW, J. L., DASVARMA, A., HEWETT, D. R., MCILGORM, A., JOLIN, H. E. & MCKENZIE, A. N. 2006. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med*, 203, 1105-16.
- FORKEL, M., VAN TOL, S., HOOG, C., MICHAELSSON, J., ALMER, S. & MJOSBERG, J. 2019. Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*, 13, 67-78.
- FUCHS, A., VERMI, W., LEE, J. S., LONARDI, S., GILFILLAN, S., NEWBERRY, R. D., CELLA, M. & COLONNA, M. 2013. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity*, 38, 769-81.
- GARCIA-PRAT, M., ALVAREZ-SIERRA, D., AGUILO-CUCURULL, A., SALGADO-PERANDRES, S., BRIONGOS-SEBASTIAN, S., FRANCO-JARAVA, C., MARTIN-NALDA, A., COLOBRAN, R., MONTSERRAT, I., HERNANDEZ-GONZALEZ, M., PUJOL-BORRELL, R., SOLER-PALACIN, P. & MARTINEZ-GALLO, M. 2019. Extended immunophenotyping reference values in a healthy pediatric population. *Cytometry B Clin Cytom*, 96, 223-233.

- GEIER, C. B., KRAUPP, S., BRA, D., EIBL, M. M., FARMER, J. R., CSOMOS, K., WALTER, J. E. & WOLF, H. M. 2017. Reduced numbers of circulating group 2 innate lymphoid cells in patients with common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol*, 47, 1959-1969.
- HAMS, E., ARMSTRONG, M. E., BARLOW, J. L., SAUNDERS, S. P., SCHWARTZ, C., COOKE, G., FAHY, R. J., CROTTY, T. B., HIRANI, N., FLYNN, R. J., VOEHRINGER, D., MCKENZIE, A. N., DONNELLY, S. C. & FALLON, P. G. 2014. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 367-72.
- HANNA, J., GOLDMAN-WOHL, D., HAMANI, Y., AVRAHAM, I., GREENFIELD, C., NATANSON-YARON, S., PRUS, D., COHEN-DANIEL, L., ARNON, T. I., MANASTER, I., GAZIT, R., YUTKIN, V., BENHARROCH, D., PORGADOR, A., KESHET, E., YAGEL, S. & MANDELBOIM, O. 2006. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*, 12, 1065-74.
- HAZENBERG, M. D. & SPITS, H. 2014. Human innate lymphoid cells. *Blood*, 124, 700-9.
- HOCHDORFER, T., WINKLER, C., PARDALI, K. & MJOSBERG, J. 2019. Expression of c-Kit discriminates between two functionally distinct subsets of human type 2 innate lymphoid cells. *Eur J Immunol*, 49, 884-893.
- HONDA, K., NAKANO, H., YOSHIDA, H., NISHIKAWA, S., RENNERT, P., IKUTA, K., TAMECHIKA, M., YAMAGUCHI, K., FUKUMOTO, T., CHIBA, T. & NISHIKAWA, S. I. 2001. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med*, 193, 621-30.
- HOWIE, S. R. 2011. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ*, 89, 46-53.
- HUCK, K., FEYEN, O., GHOSH, S., BELTZ, K., BELLERT, S. & NIEHUES, T. 2009. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin Immunol*, 131, 50-9.

- JUELKE, K. & ROMAGNANI, C. 2016. Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). *Curr Opin Immunol*, 38, 75-85.
- KELLY, K. A. & SCOLLAY, R. 1992. Seeding of neonatal lymph nodes by T cells and identification of a novel population of CD3-CD4⁺ cells. *Eur J Immunol*, 22, 329-34.
- KIESSLING, R., KLEIN, E., PROSS, H. & WIGZELL, H. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 5, 117-21.
- KIM, B. S. 2015. Innate lymphoid cells in the skin. *J Invest Dermatol*, 135, 673-678.
- KIM, H. Y., LEE, H. J., CHANG, Y. J., PICHAVANT, M., SHORE, S. A., FITZGERALD, K. A., IWAKURA, Y., ISRAEL, E., BOLGER, K., FAUL, J., DEKRUYFF, R. H. & UMETSU, D. T. 2014. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat Med*, 20, 54-61.
- KIM, H. Y., UMETSU, D. T. & DEKRUYFF, R. H. 2016. Innate lymphoid cells in asthma: Will they take your breath away? *Eur J Immunol*, 46, 795-806.
- KIRCHBERGER, S., ROYSTON, D. J., BOULARD, O., THORNTON, E., FRANCHINI, F., SZABADY, R. L., HARRISON, O. & POWRIE, F. 2013. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J Exp Med*, 210, 917-31.
- KLOSE, C. S. N., FLACH, M., MÖHLE, L., ROGELL, L., HOYLER, T., EBERT, K., FABIUNKE, C., PFEIFER, D., SEXL, V., FONSECA-PEREIRA, D., DOMINGUES, R. G., VEIGA-FERNANDES, H., ARNOLD, S. J., BUSSLINGER, M., DUNAY, I. R., TANRIVER, Y. & DIEFENBACH, A. 2014. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*, 157, 340-356.
- KURIOKA, A., COSGROVE, C., SIMONI, Y., VAN WILGENBURG, B., GEREMIA, A., BJÖRKANDER, S., SVERREMARK-EKSTRÖM, E., THURNHEER, C., GÜNTARD, H. F., KHANNA, N., T. S. H. C. S., O. I. C. I., WALKER, L. J., ARANCIBIA-CÁRCAMO, C. V., NEWELL, E. W., WILLBERG, C. B., KLENERMAN, P., AUBERT, V., BATTEGAY, M., BERNASCONI, E., BÖNI, J., BRAUN, D., BUCHER, H., BURTON-JEANGROS, C., CALMY, A.,

- CAVASSINI, M., DOLLENMAIER, G., EGGER, M., ELZI, L., FEHR, J., FELLAY, J., FURRER, H., FUX, C., GORGIEVSKI, M., GÜNTARD, H., HAERRY, D., HASSE, B., HIRSCH, H., HOFFMANN, M., HÖSLI, I., KAHLERT, C., KAISER, L., KEISER, O., KLIMKAIT, T., KOUYOS, R., KOVARI, H., LEDERGERBER, B., MARTINETTI, G., MARTINEZ DE TEJADA, B., MARZOLINI, C., METZNER, K., MÜLLER, N., NADAL, D., NICCA, D., PANTALEO, G., RAUCH, A., REGENASS, S., RUDIN, C., SCHERRER, A., SCHMID, P., SPECK, R., STÖCKLE, M., TARR, P., TRKOLA, A., VERNAZZA, P., WEBER, R., YERLY, S., ARANCIBIA-CÁRCAMO, C., BAILEY, A., BARNES, E., BIRD-LIEBERMAN, B., BRAIN, O., BRADEN, B., COLLIER, J., EAST, J., GEREMIA, A., HOWARTH, L., KESHAV, S., KLENERMAN, P., LEEDHAM, S., PALMER, R., POWRIE, F., RODRIGUES, A., SIMMONS, A., SULLIVAN, P., TRAVIS, S. & UHLIG, H. 2018. CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, 9.
- KYRIAZIS, A. A. & ESTERLY, J. R. 1970. Development of lymphoid tissues in the human embryo and early fetus. *Arch Pathol*, 90, 348-53.
- LE PAGE, C., GÉNIN, P., BAINES, M. G. & HISCOTT, J. 2000. Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet*, 2, 374-86.
- LEFRANCAIS, E., DUVAL, A., MIREY, E., ROGA, S., ESPINOSA, E., CAYROL, C. & GIRARD, J. P. 2014. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 15502-7.
- LI, J., DOTY, A. L., IQBAL, A. & GLOVER, S. C. 2016. The differential frequency of Lineage(-)CRTH2(-)CD45(+)NKp44(-)CD117(-)CD127(+)ILC subset in the inflamed terminal ileum of patients with Crohn's disease. *Cell Immunol*, 304-305, 63-8.
- LIM, A. I. & DI SANTO, J. P. 2019. ILC-poiesis: Ensuring tissue ILC differentiation at the right place and time. *Eur J Immunol*, 49, 11-18.
- LIM, A. I., LI, Y., LOPEZ-LASTRA, S., STADHOUDERS, R., PAUL, F., CASROUGE, A., SERAFINI, N., PUEL, A., BUSTAMANTE, J., SURACE, L., MASSE-

- RANSON, G., DAVID, E., STRICK-MARCHAND, H., LE BOURHIS, L., COCCHI, R., TOPAZIO, D., GRAZIANO, P., MUSCARELLA, L. A., ROGGE, L., NOREL, X., SALLENAVE, J. M., ALLEZ, M., GRAF, T., HENDRIKS, R. W., CASANOVA, J. L., AMIT, I., YSSEL, H. & DI SANTO, J. P. 2017. Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell*, 168, 1086-1100 e10.
- LJUNGGREN, H. G. & KARRE, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11, 237-44.
- MAGRI, G., MIYAJIMA, M., BASCONES, S., MORTHA, A., PUGA, I., CASSIS, L., BARRA, C. M., COMERMA, L., CHUDNOVSKIY, A., GENTILE, M., LLIGE, D., COLS, M., SERRANO, S., AROSTEGUI, J. I., JUAN, M., YAGUE, J., MERAD, M., FAGARASAN, S. & CERUTTI, A. 2014. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol*, 15, 354-364.
- MAO, B., HUANG, S., LU, X., SUN, W., ZHOU, Y., PAN, X., YU, J., LAI, M., CHEN, B., ZHOU, Q., MAO, S., BIAN, G., ZHOU, J., NAKAHATA, T. & MA, F. 2016. Early Development of Definitive Erythroblasts from Human Pluripotent Stem Cells Defined by Expression of Glycophorin A/CD235a, CD34, and CD36. *Stem Cell Reports*, 7, 869-883.
- MARQUARDT, N., BEZIAT, V., NYSTROM, S., HENGST, J., IVARSSON, M. A., KEKALAINEN, E., JOHANSSON, H., MJOSBERG, J., WESTGREN, M., LANKISCH, T. O., WEDEMEYER, H., ELLIS, E. C., LJUNGGREN, H. G., MICHAELSSON, J. & BJORKSTROM, N. K. 2015. Cutting edge: identification and characterization of human intrahepatic CD49a⁺ NK cells. *J Immunol*, 194, 2467-71.
- MARQUARDT, N., IVARSSON, M. A., SUNDSTROM, E., AKESSON, E., MARTINI, E., EIDSMO, L., MJOSBERG, J., FRIBERG, D., KUBLICKAS, M., EK, S., TEGERSTEDT, G., SEIGER, A., WESTGREN, M. & MICHAELSSON, J. 2016. Fetal CD103⁺ IL-17-Producing Group 3 Innate Lymphoid Cells Represent the Dominant Lymphocyte Subset in Human Amniotic Fluid. *J Immunol*, 197, 3069-3075.

- MATSUMOTO, A., KANAI, T., MIKAMI, Y., CHU, P. S., NAKAMOTO, N., EBINUMA, H., SAITO, H., SATO, T., YAGITA, H. & HIBI, T. 2013. IL-22-producing RORgammat-dependent innate lymphoid cells play a novel protective role in murine acute hepatitis. *PLoS One*, 8, e62853.
- MCCOMB, S., THIRIOT, A., AKACHE, B., KRISHNAN, L. & STARK, F. 2019. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*, 2024, 1-24.
- MCHEDLIDZE, T., WALDNER, M., ZOPF, S., WALKER, J., RANKIN, A. L., SCHUCHMANN, M., VOEHRINGER, D., MCKENZIE, A. N., NEURATH, M. F., PFLANZ, S. & WIRTZ, S. 2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*, 39, 357-71.
- MCKENZIE, A. N. J., SPITS, H. & EBERL, G. 2014. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity*, 41, 366-374.
- MEBIUS, R. E. 2003. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*, 3, 292-303.
- MEBIUS, R. E., RENNERT, P. & WEISSMAN, I. L. 1997. Developing lymph nodes collect CD4⁺CD3⁻LTbeta⁺ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*, 7, 493-504.
- MEBIUS, R. E., STREETER, P. R., MICHIE, S., BUTCHER, E. C. & WEISSMAN, I. L. 1996. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4⁺CD3⁻ cells to colonize lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11019-24.
- MEDINA, K. L. 2016. Overview of the immune system. *Handb Clin Neurol*, 133, 61-76.
- MENDES, J., AREIA, A. L., RODRIGUES-SANTOS, P., SANTOS-ROSA, M. & MOTA-PINTO, A. 2020. Innate Lymphoid Cells in Human Pregnancy. *Front Immunol*, 11, 551707.
- MJOSBERG, J. & SPITS, H. 2016. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1265-1276.
- MJOSBERG, J. M., TRIFARI, S., CRELLIN, N. K., PETERS, C. P., VAN DRUNEN, C. M., PIET, B., FOKKENS, W. J., CUPEDO, T. & SPITS, H. 2011. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR2 and CD161. *Nat Immunol*, 12, 1055-62.

- MONTALDO, E., DEL ZOTTO, G., DELLA CHIESA, M., MINGARI, M. C., MORETTA, A., DE MARIA, A. & MORETTA, L. 2013. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, 83, 702-13.
- MONTALDO, E., JUELKE, K. & ROMAGNANI, C. 2015a. Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur J Immunol*, 45, 2171-82.
- MONTALDO, E., VACCA, P., CHIOSSONE, L., CROXATTO, D., LOIACONO, F., MARTINI, S., FERRERO, S., WALZER, T., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. 2015b. Unique Eomes(+) NK Cell Subsets Are Present in Uterus and Decidua During Early Pregnancy. *Front Immunol*, 6, 646.
- MONTALDO, E., VACCA, P., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. 2014. Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. *Semin Immunol*, 26, 107-13.
- MONTALDO, E., VACCA, P., VITALE, C., MORETTA, F., LOCATELLI, F., MINGARI, M. C. & MORETTA, L. 2016. Human innate lymphoid cells. *Immunol Lett*, 179, 2-8.
- MONTICELLI, L. A., SONNENBERG, G. F., ABT, M. C., ALENGHAT, T., ZIEGLER, C. G., DOERING, T. A., ANGELOSANTO, J. M., LAIDLAW, B. J., YANG, C. Y., SATHALIYAWALA, T., KUBOTA, M., TURNER, D., DIAMOND, J. M., GOLDRATH, A. W., FARBER, D. L., COLLMAN, R. G., WHERRY, E. J. & ARTIS, D. 2011. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*, 12, 1045-54.
- MORITA, H., MORO, K. & KOYASU, S. 2016. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1253-1264.
- MORO, K., YAMADA, T., TANABE, M., TAKEUCHI, T., IKAWA, T., KAWAMOTO, H., FURUSAWA, J., OHTANI, M., FUJII, H. & KOYASU, S. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*, 463, 540-4.

- NAGASAWA, M., GERMAR, K., BLOM, B. & SPITS, H. 2017. Human CD5(+) Innate Lymphoid Cells Are Functionally Immature and Their Development from CD34(+) Progenitor Cells Is Regulated by Id2. *Front Immunol*, 8, 1047.
- NEHRING, S. M., GOYAL, A., BANSAL, P. & PATEL, B. C. 2021. C Reactive Protein. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- NEILL, D. R., WONG, S. H., BELLOSI, A., FLYNN, R. J., DALY, M., LANGFORD, T. K., BUCKS, C., KANE, C. M., FALLON, P. G., PANNELL, R., JOLIN, H. E. & MCKENZIE, A. N. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464, 1367-70.
- OLIN, A., HENCKEL, E., CHEN, Y., LAKSHMIKANTH, T., POU, C., MIKES, J., GUSTAFSSON, A., BERNHARDSSON, A. K., ZHANG, C., BOHLIN, K. & BRODIN, P. 2018. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell*, 174, 1277-1292.e14.
- ORIMO, K., TAMARI, M., SAITO, H., MATSUMOTO, K., NAKAE, S. & MORITA, H. 2021. Characteristics of tissue-resident ILCs and their potential as therapeutic targets in mucosal and skin inflammatory diseases. *Allergy*.
- QUATRINI, L., CHIESA, M. D., SIVORI, S., MINGARI, M. C., PENDE, D. & MORETTA, L. 2021. Human NK cells, their receptors and function. *Eur J Immunol*.
- RAK, G. D., OSBORNE, L. C., SIRACUSA, M. C., KIM, B. S., WANG, K., BAYAT, A., ARTIS, D. & VOLK, S. W. 2016. IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *J Invest Dermatol*, 136, 487-496.
- ROAN, F., STOKLASEK, T. A., WHALEN, E., MOLITOR, J. A., BLUESTONE, J. A., BUCKNER, J. H. & ZIEGLER, S. F. 2016. CD4+ Group 1 Innate Lymphoid Cells (ILC) Form a Functionally Distinct ILC Subset That Is Increased in Systemic Sclerosis. *J Immunol*, 196, 2051-2062.
- SALIMI, M., BARLOW, J. L., SAUNDERS, S. P., XUE, L., GUTOWSKA-OWSIK, D., WANG, X., HUANG, L. C., JOHNSON, D., SCANLON, S. T., MCKENZIE, A. N., FALLON, P. G. & OGG, G. S. 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med*, 210, 2939-50.

- SATOH-TAKAYAMA, N., VOSSHENRICH, C. A., LESJEAN-POTTIER, S., SAWA, S., LOCHNER, M., RATTIS, F., MENTION, J. J., THIAM, K., CERF-BENSUSSAN, N., MANDELBOIM, O., EBERL, G. & DI SANTO, J. P. 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46⁺ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*, 29, 958-70.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-89.
- SERAFINI, N., VOSSHENRICH, C. A. & DI SANTO, J. P. 2015. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat Rev Immunol*, 15, 415-28.
- SILVER, J. S., KEARLEY, J., COPENHAVER, A. M., SANDEN, C., MORI, M., YU, L., PRITCHARD, G. H., BERLIN, A. A., HUNTER, C. A., BOWLER, R., ERJEFALT, J. S., KOLBECK, R. & HUMBLE, A. A. 2016. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol*, 17, 626-35.
- SMITH-GARVIN, J. E., KORETZKY, G. A. & JORDAN, M. S. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27, 591-619.
- SONNENBERG, G. F. & ARTIS, D. 2012. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity*, 37, 601-10.
- SONNENBERG, G. F., FOUSER, L. A. & ARTIS, D. 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*, 12, 383-90.
- SPITS, H., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J. P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. J., MEBIUS, R. E., POWRIE, F. & VIVIER, E. 2013. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 13, 145-149.
- SPITS, H. & CUPEDO, T. 2012. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*, 30, 647-75.
- SPITS, H. & DI SANTO, J. P. 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol*, 12, 21-7.

- SWIEBODA, D., GUO, Y., SAGAWA, S., THWAITES, R. S., NADEL, S., OPENSHAW, P. J. M. & CULLEY, F. J. 2019. OMIP-062: A 14-Color, 16-Antibody Panel for Immunophenotyping Human Innate Lymphoid, Myeloid and T Cells in Small Volumes of Whole Blood and Pediatric Airway Samples. *Cytometry A*, 95, 1231-1235.
- TEUNISSEN, M. B. M., MUNNEKE, J. M., BERNINK, J. H., SPULS, P. I., RES, P. C. M., TE VELDE, A., CHEUK, S., BROUWER, M. W. D., MENTING, S. P., EIDSMO, L., SPITS, H., HAZENBERG, M. D. & MJOSBERG, J. 2014. Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *J Invest Dermatol*, 134, 2351-2360.
- TIRADO-GONZALEZ, I., BARRIENTOS, G., FREITAG, N., OTTO, T., THIJSEN, V. L., MOSCHANSKY, P., VON KWIATKOWSKI, P., KLAPP, B. F., WINTERHAGER, E., BAUERSACHS, S. & BLOIS, S. M. 2012. Uterine NK cells are critical in shaping DC immunogenic functions compatible with pregnancy progression. *PLoS One*, 7, e46755.
- TREANOR, B. 2012. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*, 136, 21-7.
- TRINCHIERI, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, 47, 187-376.
- UYEN PHAM, T. X., BENNSTEIN, S. B., KLUMB, J., NIEHUES, T. & UHRBERG, M. 2022. Circulating Innate Lymphoid Cells (ILCs) in Healthy Children: Reference Values for Evaluation of Treatment in Immunocompromised Pediatric Patients. *J Clin Immunol*.
- VACCA, P., MONTALDO, E., CROXATTO, D., LOIACONO, F., CANEGALLO, F., VENTURINI, P. L., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. 2015. Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua. *Mucosal Immunol*, 8, 254-64.
- VACCA, P., VITALE, C., MUNARI, E., CASSATELLA, M. A., MINGARI, M. C. & MORETTA, L. 2018. Human Innate Lymphoid Cells: Their Functional and Cellular Interactions in Decidua. *Front Immunol*, 9, 1897.

- VALLENTIN, B., BARLOGIS, V., PIPEROGLOU, C., CYPOWYJ, S., ZUCCHINI, N., CHENE, M., NAVARRO, F., FARNARIER, C., VIVIER, E. & VELY, F. 2015. Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Cancer Immunol Res*, 3, 1109-14.
- VELY, F., BARLOGIS, V., VALLENTIN, B., NEVEN, B., PIPEROGLOU, C., EBBO, M., PERCHET, T., PETIT, M., YESSAAD, N., TOUZOT, F., BRUNEAU, J., MAHLAOU, N., ZUCCHINI, N., FARNARIER, C., MICHEL, G., MOSHOUS, D., BLANCHE, S., DUJARDIN, A., SPITS, H., DISTLER, J. H., RAMMING, A., PICARD, C., GOLUB, R., FISCHER, A. & VIVIER, E. 2016. Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat Immunol*, 17, 1291-1299.
- VILLANOVA, F., FLUTTER, B., TOSI, I., GRYS, K., SREENEEBUS, H., PERERA, G. K., CHAPMAN, A., SMITH, C. H., DI MEGLIO, P. & NESTLE, F. O. 2014. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44⁺ ILC3 in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 134, 984-991.
- VIVIER, E., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J. P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. J., MEBIUS, R. E., POWRIE, F. & SPITS, H. 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174, 1054-1066.
- VIVIER, E., VAN DE PAVERT, S. A., COOPER, M. D. & BELZ, G. T. 2016. The evolution of innate lymphoid cells. *Nat Immunol*, 17, 790-4.
- VOISINNE, G., GONZALEZ DE PEREDO, A. & RONCAGALLI, R. 2018. CD5, an Undercover Regulator of TCR Signaling. *Frontiers in Immunology*, 9.
- WALKER, J. A., BARLOW, J. L. & MCKENZIE, A. N. 2013. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*, 13, 75-87.
- XU, Y., ROMERO, R., MILLER, D., SILVA, P., PANAITESCU, B., THEIS, K. R., ARIF, A., HASSAN, S. S. & GOMEZ-LOPEZ, N. 2018. Innate lymphoid cells at the human maternal-fetal interface in spontaneous preterm labor. *Am J Reprod Immunol*, 79, e12820.
- YAZDANI, R., SHARIFI, M., SHIRVAN, A. S., AZIZI, G. & GANJALIKHANI-HAKEMI, M. 2015. Characteristics of innate lymphoid cells (ILCs) and their role in immunological disorders (an update). *Cell Immunol*, 298, 66-76.

- YOSHIDA, H., HONDA, K., SHINKURA, R., ADACHI, S., NISHIKAWA, S., MAKI, K., IKUTA, K. & NISHIKAWA, S. I. 1999. IL-7 receptor α^+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int Immunol*, 11, 643-55.
- YU, S., KIM, H. Y., CHANG, Y. J., DEKRUYFF, R. H. & UMETSU, D. T. 2014. Innate lymphoid cells and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 943-50; quiz 51.
- ZHAO, Y., ZHU, Y., CHEN, X., LIN, H., QIN, N., ZHOU, Z., LIU, H., HAO, Y., ZHOU, C., LIU, X., JIN, L., SHENG, J. & HUANG, H. 2022. Circulating Innate Lymphoid Cells Exhibit Distinctive Distribution During Normal Pregnancy. *Reprod Sci*, 29, 1124-1135.

6 Anhang

6.1 Einverständniserklärungen und Patienteninformation



Helios Klinikum Krefeld
Zentrum für Kinder- &
Jugendmedizin
Lutherplatz 40
47805 Krefeld

Ansprechpartner:
Prof. Dr. med. Tim Niehues
Telefonnr.: + 49 2151 32-2301



Institut für Transplantationsdiagnostik &
Zelltherapeutika (ITZ)
Gebäude 14.80
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

Ansprechpartner:
Prof. Dr. rer. nat. Markus Uhrberg
Telefonnr.: + 49 211 81-19529

Innate lymphoid cells (ILCs) in peripherem Blut – Ermittlung der Normwerte bei Kindern und Jugendlichen

Sehr geehrte Frau, sehr geehrter Herr,

in den vergangenen Jahren ist das Verständnis für die Bedeutung von angeborenen immunologischen Zelllinien, den innate lymphoid cells/ILCs, in Verbindung mit angeborenen Immundefekten und Autoimmunerkrankungen, wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (z. B. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) in Bezug auf das Erwachsenenalter enorm gewachsen.

Dieses Wissen möchten wir nun auch für die Kinderheilkunde ausweiten.

Deshalb möchten wir Sie gerne fragen, ob Sie bereit sind, eine Blutprobe Ihres Kindes zur Verfügung zu stellen. Diese Proben werden auf die benannten Zelllinien analysiert und die daraus folgenden Ergebnisse könnten in Zukunft für die Therapie von angeborenen Immundefekten und Autoimmunerkrankungen eine große Hilfe sein.

Im Folgenden möchten wir Ihnen nähere Informationen dazu geben, damit Sie Ihre Entscheidung über die Teilnahme Ihres Kindes an der Studie treffen können. Bitte lesen Sie diese Informationsschrift sorgfältig und besprechen Sie evtl. verbleibende Fragen mit Ihrem zuständigen Arzt bzw. Ärztin, der/die Ihnen selbstverständlich für weitere Informationen zur Verfügung steht.

Die Untersuchungen werden nur dann durchgeführt, wenn Sie dazu freiwillig und schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie die Untersuchungen nicht erlauben oder Ihre Einwilligung später widerrufen möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

1. Wofür sollen die Proben Ihres Kindes verwendet werden?

Wir möchten die Probe Ihres Kindes für Zwecke wissenschaftlich-medizinischer Forschung verwenden. Mit Ihrer Einwilligung räumen Sie der Forschung die Befugnis ein, dass die Daten Ihres Kindes verarbeitet werden dürfen. Deshalb bitten wir Sie, diese Einwilligung ausdrücklich durch Ankreuzen in der Einwilligungserklärung zum Ausdruck zu bringen.

2. Wie werden die Proben gewonnen und verwendet?

Für die Analyse benötigen wir ca. 3-10ml Blut, somit ist eine Blutentnahme erforderlich.

Die entnommene Blutprobe wird sofort mit einer Identifizierungsnummer versehen (verschlüsselt), sodass der Name Ihres Kindes und weitere personenbezogene Daten nicht mehr erkennbar sind.

Die Probe wird Eigentum von dem Helios Klinikum Krefeld, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin sein, Lutherplatz 40, 47805 Krefeld, sein. Sie wird dort aufbewahrt, aber unter Umständen auch an andere Stellen (z.B. wie Labore der Uniklinik Düsseldorf) verschickt und untersucht. Gleichwohl haben Sie jederzeit das Recht, die Vernichtung der Probe Ihres Kindes zu verlangen.

3. Was sind die Risiken dieser Forschungsmaßnahme?

Es bestehen nur die Risiken, die mit einem Legen einer peripheren Venenverweilkanüle verbunden sind. An der Einstichstelle kann es zu leichten Schmerzen kommen oder es kann ein Bluterguss (blauer Fleck) entstehen, der evtl. einige Tage sichtbar ist. In äußerst seltenen Fällen kann auch die Bildung eines Blutgerinnsels (Thrombose), eine örtlich begrenzte Entzündung oder eine Infektion an der Einstichstelle auftreten oder es kann zu dauerhaften Schädigungen von Blutgefäßen oder Nerven kommen.

Die Blutentnahme an der peripheren Venenverweilkanüle stellt keine Risiken dar. Es werden Blutabnahmesysteme verwendet, mit der genau die abgenommene Blutmenge kontrolliert werden kann. Somit wird gewährleistet, dass Ihrem Kind nur Blutvolumina abgenommen werden, die keine Gefährdung für die Gesundheit darstellen (z. B. große Blutverluste).

4. Was sind die Vorteile der Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben?

Persönlich kann Ihr Kind durch die Bereitstellung seiner Probe für die Gesundheit keinen unmittelbaren Vorteil oder Nutzen erwarten. Die Ergebnisse sind ausschließlich zu Forschungszwecken bestimmt und werden keine Konsequenzen für Ihr Kind haben. Ihre Einwilligung könnte einen Beitrag zum besseren Verständnis der Entwicklung von angeborenen Immundefekten und Autoimmunerkrankungen haben.

5. Ist die Vertraulichkeit der Daten meines Kindes gewährleistet?

Wie bereits beschrieben, werden die Blutprobe Ihres Kindes und die benötigten Daten jeweils separat mit einer unterschiedlichen Code-Nummer gekennzeichnet. Namentlich wird Ihr Kind nicht genannt. Die im Rahmen dieses Projekts aufgezeichneten Daten und Analyseergebnisse werden ohne den Namen Ihres Kindes ermittelt, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert.

Einzelheiten zur Einwilligung in die Datenerhebung und –verwendung, auch zur Möglichkeit eines Widerrufs, entnehmen Sie bitte der Einwilligungserklärung, die im Anschluss an diese Information abgedruckt ist.

6. Erhalte ich bzw. mein Kind Informationen über die Ergebnisse des Forschungsprojekts?

Die Ergebnisse der Blutanalyse dienen nur zu Forschungszwecken. Deshalb werden Ergebnisse der Forschung insgesamt und individuelle Befunde weder Ihnen, Ihrem Kind noch Ihrem Arzt bzw. Ihrer Ärztin zugänglich gemacht.

Werden aus den entnommenen Körpermaterialien Ihres Kindes wider Erwarten medizinische Erkenntnisse gewonnen, die für die Erhaltung oder Wiederherstellung der eigenen Gesundheit Ihres Kindes von erheblicher Bedeutung sind, so wird Ihr Arzt bzw. Ärztin darüber informiert, damit er bzw. sie mit Ihnen und evtl. Ihrem Kind das weitere Vorgehen besprechen kann.

Wenn Sie eine Information des Studienarztes bzw. der Studienärztin nicht wünschen, können Sie dies in der Einwilligungserklärung zum Ausdruck bringen.

7. Kann mein Kind die Teilnahme an dem Forschungsprojekt vorzeitig beenden?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme Ihres Kindes an der Studie beenden, ohne dass Ihrem Kind dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

Im Falle des Widerrufs werden die gewonnenen Blutproben und erhobenen Daten zur Person Ihres Kindes unverzüglich vernichtet.

Die Bedeutung eines Widerrufs für die Verwendung der Daten ist in der Einwilligungserklärung erläutert, die im Anschluss an diese Information abgedruckt ist.

8. Kann ich für mein Kind bestimmte Verwendungszwecke ausschließen?

Sie haben das Recht, bestimmte Verwendungszwecke des Blutes Ihres Kindes auszuschließen.

9. Wissenschaftliche und kommerzielle Nutzung der Forschungsergebnisse

Gegebenenfalls werden die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts in wissenschaftlichen Zeitschriften und auf Konferenzen veröffentlicht. Diese Veröffentlichungen werden keinerlei persönliche Daten enthalten, die Rückschlüsse auf die Person Ihres Kindes ermöglichen. Zudem ist es möglich, dass die Forschungsergebnisse kommerziell genutzt, z. B. patentiert werden. An einem möglichen kommerziellen Nutzen werden Sie und Ihr Kind nicht beteiligt.

10. Weitere Informationen

Sollten Sie noch weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Arzt bzw. Ärztin. Stellen Sie alle Fragen, die Ihnen wichtig erscheinen und lassen Sie sich ausreichend Zeit für Ihre Entscheidung zur Teilnahme Ihres Kindes an dieser zusätzlichen wissenschaftlichen Untersuchung.

Wir danken Ihnen für Ihr Interesse und Ihre Aufmerksamkeit!

Einwilligungserklärung

Forschungsteilnehmer/in: _____ Teilnehmer-Nr.: _____

Name, Vorname: _____

Geb.-Datum: _____

Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur Teilnahme meines Kindes an der Untersuchung gemäß der vorstehenden Information. Durch meine Unterschrift bestätige ich, dass ich den Inhalt der Information gelesen und verstanden habe. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen, die mir zufriedenstellend beantwortet wurden. Ich weiß, dass die Teilnahme meines Kindes freiwillig ist und ich die Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen und die Vernichtung der Blutprobe meines Kindes fordern kann, ohne dass meinem Kind daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Mir ist bewusst, dass mein Kind keinen persönlichen Vorteil aus diesem Forschungsprojekt haben wird und dass mir die Ergebnisse meines Kindes nicht mitgeteilt werden.

Nur dann, wenn aus den entnommenen Körpermaterialien meines Kindes wider Erwarten medizinische Erkenntnisse gewonnen werden, die für die Erhaltung oder Wiederherstellung seiner eigenen Gesundheit von erheblicher Bedeutung sind, wird mein Arzt darüber informiert, damit er mit mir und evtl. meinem Kind das weitere Vorgehen besprechen kann.

Falls gewünscht, bitte ankreuzen:

() Ich möchte **nicht**, dass der Arzt/die Ärztin meines Kindes über Befunde im vorstehend genannten Sinn informiert wird.

Ich möchte die Verwendung der Blutprobe meines Kindes wie folgt eingrenzen:

.....
.....
.....
.....
.....

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei diesem Forschungsvorhaben personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde und persönliche Informationen über mein Kind erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen.

Die für die Studie wichtigen Daten werden in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Pseudonymisierung bedeutet, dass der Name meines Kindes oder andere Identifikationsmerkmale durch einen Code ersetzt werden, um die Feststellung der Identität meines Kindes auszuschließen oder wesentlich zu erschweren. Dieser „Schlüssel“ (Verbindung zwischen dem Namen meines Kindes bzw. den Identifikationsmerkmalen meines Kindes und dem Code) wird getrennt von den übrigen Befunden oder Informationen meines Kindes aufbewahrt. Zugang zu dem Schlüssel hat ausschließlich Prof. Dr. Uhrberg/ITZ Düsseldorf.

Der Verantwortliche für die studienbedingte Erhebung personenbezogener Daten ist der Studienleiter Prof. Dr. rer. nat. Markus Uhrberg (ITZ, Gebäude 14.80, Moorenstr. 5, 40225) Düsseldorf, E-Mail: Markus.Uhrberg@med.uni-duesseldorf.de). Ich habe das Recht, vom Verantwortlichen Auskunft über die von meinem Kind gespeicherten personenbezogenen Daten zu verlangen. Ebenfalls kann ich die Berichtigung unzutreffender Daten sowie die Löschung der Daten meines Kindes oder Einschränkung deren Verarbeitung verlangen.

Bei Anliegen, Fragen oder Beschwerden zur Datenverarbeitung und zur Einhaltung der datenschutzrechtlichen Anforderungen kann ich mich zunächst an den Studienleiter wenden (Kontakt Daten s. oben).

Für weiterführende Fragen oder bei Problemen bzgl. des Datenschutzes kann ich mich an folgende Stellen wenden:

a) Datenschutzbeauftragte des Universitätsklinikum Düsseldorf

Martina Mohr

E-Mail: Martina.Mohr@med.uni-duesseldorf.de

Telefon: 0211-8108508

Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

Datenschutzbeauftragter

E-Mail: GKDDatenschutzbeauftragter@med.uni-duesseldorf.de

Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf

b) Datenschutzbeauftragter der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kurt Finkbeiner

E-Mail: Datenschutzbeauftragter@hhu.de

Telefon: 0211-8113214

Universitätsstraße 1, Gebäude 16.11, 40225 Düsseldorf

Im Falle einer rechtswidrigen Datenverarbeitung meines Kindes habe ich das Recht, mich bei folgender Aufsichtsbehörde zu beschweren:

Landesbeauftragte für Datenschutz und Informationsfreiheit Nordrhein-Westfalen

Postfach 20 04 44, 40102 Düsseldorf

E-Mail: poststelle@ldi.nrw.de

Die ärztliche Schweigepflicht und datenschutzrechtliche Bestimmungen werden eingehalten.

Die Studienleitung wird alle angemessenen Schritte unternehmen, um den Schutz der Daten meines Kindes gemäß den Datenschutzstandards der Europäischen Union zu gewährleisten.

Die Verwendung der Angaben über die Gesundheit meines Kindes erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt gemäß Absatz 6 Artikel 1 lit. a der Datenschutz-Grundverordnung vor der Teilnahme an dem Forschungsvorhaben folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann mein Kind nicht an dem Forschungsvorhaben teilnehmen.

1. Ich wurde darüber aufgeklärt und stimme freiwillig zu, dass im Rahmen dieses Forschungsvorhabens personenbezogene Daten meines Kindes, insbesondere Angaben über die Gesundheit, zu den in der Informationsschrift beschriebenen Zwecken in pseudonymisierter Form erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern im Helios Klinikum Krefeld, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Lutherplatz 40, 47805 Krefeld aufgezeichnet und gespeichert werden.
2. Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten meines Kindes werden in pseudonymisierter Form an das Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, weitergegeben. Die Weitergabe dient dem Zweck der Auswertung der Blutprobe meines Kindes. Dritte erhalten keinen Einblick in unverschlüsselte personenbezogene Unterlagen. Bei der Veröffentlichung von Ergebnissen der Studie wird der Name meines Kindes ebenfalls nicht genannt.
3. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte, an der Studie beteiligten Personen (Prof. Dr. Niehues/Helios Klinikum Krefeld, Prof. Dr. Uhrberg/ITZ Düsseldorf, Dr. Judith Springer/Helios Klinikum Krefeld und Thi Xuan Uyen Pham/Doktorandin) in die beim Studienarzt bzw. Studienärztin vorhandenen personenbezogenen Daten meines Kindes, insbesondere Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung des Forschungsvorhabens notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Studienarzt bzw. die Studienärztin von der ärztlichen Schweigepflicht.
4. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme meines Kindes an dem Forschungsvorhaben schriftlich oder mündlich ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen. Die Rechtmäßigkeit der bis zum Widerruf erfolgten Datenverarbeitung wird davon nicht berührt. Beim Widerruf der Einwilligung, an dem Forschungsvorhaben teilzunehmen, werden die personenbezogenen Daten meines Kindes unverzüglich gelöscht und die Blutproben meines Kindes vernichtet.
5. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Daten meines Kindes nach Beendigung oder Abbruch des Forschungsvorhabens mindestens 10 Jahre aufbewahrt werden. Danach werden die personenbezogenen Daten meines Kindes gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Eine Kopie dieser Information und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt in der Studienstelle.

Name des/der Forschungsteilnehmers/-teilnehmerin in Druckbuchstaben

Name des/der gesetzlichen/-n Vertreters/-in in Druckbuchstaben

Ort, Datum
(vom Teilnehmer/in einzutragen)

Unterschrift gesetzliche/r Vertreter/in