

Effektor-T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom zeigen quantitative, phänotypische und funktionelle Unterschiede im Vergleich zu immungesunden Kindern

Justine Schoch¹, Tina Schmidt¹, Anna-Maria Jung², Michael Kästner³, Hashim Abdul-Khaliq⁴, Ludwig Gortner², Martina Sester¹, Tilman Rohrer²

¹Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie, Universität des Saarlandes, ²Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, ³Sektion für Pädiatrische Kardiologie, Universitätsklinikum Ulm, ⁴ Klinik für Pädiatrische Kardiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes



Transplantations- und Infektionsimmunologie

Fragestellung

Down-Syndrom ist mit einer vermehrten Anfälligkeit für respiratorische Infekte assoziiert. Die Ursache hierfür wird in einem noch nicht näher klassifizierten Immundefekt gesehen.

Ziel dieser Studie war die Charakterisierung der adaptiven Immunantwort durch Betrachtung der spezifischen humoralen Immunantwort sowie der zellulären Immunität durch Analyse phänotypischer und funktioneller Eigenschaften der Effektor T-Zellen von Kindern mit Down-Syndrom (DS) im Vergleich zu immungesunden Kindern (K).

Probanden und Methoden

• Probanden

- 40 Kinder mit Down-Syndrom (Alter: $7,387 \pm 1,109$)
- 51 immungesunde Kinder (Alter: $8,798 \pm 0,9703$) (Tab. 1)

• Methoden

1. Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen (Abb. 1)

- Funktionelle und
- Phänotypische Analyse

6h Vollblutstimulation mit den Antigenen aus CMV, VZV und Mycobakterien (Tuberkulin PPD) sowie dem polyklonalen Stimulus SEB. Unter Zugabe eines Transportinhibitors (Brefeldin A) nach 2h akkumulieren die in den T Zellen induzierten Zytokine intrazellulär.

2. Oberflächenfärbung von Lymphozyten-subpopulationen (B-, NK- und T-Zellen)

- Quantitative Analyse

3. Quantifizierung der humoralen Immunantwort mittels ELISA (CMV und VZV IgG-Antikörper)

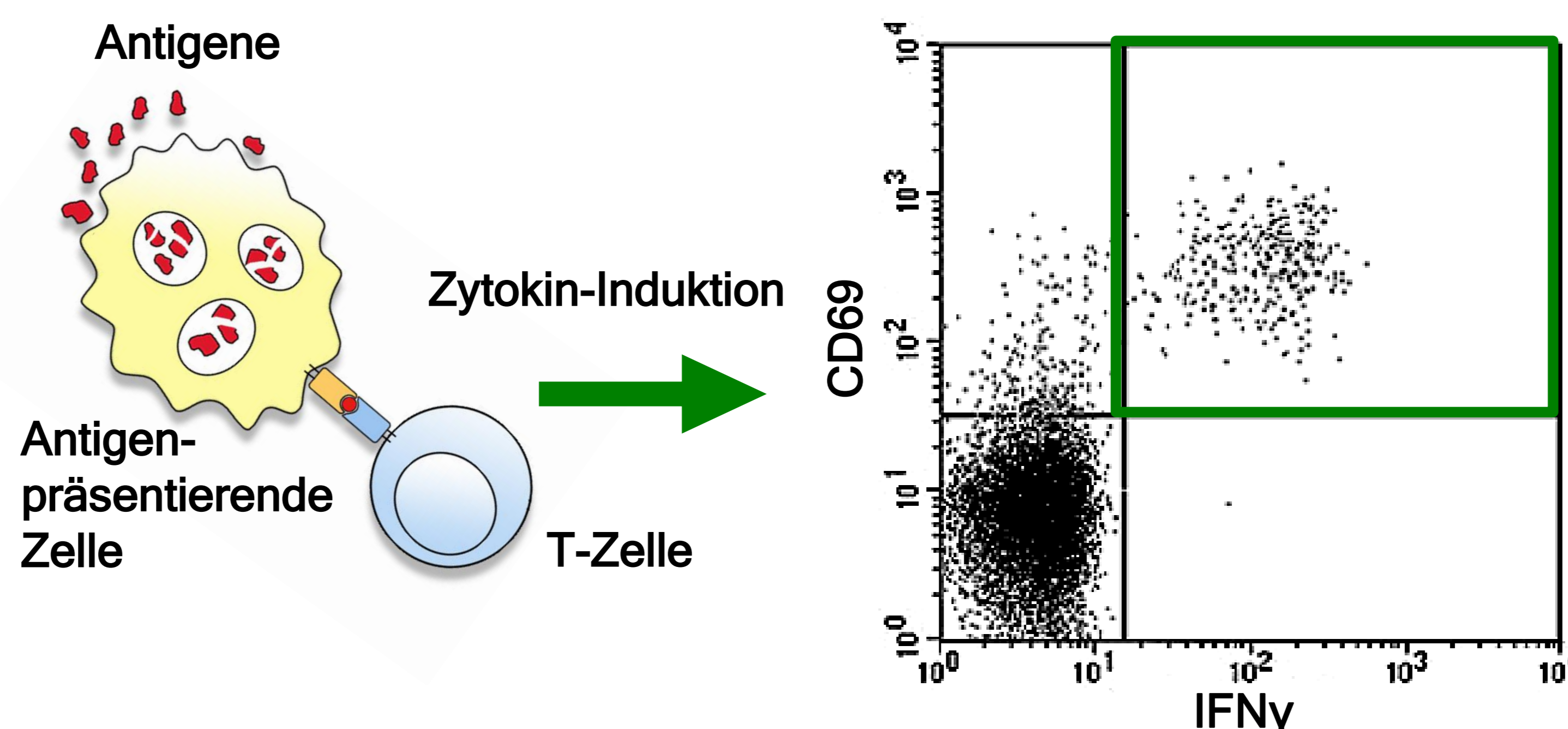


Abb. 1: Prinzip der Antigen-spezifischen Stimulation aus Vollblut. Stimuliert wurde mit Antigenen aus CMV, VZV und Mycobakterien (Tuberkulin PPD). Eine Negativkontrolle wurde jeweils mitgeführt. Als Positivkontrolle diente der polyklonale Stimulus SEB. Anschließend wurden die Antigen-spezifische T Zellen durch Koexpression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins Interferon-gamma (IFN γ) durchflusszytometrisch identifiziert und charakterisiert.

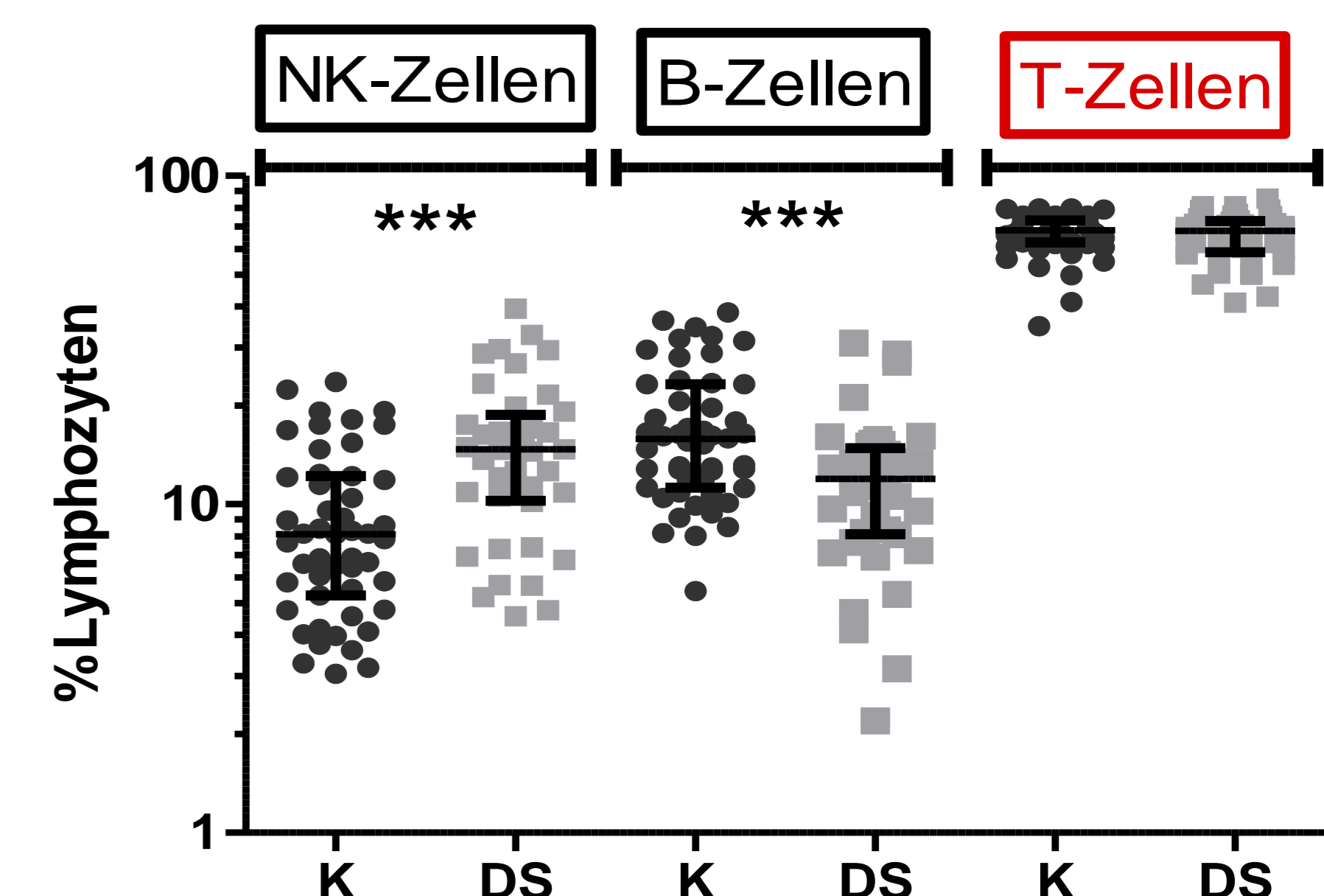


Abb. 2: Anteile der Lymphozyten-Subpopulationen bei immungesunden Kontrollen (n=51) im Vergleich zu Kindern mit DS (n=40): NK-Zellen (CD56+CD16+; $p=0,0002$), B-Zellen (CD19+; $p=0,0007$) und T-Zellen (CD3+; ns).

Tabelle 1: Charakteristika der Studienkollektive

Studienkollektiv	K	DS
Anzahl	51	40
Alter	$8,798 \pm 0,9703$	$7,387 \pm 1,109$
Geschlecht (m/w)	25/26	23/17
Respiratorische Infektion	8	8
Herzfehler	11	25
Herzoperation	5	17
Autoimmunphänomene *	4	11

* Autoimmunphänomene: Autoimmunthyroiditis (Hashimoto, M. Basedow), Psoriasis, Autoimmune Thrombozytopenie, Zöliakie

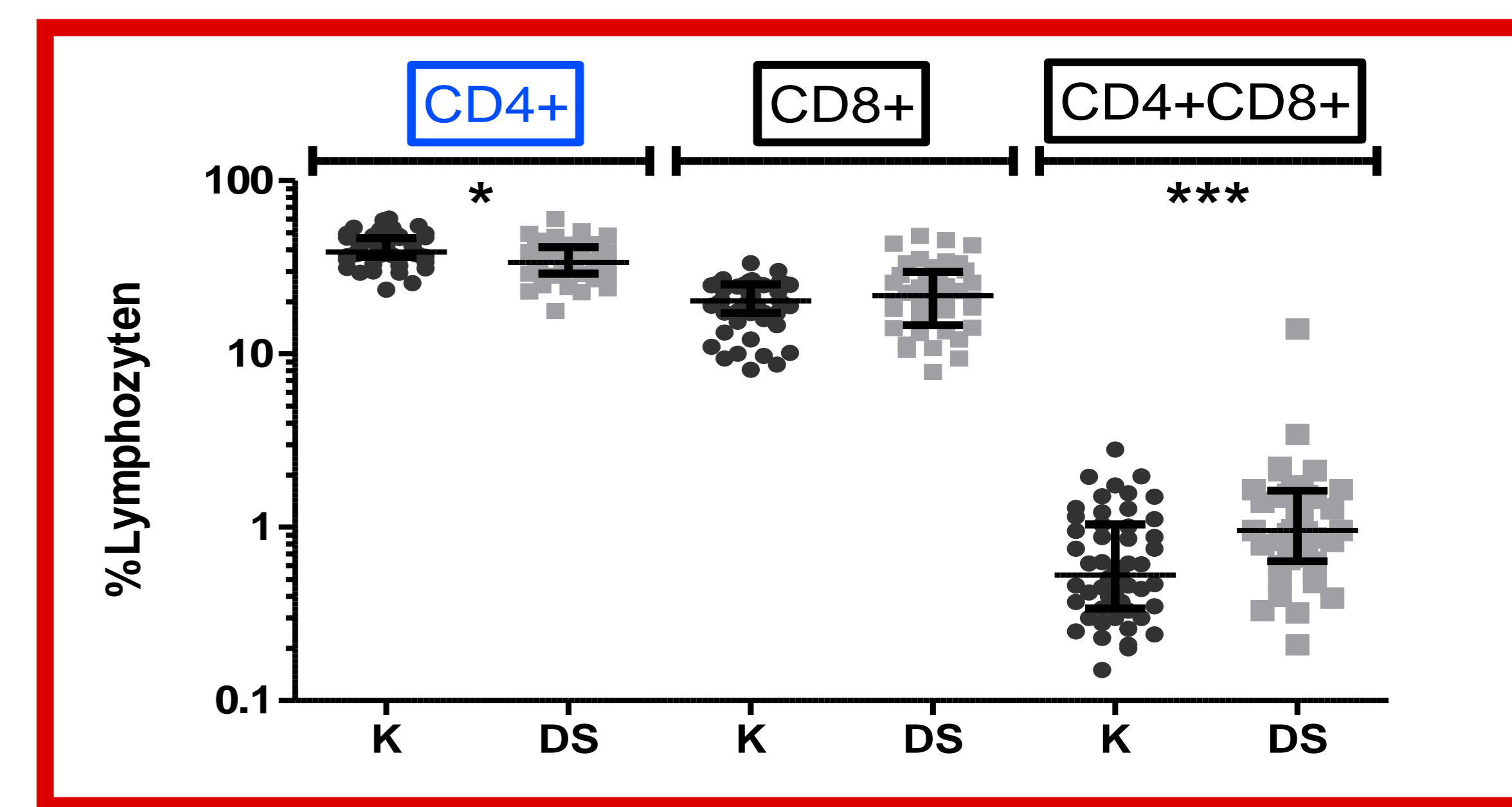


Abb. 3: Quantitative Analyse der T-Zell Subpopulationen bei immungesunden Kontrollen (n=51) im Vergleich zu DS Kindern (n=40). Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei den CD4+T-Zellen ($p=0,0122$) und den doppelpositiven CD4+CD8+T-Zellen ($p=0,0008$), jedoch nicht bei den CD8+T-Zellen.

Ergebnisse

- Kinder mit DS zeigten einen deutlich erhöhten Anteil an NK-Zellen, wohingegen die B-Zellen innerhalb der Lymphozyten erniedrigt waren (Abb. 2).

- Während der Gesamtanteil der T-Zellen keine Unterschiede zeigte (Abb. 2), waren bei Kindern mit DS weniger CD4+ und mehr CD4+CD8+T-Zellen vorhanden (Abb. 3).

- Innerhalb der CD4+T-Zellen waren ein erhöhter Anteil regulatorischer und Th17-Zellen sowie eine erhöhte Th1/Th2 Ratio bei DS Kinder messbar (Abb. 4 A,B).

- Kinder mit DS wiesen eine erhöhte Expression der Anergemarkers PD-1 und CTLA-4 auf den CD4+T-Zellen auf (Abb. 4C).

- Beide Gruppen zeigten eine altersgerechte Durchseuchung mit CMV, VZV und Mykobakterien, wobei auf Ebene der Erreger-spezifischen Immunantwort keine Unterschiede messbar waren (Tab. 2, Abb. 5).

- Nach polyklonaler Stimulation war der prozentuale Anteil der Zytokin-produzierenden Effektor-CD4 T-Zellen bei Kinder mit DS signifikant erhöht (Abb. 5).

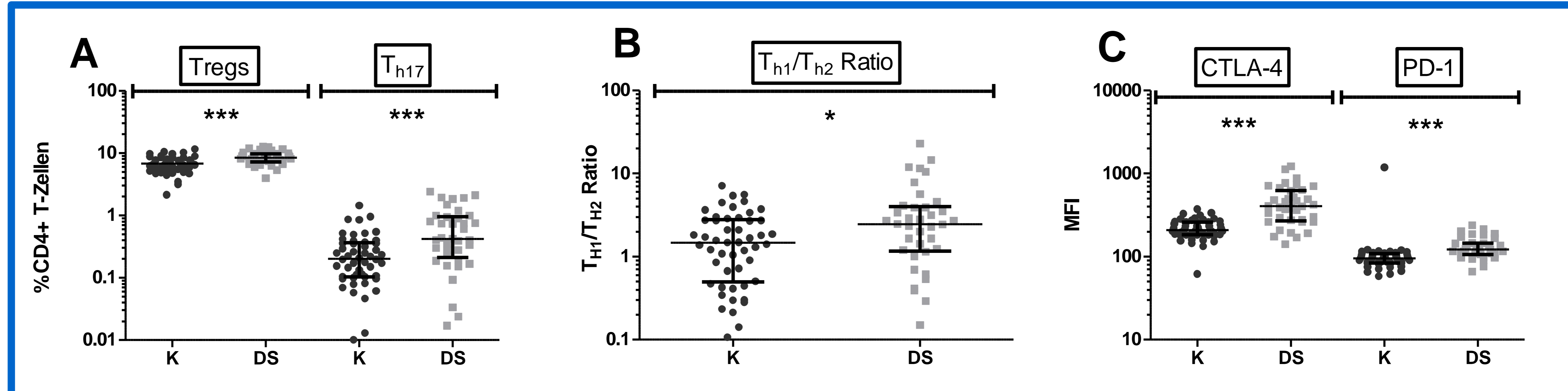


Abb. 4: Detaillierte Analyse der CD4+T-Zellen bei immungesunden Kontrollen (K) im Vergleich zu Kindern mit Down-Syndrom (DS). A Regulatorische T-Zellen (Tregs: CD25+CD127lowCD4+ T-Zellen; K: n=51 vs DS: n=40; $p<0,0001$) und Th₁₇-Zellen (IL-17+CD4+ T-Zellen nach Stimulation mit SEB; K: n=50 vs DS: n=37; $p=0,0004$) sind bei Kindern mit DS signifikant erhöht. B Berechnung der Th₁/Th₂ Ratio bei 50 immungesunden Kontrollen und 37 DS Kindern mittels der Zytokinexpression von IFN γ und IL-4 nach einer polyklonalen Stimulation mit SEB ($p=0,0253$). C Signifikante höhere Expression der Anergemarkers CTLA-4 ($p<0,0001$) und PD-1 ($p<0,0001$) bei Kindern mit DS, die durch die mediane Fluoreszenz Intensität (MFI) auf CD4+T-Zellen dargestellt ist.

Tabelle 2: Korrelation der zellulären und humoralen Immunantwort

	CMV Kontrollen	CMV IgG			VZV Kontrollen	VZV IgG		
		+	-			+	+/-	-
IFN γ +CD69+ T-Zellen	positiv >0,05%	7	0		positiv >0,02%	22	3	1
	negativ <0,05%	0	43		negativ <0,02%	16	0	8
IFN γ +CD69+ T-Zellen	positiv >0,05%	7	0		positiv >0,02%	20	4	1
	negativ <0,05%	1	29		negativ <0,02%	2	1	8

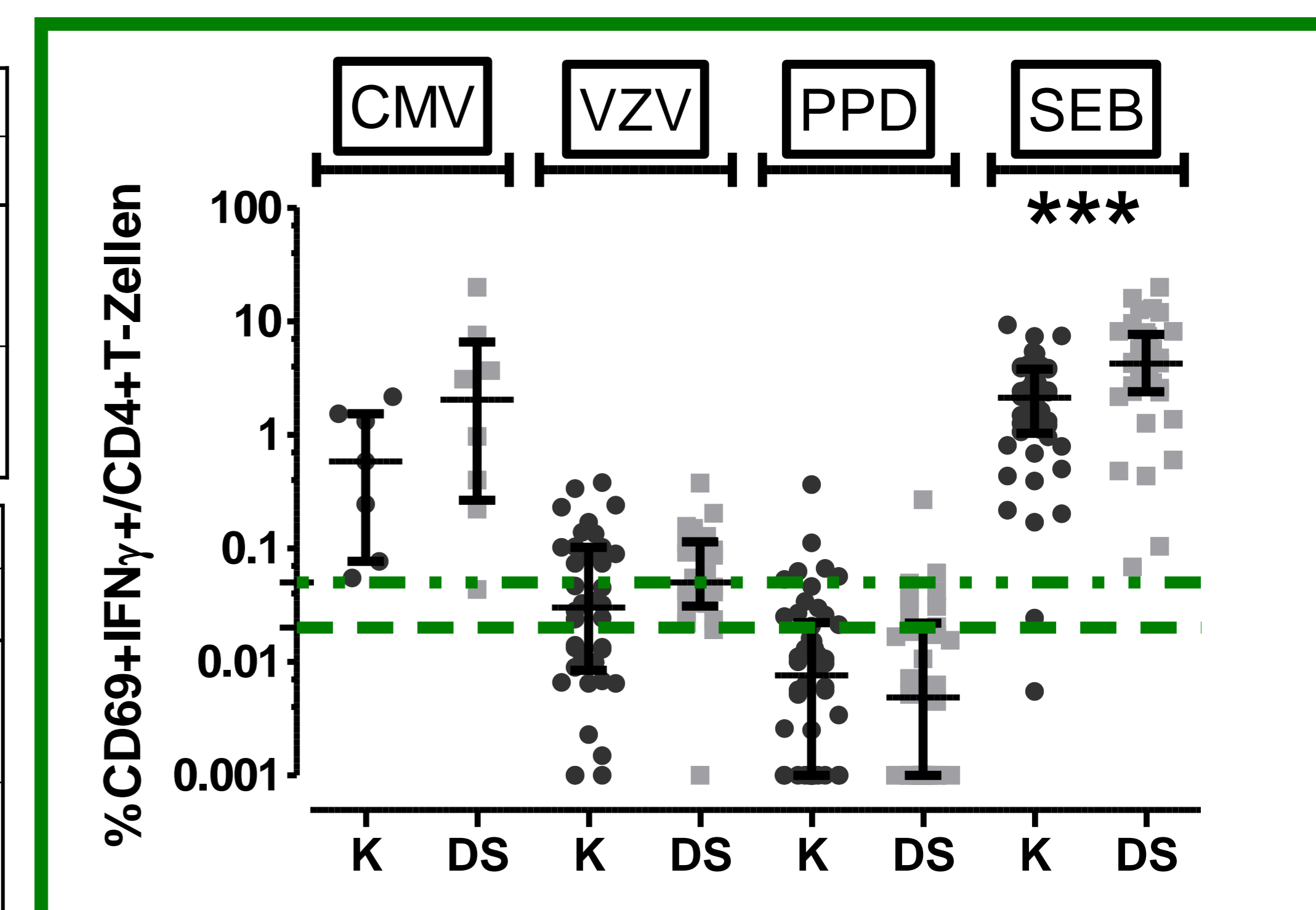


Abb. 5: Frequenz der CD69+IFN γ +CD4+T-Zellen bei immungesunden Kontrollen und DS Kindern nach Antigen-spezifischer bzw. polyklonaler Stimulation (SEB). Signifikante Unterschiede waren nur nach polyklonaler Stimulation nachweisbar ($p=0,0006$). Bei CMV (K: n=7; DS: n=8) und VZV (K: n=38; DS: n=22) sind nur die serologisch positiven Probanden dargestellt.

Schlussfolgerung

- Effektor-T-Zellen scheinen bei Kindern mit DS insgesamt eine eingeschränkte Funktionalität aufzuweisen.
- Eine gleichzeitig erhöhte Frequenz reaktiver Effektor-T-Zellen bei Kindern mit DS könnte einen kompensatorischen Effekt der funktionellen Anergie darstellen, und/oder Ausdruck einer stärker ausgeprägten Infekthistorie sein.

Kontakt: Dr. cand. med. Justine Schoch (Justine.Schoch@uks.eu)

Dieses Projekt wurde finanziell unterstützt von dem Homburger Forschungsförderungsprogramm (HOMFOR)