

**Untersuchung zu Veränderungen der  
Lymphozytensubpopulationen im Krankheitsverlauf  
der Mukoviszidose**

von

**Thomas Opladen**



# **Untersuchung zu Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen im Krankheitsverlauf der Mukoviszidose**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Thomas Opladen**

aus

Bergisch Gladbach

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Gerhard Heimann

Herr Privatdozent  
Dr. med. Klaus Schweizer

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Grundlagen der Mukoviszidose</b>	<b>4</b>
1.1.1. Definition	4
1.1.2. Ätiologie - Pathophysiologie - Pathogenese	4
1.1.2.1. Genetik	4
1.1.2.2. Pathophysiologie	5
1.1.2.3. Diagnose:	5
1.1.2.4. Prognose	5
1.1.3. Organmanifestationen	5
1.1.3.1. Pankreas	5
1.1.3.2. Magen-Darm-Trakt	6
1.1.3.3. Leber	6
1.1.3.4. Weitere Organmanifestationen	6
<b>1.2. Die pulmonale Manifestation der Mukoviszidose</b>	<b>8</b>
1.2.1. Pseudomonas-Infektion bei CF	10
<b>1.3. Immunologie</b>	<b>11</b>
1.3.1. Physiologische Immunabwehr der Lunge	11
1.3.2. Entzündungsmechanismen in der Lunge von Patienten mit CF	11
1.3.3. Die erworbene Immunität bei Patienten mit CF	13
<b>1.4. Zielsetzung der durchgeführten Untersuchung</b>	<b>16</b>
<b>2. Patientengut, Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Patienten</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Methoden</b>	<b>19</b>
2.2.1. Durchflußzytometer	19
2.2.1.1. Technische Grundlagen	19
2.2.1.2. Antikörper	21
2.2.1.3. Probenerstellung	22
2.2.1.4. Datenauswertung	22
2.2.2. Histopathologie	24
2.2.2.1. HE-Färbung	24
2.2.2.2. Elastica-van-Gieson Färbung	24
2.2.2.3. Immunfärbung	24
2.2.3. Mikrobiologie	25
2.2.4. Auswertung und Statistik	25

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Lymphozytenphänotypisierung</b>	<b>27</b>
3.1.1. Altersunabhängiger Vergleich	27
3.1.2. Altersabhängiger Vergleich	28
3.1.2.1. Leukozyten	30
3.1.2.2. Lymphozyten	31
3.1.2.3. T-Lymphozyten (CD3):	32
3.1.2.4. B-Zellen (CD19):	34
3.1.2.5. CD5(+)-Zellen in CD19(+)-Zellen:	35
3.1.2.6. Helferzellen, Supressor/Zytotoxische Zellen, CD4/CD8 Ratio:	37
3.1.2.7. IL2-Rezeptor-Zellen (CD25):	40
3.1.2.8. HLA-DR(+)-Zellen:	42
3.1.2.9. NK-Zellen (CD1656):	44
3.1.2.10. CD8(+)/CD11b(+) T-Supressor-Zellen/CD8(-)/CD11b(+) Zytotoxische T-Zellen:	47
3.1.2.11. CD57/CD8-Zellen:	51
3.1.2.12. CD4(+)/CD45RA(+)-T-Zellen:	54
3.1.2.13. CD45RO(+)/CD4(+)-Memory-T-Zellen:	57
<b>3.2. Histopathologie und Immunhistochemische Färbung</b>	<b>59</b>
3.2.1. Histologie	59
3.2.2. Immunhistochemie	59
3.2.3. Histologische Schnitte	61
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Altersabhängige Veränderungen bei Patienten mit CF</b>	<b>66</b>
4.2.1. Altersabhängige Veränderungen der Kontrollpersonen	66
4.2.2. Altersabhängige Veränderungen der Patienten mit CF	66
4.2.3. Mögliche Ursache für die fehlenden altersabhängigen LS-Veränderungen	67
<b>4.3. Vergleich der LS der Patienten mit CF und der Kontrollgruppe</b>	<b>69</b>
4.3.1. Gibt es einen primären Immundefekt bei Mukoviszidose?	69
4.3.2. Lymphozyten	69
4.3.3. B-Zellen (CD19(+)-Zellen)	70
4.3.4. T-Zellen (CD3(+)-Zellen)	70
4.3.5. CD4(+)-T-Lymphozyten / CD8(+)-T-Lymphozyten / CD4(+)/CD8(+)-Ratio	71
4.3.6. HLA-DR(+)-Zellen	72
4.3.7. Natürliche Killerzellen (CD16(+)/CD56(+)-Zellen)	72
4.3.8. IL-2R-Zellen (CD3(+)/CD25(+)-Zellen)	73
4.3.9. Naive- und Memory-T-Zellen (CD4(+)/CD45RA(+)- / (CD4(+)/CD45RO(+)-Zellen)	74
<b>4.4. Immunhistochemische Untersuchung von CF-Lungengewebe</b>	<b>75</b>
<b>4.5. Vergleich mit der Gruppe der rezidivierenden Infekte (RI)</b>	<b>77</b>

---

<b>4.6. Bedeutung der Beobachtungen für die Pathophysiologie bei CF:</b>	<b>79</b>
4.6.1. Auswirkungen der CD4-Dominanz auf die Entzündungsvorgänge in der Lunge	81
<b>4.7. Zukünftige Forschungsansätze</b>	<b>82</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>95</b>
<b>8. Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>96</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Grundlagen der Mukoviszidose

### 1.1.1. Definition

Die Mukoviszidose oder Zystische Fibrose (engl. „cystic fibrosis“, CF) beruht auf einer Störung des sekretorischen Epithels aller exokrinen Drüsen. Sie wird autosomal-rezessiv vererbt und ist mit einer Prävalenz von 1:620 bis 1:90.000 die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung im Kindesalter. Sie beruht auf Mutationen im „Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulator“- (CFTR)-Gen. Dies führt zur fehlerhaften bzw. fehlenden Funktion des durch das CFTR-Gen kodierten Chloridkanals mit der Folge eines gestörten Wasser- und Salztransportes. Dadurch sezernieren die Drüsen ein wasserarmes, hochvisköses Sekret, welches aus den Drüsen nicht abfließen kann, diese verstopft und eine Entzündung hervorruft. Die Folge sind schwere Sekundärveränderungen an Lunge, Pankreas, Darm, Leber, Gallenwegen und dem Reproduktionstrakt <sup>32</sup>.

Nach einer ersten Erwähnung der „salzig schmeckenden Kinder“ im 17. Jahrhundert erfolgte zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Definition der Mukoviszidose vorwiegend durch *Fanconi* und *Anderson*. *Quinton* postulierte 1983 als Basisdefekt eine intrazelluläre Chloridsekretionsstörung <sup>112</sup>. 1985 wurde das CF-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 7 entdeckt <sup>70,158</sup> und 1989 durch *Riordan*, *Tsui*, *Collins* in der Position 7q31 lokalisiert <sup>20</sup>.

### 1.1.2. Ätiologie - Pathophysiologie - Pathogenese

#### 1.1.2.1. Genetik

Das 230 Kilobasenpaare umfassende CFTR-Gen kodiert ein cAMP-reguliertes epitheliales Transportprotein, welches den transmembranösen Chloridionenfluß reguliert. Bislang sind über 900 Mutationen auf dem CFTR-Gen bekannt. Die in Mittel- und Nordeuropa mit circa 75% am häufigsten zu findende Mutation ist  $\Delta$ -F508, bei der in der Position 508 die Kodierung für die Aminosäure Phenylalanin fehlt.

Die unterschiedlichen Mutationen des CFTR-Gens können dazu führen, dass das CFTR-Protein fehlt, falsch positioniert ist oder eine funktionsuntüchtige Struktur aufweist. *Welsh* et al. teilten 1993 die CFTR-Mutationen entsprechend der betroffenen Schritte der Proteinsynthese in sechs Mutationsklassen ein <sup>156</sup>:

Klasse I: Die CFTR-Proteinsynthese fehlt oder ist gestört.

Klasse II: Die Reifung und der Transport des CFTR-Proteins in der Zelle sind gestört.

Klasse III: Die Regulation des CFTR-Ionenkanals ist defekt.

Klasse IV: Störungen in der Ionenleitfähigkeit des Kanals liegen vor.

Klasse V: Störungen in Wechselwirkungen mit anderen Proteinen.

Klasse VI: Verminderte Konzentration an CFTR.



### 1.1.2.2. Pathophysiologie

Die pathophysiologischen Vorgänge der Mukoviszidose sind an den Schweißdrüsen am besten untersucht. Dort wird nach Stimulation der Schweißdrüsen zwar cAMP als der notwendige intrazelluläre Botenstoff gebildet, es wird aber kein Schweiß sezerniert. Die luminalen Sekrete dicken ein und verlegen die Ausführungsgänge. Weiterhin wird das im Ausführungsgang vorhandene NaCl, welches normalerweise längs des elektrochemischen Gradienten resorbiert wird, nicht wieder in die Zelle aufgenommen. Der überwiegend transzelluläre Chloridtransport trägt zur transepithelialen Leitfähigkeit bei. Da die CF-Ausführungsgänge mangels funktionsfähigem CFTR für Chloridionen nur wenig oder gar nicht permeabel sind, haben sie nur geringe Leitfähigkeit. Dementsprechend können die Natriumionen nicht resorbiert werden und die NaCl-Konzentration im Endschweiß steigt an.

Auf die Pathophysiologie der Lungenerkrankung bei Patienten mit CF und den möglichen Einfluss des CFTR-Gendefektes auf die pulmonalen Vorgänge wird weiter unten genauer eingegangen.

### 1.1.2.3. Diagnose:

In der Mehrzahl der Fälle führt die pulmonale Symptomatik zur Diagnosestellung. Bestätigt werden kann das Vorliegen einer Mukoviszidose durch die quantitative Bestimmung der Elektrolyte im Schweißtest nach Gibson und Cooke. Eine ausreichende Menge Schweiß wird mit Hilfe der Pilocarpin-Iontophorese gewonnen. Eine Chloridkonzentration über 80 mmol/L (normal: 5-55 mmol/L) und eine Natriumkonzentration über 70 mmol/L (normal: 5-55 mmol/L) ist pathognomonisch für CF.

### 1.1.2.4. Prognose

Das mittlere Alter der 1999 neu diagnostizierten Patienten lag bei 1,2 Jahren<sup>108</sup>. Die Lebenserwartung der Patienten mit CF hat sich in den letzten 10-15 Jahren deutlich verbessert. 85% der Patienten mit CF erreichen die Pubertät und durch Therapieverbesserungen in den letzten Jahren auch immer häufiger das Erwachsenenalter. Die mittlere Überlebenszeit beträgt ungefähr 30 Jahre. Patienten mit CF mit vorwiegend pulmonaler Manifestation haben eine wesentlich schlechtere Prognose als Patienten mit CF mit vorwiegend intestinaler Manifestation<sup>24,42</sup>.

## 1.1.3. Organmanifestationen

Hauptmanifestationsorte der Mukoviszidose sind der Respirationstrakt und der Gastrointestinaltrakt.

### 1.1.3.1. Pankreas

Eine Pankreasbeteiligung findet sich bei fast allen Patienten mit CF. Auch im Pankreas scheint das Fehlen des CFTR-Proteins in den Pankreasgängen infolge einer reduzierten Wassersekretion für die Präzipitation der Proteine und die Verstopfung der Ductuli und Azini verantwortlich zu sein. Daher können die Pankreasenzyme den Darm nicht erreichen, was sowohl zu einer Autodigestion der Drüsen mit symptomatischer Pankreatitis, als auch zu Verdauungsstörungen infolge einer mangelnden Neutralisation der Magensäure führt.

### 1.1.3.2. Magen-Darm-Trakt

Im Darm führt die verminderte Chloridsekretion ebenfalls zu einer sekundären Wasserretention. Dieser Vorgang ist vermutlich die Ursache für die Eindickung des Darminhaltes, das Auftreten eines Mekoniumileus bei 10-15% der Neugeborenen mit CF und für das Auftreten des Intestinalen Obstruktionsyndroms (DIOS).

### 1.1.3.3. Leber

Das Fehlen eines funktionierenden CFTR-Proteins, das in der Leber auf den Epithelzellen der Gallengänge lokalisiert ist, führt zu einer histologisch sichtbaren Gallenwegsobstruktion<sup>45</sup> mit konsekutiver biliärer Zirrhose, sowie Ösophagusvarizenblutungen und Hypersplenismus. Eine erhöhte Lithogenität der Galle, hervorgerufen durch veränderte Sekrete in der Gallenblase wird diskutiert, da eine erhöhte Prävalenz an Gallensteinen bei Patienten mit CF festgestellt wurde<sup>1</sup>.

### 1.1.3.4. Weitere Organmanifestationen

Eine Vielzahl weiterer Organmanifestationen wurden im Zusammenhang mit Mukoviszidose beschrieben. Eine Auswahl soll hier beispielhaft erwähnt werden:

- Schweißdrüsen: Bei Patienten mit CF ist aufgrund des CFTR-Defektes die Chloridkonzentration im Schweiß um das 5-fache erhöht<sup>27</sup>. Klinisch zeigen die Patienten eine erhöhte Hitzeempfindlichkeit
- Nasennebenhöhlen: Im Vordergrund steht eine chronische Pansinusitis. Eine chronische nasale Polyposis kann das erste Symptom einer Mukoviszidose sein.
- Cervix uteri: Der Wassergehalt des Zervikalschleims ist reduziert und steigt in der Zyklusmitte nicht an. Dies könnte eine Erklärung für die Fertilitätsstörung der weiblichen Patienten mit CF sein, da dieser Vorgang der Erleichterung der Penetration der Spermien zum Zeitpunkt der Ovulation dient<sup>38</sup>.
- Vas deferens: Die Mehrzahl der männlichen Patienten mit CF leidet unter einer Azoospermie infolge eines angeborenen bilateralen Fehlens des Vas deferens (CBAVD)<sup>38</sup>.
- Als seltene Komplikationen wurden bei CF unter anderem eine Myokardfibrose, Arthropathien und eine IgA-Nephropathie, vermutlich infolge einer Immunkomplex-Krankheit beobachtet<sup>141,161</sup>.

Auf die Einzelheiten der pulmonalen Manifestation der Mukoviszidose wird im nächsten Abschnitt gesondert eingegangen.

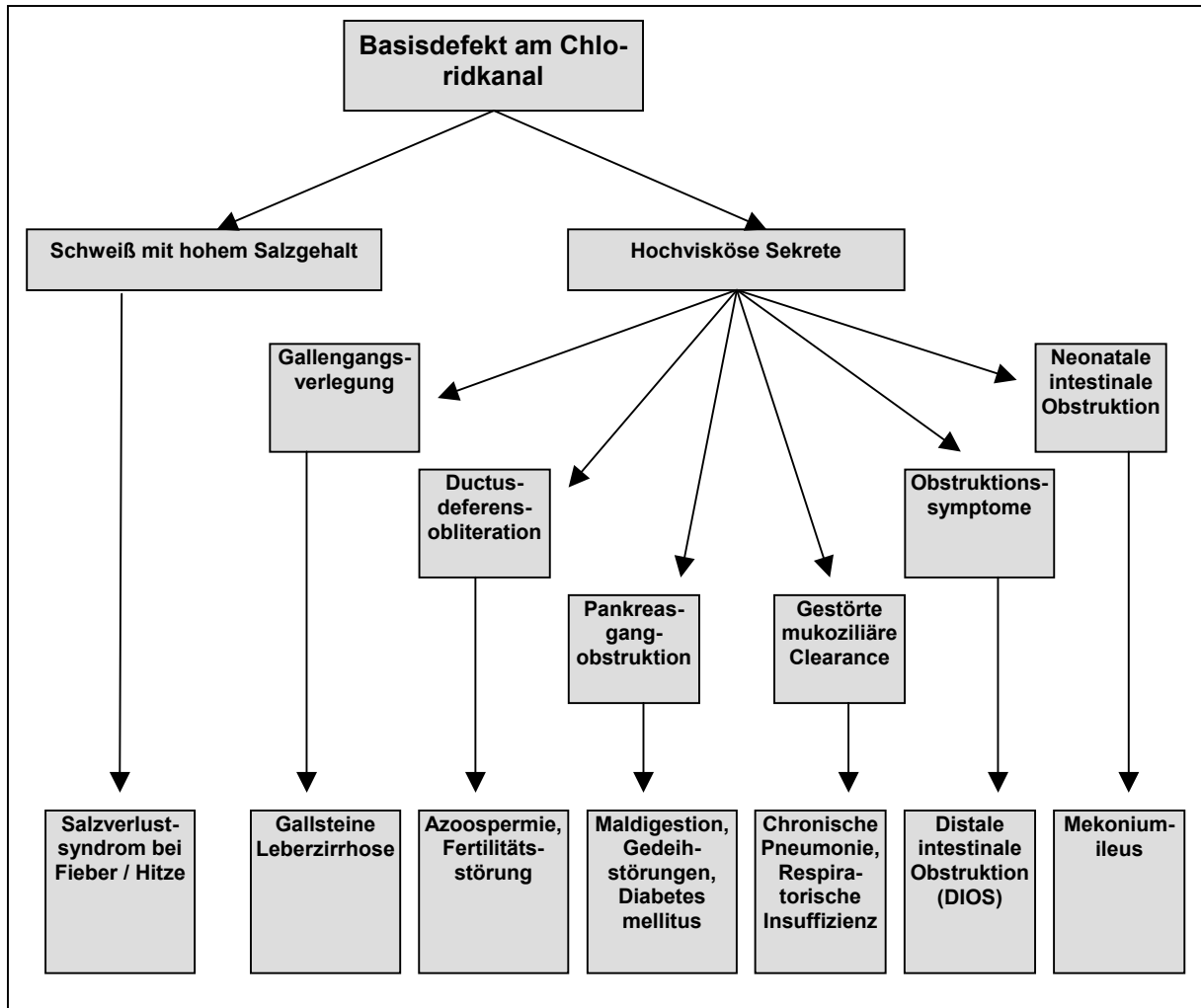
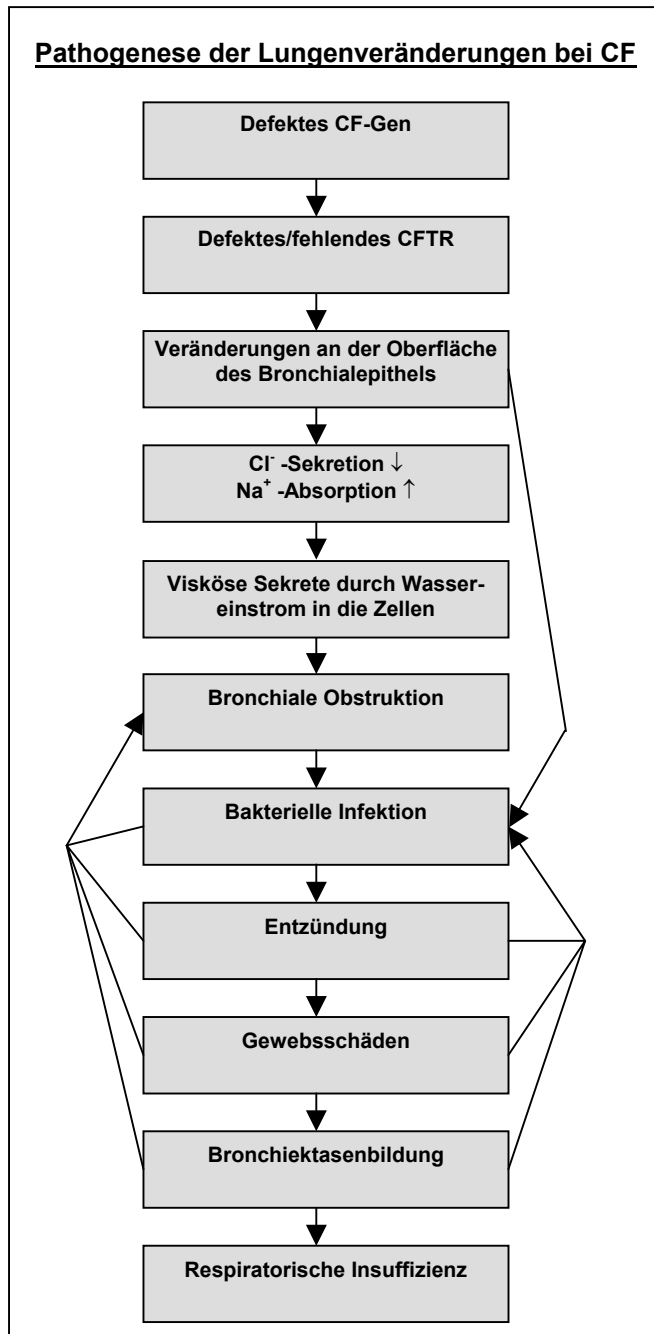


Abb 1.1 Übersicht über die wichtigsten Organmanifestationen bei Mukoviszidose

## 1.2. Die pulmonale Manifestation der Mukoviszidose

Die Lungenbeteiligung bei Mukoviszidose ist für den Verlauf und die Prognose der Erkrankung entscheidend und die häufigste Todesursache <sup>24</sup>. Die Krankheit manifestiert sich typischerweise durch



Husten, bronchiale Obstruktion, Tachypnoe und rezidivierende Pneumonien. Veränderungen wie ein vergrößerter Thoraxdurchmesser oder Trommelschlägelfinger können frühzeitig auftreten. Bei Verschlechterung zeigen sich eine beschleunigte Atmung, ein raues Atemgeräusch oder auch lokalisierte Rasselgeräusche. Starker, krampfartiger Husten mit Auswurf, Einziehungen, ausgeprägte Thoraxdeformitäten, ständige Rasselgeräusche, Giemen und Brummen, eine Kyphoskoliose und eine Belastungshypoxie sind Zeichen des fortschreitenden Schweregrads. Akute Exazerbationen manifestieren sich durch eine Zunahme und/oder eine Verfärbung von Sputum, durch subfebrile oder febrile Temperaturen, Gewichtsverlust, mangelnde Belastbarkeit oder Abgeschlagenheit. Eine massive Produktion von grünem, mehrschichtigen bronchiektatischen Sputums ist häufig. Im Spätstadium der Erkrankung treten Belastungs- und Ruhehypoxie, Tachykardie, Zyanose und Hyperkapnie mit den Begleiterscheinungen Kopfschmerzen, Thoraxschmerzen und Orthopnoe hinzu. Typische Komplikationen bei langem Krankheitsverlauf sind Pneumothoraces, Hämoptysen, Atelektasen und eine allergische bronchopulmonale Aspergillose <sup>10</sup>.

**Abb. 1.2** Schema der Pathogenese der Lungenveränderung bei Mukoviszidose

Die weiterführende Diagnostik zeigt folgende Auffälligkeiten: Bereits Säuglinge mit CF weisen bodyplethysmographisch Zeichen einer Überblähung auf. Früheste pathologische Veränderungen werden durch die Erhöhung der Ratio des Residualvolumens und der Totalkapazität (RV/TLC) angezeigt. Die Messung der Fluss-Volumen-Kurve in der Lungenfunktion ist charakterisiert durch einen verminderten expiratorischen Flow bei 25-75% der Vitalkapazität (MEF<sub>25</sub>/MEF<sub>75</sub>). Erst bei Progression der Erkrankung sind Einschränkungen der 1-Sekunden-

Die weiterführende Diagnostik zeigt folgende

Ausatmungskapazität ( $FEV_1$ ) oder der forcierten Vitalkapazität messbar. Die Lungenfunktion fällt pro Jahr um mehrere Prozentpunkte bezogen auf die Norm. In der Bronchiallavage (BAL) ergeben sich entzündliche Veränderungen mit oder ohne bakterielle Besiedlung und im Thorax-Röntgenbild zeigt sich häufig schon sehr früh eine pulmonale Überblähung und/oder peribronchiale Infiltrate.

Pathophysiologisch liegt im Respirationstrakt eine Viskositätszunahme des Sekrets und eine Sekretretention vor. Wie genau der für CF bekannte Elektrolyttransportdefekt zu diesen Vorgängen beiträgt, ist noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise ist der Defekt an der Austrocknung der Sekrete in den Atemwegen beteiligt, da infolge der fehlenden/mangelhaften Chloridionensekretion eine verstärkte  $Na^+$ -Absorption erfolgt, die sekundär zum passiven Fluss von Wasser in die Zelle hinein führt (siehe Abb. 1.3.). Die Folge ist eine Dehydratation der intraluminalen Sekrete<sup>63,133</sup>. Die noch intakten, kalziumabhängigen Chloridkanäle sowie die parazellulären Transportmechanismen sind nicht in der Lage, diesen Defekt zu kompensieren. Als Folge der Dehydratation nimmt die Viskosität der Sekrete zu. Dadurch ist die Mobilisierung der Sekrete erschwert, und es entsteht eine chronische Obstruktion. Eine Obstruktion der Organpassagen und ein vergrößerter Schleimtrakt ist auch in den anderen durch CF befallenen Organen bekannt, die starke persistierende Infektion und Entzündung sind aber einzigartig in den Atemwegen. Als Ursache werden sowohl die Viskositätszunahme des Bronchialschleims, als auch eine Verminderung der ziliären Zellen mit sekundär verminderter mukoziliärer Clearance diskutiert<sup>26</sup>. Eine Erhöhung der Clearance kann auch nicht durch die Gabe von  $\beta_2$ -Sympathomimetika erreicht werden.

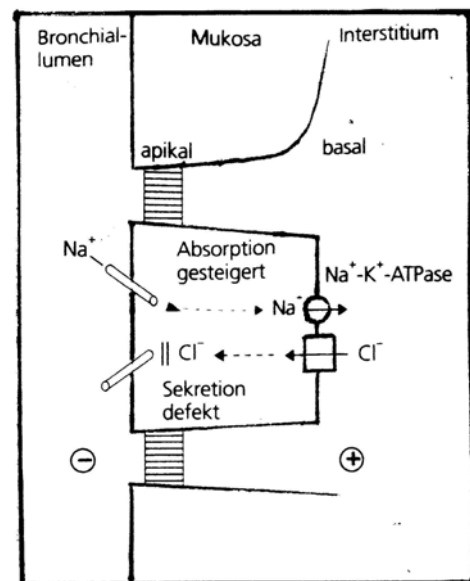


Abb. 1.3 Vereinfachte schematische Darstellung der Basisstörung bei CF am Beispiel des respiratorischen Epithels.

Die komplexen intrabronchialen Entzündungsmechanismen infolge der Infektionen führen zu einer fortschreitenden Destruktion der bronchialen Mukosa sowie langfristig zu Bronchiektasien und einem progredienten Stabilitätsverlust der Bronchialwände. Es kommt zum Bronchialkollaps, der wiederum die Mukostase begünstigt und das Infektionsrisiko steigert.

Intrauterin und nach der Geburt bis zum Beginn einer Infektion oder Entzündung ist die Lunge morphologisch bis auf eine mögliche Erweiterung der submukösen Drüsengänge in den Luftwegen normal<sup>142</sup>. Als ersten makroskopischen Hinweis auf die intrabronchial ablaufenden Vorgänge fanden Wentworth<sup>157</sup> und Bedrossiant<sup>5</sup> in Autopsien von Patienten mit CF Zeichen von Bronchopneumonien und Schleimverstopfungen der Bronchien. Die Präparate der älteren Patienten wiesen außerdem Bronchiektasien und Lungenemphyse auf. Die Veränderungen sind deutlich altersabhängig und ungleich verteilt<sup>136</sup>. Sie befallen bevorzugt den rechten oberen Lungenlappen<sup>147</sup>. Elektronenmikroskopisch zeigte sich im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen unspezifische Veränderungen wie Zilienabnormalitäten, Hyperplasie der Mukosazellen, degenerierte und abgeschilferte Epithelzellen und

Bakterienkolonisation, die aber auch bei chronischen nicht-CF Lungenerkrankungen gefunden wurden<sup>37</sup>. Mit Fortschreiten der Veränderungen kommt es zur respiratorischen Insuffizienz und zum Cor pulmonale. Rund 90% der Mukoviszidosepatienten versterben infolge respiratorischen Versagens.

### 1.2.1. Pseudomonas-Infektion bei CF

Innerhalb der ersten Lebensjahre weisen die Patienten mit CF eine charakteristische Bakterienflora<sup>58,116</sup>, bestehend aus *Staphylococcus aureus*, *Hämophilus influenza* und Gram-negativen Bakterien auf<sup>87</sup>. Erst später werden fast alle Patienten zusätzlich durch *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infiziert, welcher eine wichtige Rolle für den Verlauf der Lungenerkrankung spielt. Fast alle Patienten sind im Krankheitsverlauf mit diesem Keim infiziert, die Kolonisation erfolgt durchschnittlichen im Alter von 10 Jahren. Laut mikroskopischer Studien ist der Befall im allgemeinen endobronchial lokalisiert und mit Obliteration besonders der kleinen Atemwege (< 1mm) durch bakterienhaltige Schleimpröpfe verbunden. Eine systemische oder disseminierte Infektion erfolgt praktisch nie.

Kurz nach der Kolonisierung in der Lunge überwiegt die nichtmukoide Form von *Pseudomonas*, im weiteren Verlauf dominiert aber die mukoide Form, die ein mukoides Exopolysaccharid, das Alginate, produziert. Durch das Alginate ist sie schlechter durch die angeborenen Immunabwehr oder eine Antibiotikatherapie abzutöten. Der Erhalt der mukoiden Form scheint mit der ionischen Zusammensetzung der CF-Atemwegsflüssigkeit zusammenzuhängen<sup>16,17</sup>. Auch Umweltfaktoren werden für die Transformation in die mukoide Form verantwortlich gemacht. Die Clearance dieser Form aus der Lunge ist in der Anfangsphase nach Exposition im Vergleich zur nichtmukoiden Form doppelt so langsam, da die Bakterien durch das Exopolysaccharid große Mikrokolonien bilden können, welche von den Phagozyten nicht eliminiert werden können<sup>82,162</sup>. Sie führen zu einer besonders schnellen Verschlechterung der Lungenfunktion<sup>56</sup>.

Die PA-Besiedlung selber führt wahrscheinlich durch die während der Infektion in den Bronchialsekreten vermehrt nachweisbaren Proteinase Elastase und alkalische Protease schon früh zu Gewebeschäden. Dies wurde in Tierversuchen bestätigt<sup>34,36</sup>. Die Bedeutung der Proteasen wird im immunologischen Teil noch weiter erläutert.

Warum eine erhöhte Disposition zu einer Lungeninfektion mit *Staphylococcus aureus*, *Hämophilus influenza* und Gram-negativen Bakterien besteht, eine erhöhte Anfälligkeit für *Pseudomonas aeruginosa* existiert und eine dauerhafte Eradikation nicht möglich ist, wurde noch nicht geklärt. Als eine Möglichkeit wird eine erhöhte Adhärenz des Bakteriums an die Epithelzellen von Patienten mit CF besonders mit  $\Delta F508$ -Mutation angenommen<sup>163</sup>. Auch eine verminderte Menge an Sialinsäure auf der Epithelzelloberfläche könnte eine Rolle spielen. PA binden besser an Asialoproteine als an die sialysierte Form<sup>125</sup>. Somit würde eine verstärkte Bindung an Asialo-GM1, ein apikaler Membranrezeptor für PA, erfolgen. Dieser wird sowohl auf der Oberfläche bei Patienten mit CF, als auch bei gesunden Kontrollpersonen auf regenerierten respiratorischen Epithelzellen exprimiert. Ein Hinweis für eine direkte Verbindung zum CFTR-Defekt ist die Untersuchung mit CFTR-Knockout-Mäusen, bei denen

nach Infektion mit  $10^5$  Pseudomonas im Vergleich mit Kontrollmäusen eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate und Bakterienmenge festgestellt wurde<sup>49 55</sup>.

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass mit Hilfe einer aggressiven Therapie die frühe PA-Besiedlung zeitweise so weit unterbrochen werden kann, dass die Atemwege frei von diesem Keim sind<sup>151</sup>. Hoiby et al. betonen die Wichtigkeit einer regelmäßigen Überwachung der Patienten durch Bronchiallavage oder Spülung der oberen Atemwege, um eine möglichst frühzeitige Diagnose und Therapie zu ermöglichen<sup>59</sup>. Auf Mukoviszidose spezialisierte Zentren sind für die erfolgreiche Behandlung eine wichtige Voraussetzung<sup>119</sup>.

## 1.3. Immunologie

### 1.3.1. Physiologische Immunabwehr der Lunge

Die normale bronchiale Immunabwehr umfasst die mukoziliäre Clearance, den Schutz durch das respiratorische Epithel, zelluläre und humorale Anteile des die Bronchialoberfläche bedeckenden Flüssigkeitsfilms und phagozytierende Zellen. Im Rahmen der bronchialen und alveolären epithelialen Abwehrfunktion können ortsständige Alveolarmakrophagen, intraepitheliale und interstitielle Lymphozyten sowie Surfactant produzierende Typ-II-Epithelzellen eindringende Mikroorganismen eliminieren bzw. deren proinflammatorische Potenz neutralisieren. In der frühen entzündlichen Phase induzieren Mikroorganismen die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Alveolarmakrophagen und Epithelzellen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen. Es folgt der Einstrom inflammatorischer Zellen wie neutrophiler Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Lokal sezernierte Immunglobuline und Surfactantapoproteine fungieren als Opsonine und unterstützen die Phagozytose durch Alveolarmakrophagen, Granulozyten und Monozyten. Der Phagozytoseprozess und die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-8 induzieren die Synthese von Lipidmediatoren wie Leukotrien B4 (LTB4), toxischer Sauerstoffradikale und Proteasen. Im Verlauf der Entzündung produzieren die in den Bronchoalveolarraum eingewanderten Lymphozyten spezifische Antikörper und tragen damit zur beschleunigten Elimination von Erregern bei. Die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (wie IL-10), die Produktion und Sekretion von Antiproteasen und die Synthese antiinflammatorischer Lipidmediatoren und des Stickstoffmonoxids begrenzen die lokale Inflammation. Terminiert wird die Entzündung durch die Apoptose neutrophiler Granulozyten und ihre Elimination durch Alveolarmakrophagen.

### 1.3.2. Entzündungsmechanismen in der Lunge von Patienten mit CF

Die bei der Mukoviszidose ablaufende intrabronchiale Entzündungsantwort ist charakterisiert durch eine veränderte Zytokinproduktion und einen übermäßigen Zustrom von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen: Untersuchungen der Bronchiallavage ergaben eine erhöhte Menge an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ <sup>11,76</sup>, wobei die IL-1 Konzentration mit der Anzahl der polymorphen mononukleären Leukozyten (PMN) korreliert<sup>159</sup>. Parallel wurde eine verminderte Konzentration an antiinflammatorisch wirkendem IL-10 festgestellt. IL-10, das in den Entzündungszellen die Produktion von IL-1, IL-8 und TNF hemmt, wird in gesunden Lungen in den Epithelzellen

produziert<sup>11</sup>. Eine verminderte Produktion an IL-10 in Epithelzellen trägt wahrscheinlich zur übermäßigen und anhaltenden Entzündungsantwort auf transiente Infektionen bei. Auch im CF-Sputum wurden IL-1, IL-6, IL-8 und TNF vermehrt festgestellt<sup>73,77</sup> IL-8 gilt dabei als besonders wichtiger chemotaktischer Faktor<sup>117</sup>.

Proteasen, einschließlich Elastase, Proteinase und Cathepsin G, die aus Entzündungszellen freigesetzt werden, führen, ebenso wie die Produktion von O<sub>2</sub>-Radikalen, zu einer direkten Zerstörung des Lungengewebes. Freigesetzte DNA aus lysierten neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen und Bakterien verstärkt die Viskosität der Lungensekrete. Die massive Freisetzung von Elastase kann durch die antiproteolytische Abwehr der Atemwege, wie zum Beispiel durch  $\alpha$ 1-Proteaseinhibitor oder SLPI („secretory leucocyte protease inhibitor“) nicht unterdrückt werden und entfaltet ungehinderte proteolytische Aktivität, indem sie Elastin und weitere Strukturproteine zersetzt. Außerdem hat Elastase eine sekretfördernde Wirkung, welche die Sekretproduktion und die Atemwegsobstruktion verstärkt. Elastase reduziert die Abwehrfähigkeit durch Abspaltung wichtiger Opsonine, wie IgG und C3bi, und für die Phagozytose entscheidender Rezeptoren wie CR1<sup>7,40,149</sup>. Außerdem zerstört sie Fibronektin auf der Oberfläche der Bronchialschleimhaut, so dass Bakterien noch besser adhäreren können. All diese Faktoren tragen zur Chronifizierung der Infektion bei. Die neutrophile Elastase führt auch zur Abspaltung der Fc-Teils der Immunglobuline, der für die Bindung der Immunglobuline an die Makrophagen verantwortlich ist, und schwächt so die Immunabwehr<sup>40</sup>. Schließlich verstärkt Elastase in den Epithelzellen, den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten die Bildung von chemotaktischen Faktoren, besonders IL-8 und Leukotrien B<sub>4</sub>, was zur weiteren Neutrophilenansammlung in den Atemwegen und somit zu einem Circulum vitiosum führt.

*Kahn et al.* stellten das Konzept einer allein infektiös bedingten Entzündung bei CF in Frage. Sie zeigten bei Kindern mit CF ohne Anzeichen einer bakteriellen, viralen oder Pilz-Infektion entzündliche Vorgänge in den Atemwegen, bestehend aus einer erhöhten Zahl an Neutrophilen sowie einer erhöhten Interleukin-(IL)-8 Konzentration in der Broncholalveolarflüssigkeit<sup>68,82</sup>. Dementsprechend könnte angenommen werden, dass entzündliche Vorgänge der bakteriellen Infektion vorausgehen, bzw. die defekte CFTR-Funktion alleine zur Entzündungsdisposition oder Entzündungsreaktion beiträgt.

Neben der Veränderung der intraluminalen Sekrete scheint der CFTR-Basisdefekt noch weiteren Einfluss auf die Pathophysiologie der primären Lungenerkrankung zu haben:

Defensine, die beim gesunden Menschen als antimikrobielle Substanzen eine Bedeutung für die angeborene Immunabwehr im Respirationstrakt besitzen, werden von Patienten mit CF vermindert sezerniert. Die Bedeutung der Defensine ist im einzelnen allerdings noch unklar, ein Zusammenhang zum CFTR-Basisdefekt noch nicht geklärt<sup>4,134</sup>.

Weiterhin produzieren bronchiale Epithelzellen von Patienten mit CF im Gegensatz zu Epithelzellen gesunder Personen IL-6 und IL-8 und exprimieren große Mengen ICAM-1, einen Liganden für das wichtigste Adhäsionsmolekül der Neutrophilen. Laborstudien zeigten, dass eine Adhäsion der neutrophilen Granulozyten über ICAM die IL-8 Produktion verstärkt und zu einer Persistenz der



Neutrophilen in und/oder auf dem Epithel führt; der schädigende Effekt wird so verlängert. Somit haben die Epithelzellen selbst einen entscheidenden Einfluss auf die lokale Entzündungsreaktion, was Folge der defekten CFTR-Funktion sein könnte, deren Produkt hauptsächlich auf Epithelzellen exprimiert wird.

Andere Untersuchungen zeigten, dass CFTR eine Rolle für die Internalisierung von Bakterien durch Epithelzellen spielen könnte. *Pseudomonas* binden spezifisch an die extrazelluläre Domäne von CFTR, wodurch physiologischerweise die Ingestion von Bakterien und deren intrazelluläre Abtötung ermöglicht wird. Bei Patienten mit CF scheint es so zu sein, dass die infolge der defekten CFTR-Funktion veränderten Glykokonjugate auf der Zelloberfläche für die verbesserte Haftung der Mikroorganismen und die verstärkte IL-8 Sekretion verantwortlich sind<sup>30</sup>. Auch das veränderte ionische Milieu der Atemwege bei CF-Kranken scheint die Abwehr zu schwächen und eine anhaltende Infektion mit Entzündungsantwort zu ermöglichen<sup>93,134</sup>.

Zusammenfassend scheinen eine Vielzahl an Mechanismen an der Pathophysiologie der Mukoviszidose beteiligt zu sein. In dieser Studie wurden speziell die adaptive Immunität und die Lymphozyten-subpopulationen untersucht. Eine kurze Zusammenfassung der bereits vorliegenden Untersuchungen zu diesem Thema bietet der folgende Abschnitt.

### 1.3.3. Die erworbene Immunität bei Patienten mit CF

Ob bei Patienten mit CF innerhalb der humoralen und der zellvermittelten Immunität ein Defekt vorliegt und welche Bedeutung dieser bezüglich des Krankheitsverlaufs bei CF hat, ist noch nicht geklärt. Beispielsweise blieben verschiedene Versuche, einen metabolischen Defekt der CF-Lymphozyten festzustellen, ergebnislos oder widersprüchlich<sup>12,18</sup>. Weiterhin zeigte sich, dass trotz einer normalen Anzahl an T-Zellen<sup>58</sup> und einer normalen proliferativen Antwort auf in-vitro Stimulation durch verschiedene Bakterien<sup>139</sup>, die zelluläre Immunantwort gegen Gram-negative Bakterien, wie *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marescens* und *Proteus mirabilis* und auch gegen *Pseudomonas aeruginosa* fehlerhaft ist<sup>138</sup>.

Bezüglich der antikörpervermittelten Immunität spricht eine normale Anzahl an zirkulierenden B-Zellen, eine normale oder erhöhte Konzentration an Immunglobulinen und das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen *Pseudomonas* für eine normale Funktion<sup>58,145</sup>. Dagegen spricht die Beobachtung, dass die Menge der Immunglobuline bei einer signifikanten Anzahl an Kindern mit CF unter 10 Jahren erniedrigt (Hypogammaglobulinämie) und bei älteren Patienten mit fortgeschrittener Lungenerkrankung über das normale Niveau erhöht ist (Hypergammaglobulinämie)<sup>86</sup>. Das Zusammentreffen der Hypergammaglobulinämie und der Lungenerkrankung könnte bedeuten, dass die antikörpervermittelte Immunität eine Rolle in der Lungenschädigung spielt. Bestärkt wird diese Vermutung durch den Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen in Patienten mit CF mit fortgeschrittener Erkrankung<sup>126</sup>.

Außerdem sind die funktionalen Fähigkeiten der spezifischen Antikörper gegen *Pseudomonas aeruginosa* fraglich. Ein hoher Titer an Anti-*Pseudomonas* Antikörpern wurde im Blutkreislauf und in bron-

chialen Sekreten und im Sputum nachgewiesen<sup>127</sup>. Diese scheinen aber eine effektive Opsonisierung für die Pseudomonasaufnahme und –abtötung durch normale und CF-Makrophagen zu verhindern oder zu hemmen<sup>41</sup>. *Pier et al.* wiederum vermuten eine protektive Rolle einiger anti-Pseudomonas aeruginosa Antikörper, da sie zeigen konnten, dass ältere, relativ gesunde Patienten mit CF mit antimukoid-Exopolysaccharide-spezifischen Antikörpern frei von einer erkennbaren *Pseudomonas aeruginosa*-Besiedlung blieben<sup>109</sup>.

Die Untersuchungen bezüglich der Veränderungen der einzelnen Lymphozytensubpopulationen bei CF sind unvollständig und teilweise widersprüchlich. Bei T-Zellen von Patienten mit CF fand sich im Vergleich mit Kontrollpersonen eine verminderte T-Zell-Zytotoxizität gegen allogene mononukleäre Zielzellen, was als eine der Ursachen für die persistierende *PA* Infektion diskutiert wird, da laut *Markham et al.* die zytotoxischen T-Zellen für die Elimination von *PA* wichtig sind<sup>84</sup>. Außerdem ergab sich bei 25% der Patienten eine erhöhte T-Suppressorfunktion, sowie ein verminderter Prozentsatz an T-Helfer-Zellen und eine verminderte T-Helfer-Funktion, ermittelt über die Immunglobulinsynthese<sup>72</sup>. Bestätigt wurden die Ergebnisse in einer Folgeuntersuchung. Hier war die Suppressor-Aktivität während einer pulmonalen Exazerbation deutlich erhöht und ebenfalls die zytotoxische Aktivität und T-Helfer-Aktivität erniedrigt<sup>71</sup>. *Döring et al.* dagegen konnte nach durchflußzytometrischer Bestimmung von CD4- und CD8-Oberflächenmarkern keinen Unterschied in der Expression bei Patienten mit CF und bei Kontrollpersonen feststellen<sup>35</sup>. Bezüglich der Concanvalin A (Con A) induzierten Suppressor-Aktivität beobachteten *Harper et al.* eine leichte Erniedrigung, die aber nicht statistisch signifikant war, wie es *Lahat et al.* in einer ähnlichen Untersuchung feststellten<sup>53,78</sup>. Die Ratio zwischen Helfer-/Inducer- und zytotoxischen/Suppressor-T-Zellen ist Patienten mit CF im Vergleich zu gesunden Kontrollen laut *van Geffel*<sup>152</sup> nicht signifikant verändert. *Smith et al.* hingegen beobachteten eine signifikante Erhöhung der CD4/CD8-Ratio<sup>135</sup>.

Untersuchungen der Entzündungsvorgänge sowie der Lungenschädigung beschränken sich überwiegend auf den intrabronchialen Raum. *Tomashefski et al.* aber fanden in Lungenautopsien von Patienten mit CF auch eine interstitielle Pneumonie als Zeichen der Lungenerkrankung bei CF. Die histologischen Untersuchungen zeigten diffus erweiterte Alveolarsepten, unter anderem hervorgerufen durch Lymphozyten<sup>148</sup>. Auch *Sorensen et al.*<sup>140</sup> wiesen im Lungeninterstitium Infiltrate mononukleärer Zellen nach. Diese sind auch schon in der frühen Kindheit vorhanden<sup>132</sup>. Dies spricht dafür, dass auch das Lungeninterstitium sowie die T- und B-Lymphozyten an der Entzündungsreaktion beteiligt sind und zur direkten Zerstörung des Lungengewebes beitragen.

Bei den CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen wurden zwei verschiedene Zytokinsekretionsmuster festgestellt<sup>100</sup>: Typ T<sub>H</sub>1-(T-Helfer-1) Zellen produzieren vor allem IL-1,  $\gamma$ -Interferon (INF- $\gamma$ ) und TNF- $\beta$ , wohingegen Typ T<sub>H</sub>2-(T-Helfer-2)-Zellen charakteristischerweise IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 abgeben. T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 entstehen aus derselben Vorstufe (T<sub>H</sub>0)<sup>3</sup>. Die weitere Differenzierung erfolgt vermutlich durch Umwelt- und genetische Faktoren. Unter anderem scheint IL-4 die Entstehung von T<sub>H</sub>2-Typ-Zellen, und  $\gamma$ -IFN die Entstehung von T<sub>H</sub>1-Zellen zu begünstigen<sup>19,80</sup>. Umgekehrt verhindert INF- $\gamma$  die Ausbildung von T<sub>H</sub>2-Zellen, während IL-4 die Ausbildung von T<sub>H</sub>1-Zellen blockiert. Die verschiedenen Sekretionsmus-

ter führen zu verschiedenen Funktionen der zwei T-Zell Typen:  $T_H1$ -Zellen aktivieren mit ihren Zytokinen Makrophagen und zytotoxische Zellen. Histologisch imponiert diese Entzündungsantwort vor allem mit zellulären Infiltraten (zelluläre Immunreaktion). Die Zytokine der  $T_H2$ -Zellen sind entscheidend für die Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen in antikörper-sezernierende Zellen (humorale Immunreaktion). Eine Übersicht zeigt die folgende Abbildung:

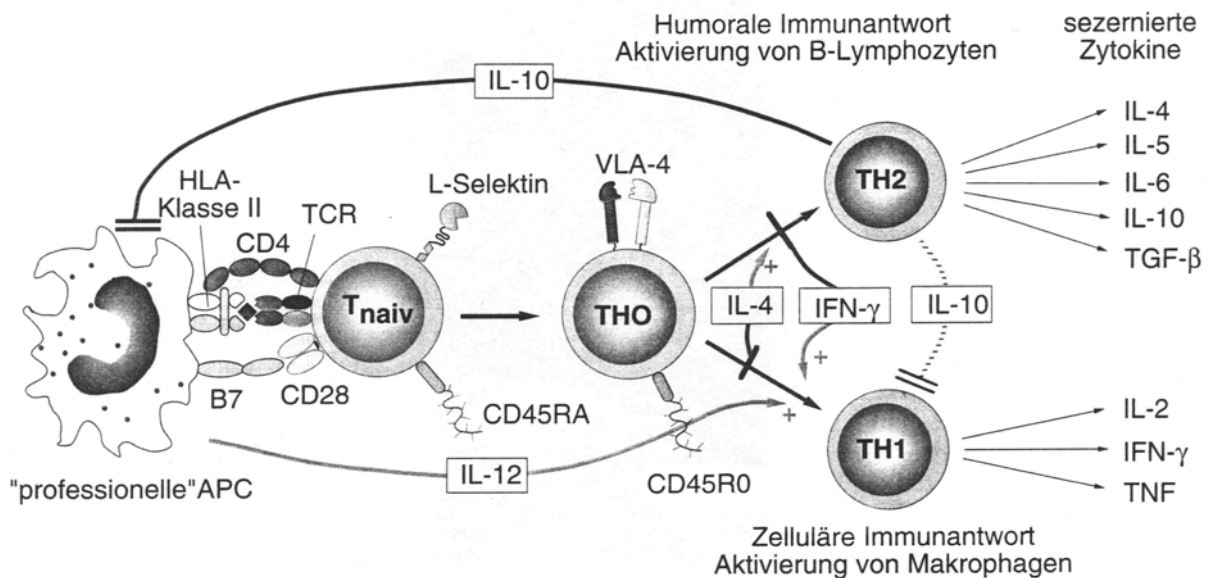


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Entwicklung von CD4-Effektorzellen <sup>3</sup>

Verschiedene Untersuchungen sprechen dafür, dass in der CF-Lunge eine  $T_H2$ -Typ Entzündungsantwort erfolgt: Es wurde nachgewiesen, dass eine intrabronchiale Antigenbelastung eher zu einer humoralen als zu einer zellvermittelten Immunantwort führt <sup>155</sup>, da beispielsweise die Entzündung bei allergischem Asthma unter anderem durch aktivierte T-Zellen und eine erhöhte IgE-Konzentration charakterisiert ist <sup>22</sup>. Auch Coyle et al. <sup>23</sup> machen eine  $T_H2$ -Reaktion verantwortlich für die massive IgE-Konzentration in Lungen von Patienten mit bronchialer Hyperreagibilität. Beim atopischen Asthma überwiegt eine aus  $T_H2$ -Typ T-Lymphozyten bestehende T-Zell Population <sup>22</sup>. Constant et al. machen das Lungenmilieu per se, infolge dort vorhandener dendritischer Zellen für die Differenzierung der T-Helfer-Zellen in den  $T_H2$ -Typ verantwortlich <sup>21</sup>. Schließlich sprechen auch die in der Lunge gefundenen Plasmazellen <sup>146</sup>, die im späteren Krankheitsverlauf auftretende Hypergammaglobulinämie <sup>86</sup> und die bei den Patienten mit CF beobachtete erhöhte IL-6 Konzentration in der Bronchoalveolarflüssigkeit <sup>106</sup>, im Sputum <sup>105</sup> und in der Trachealdrüsensekretion <sup>65</sup> für ein Überwiegen der  $T_H2$ -Antwort in der CF-Lunge. Eine Beteiligung dieser Entzündungsvorgänge an allergischen pulmonalen Komplikationen, an der allergischer bronchopulmonaler Aspergillose und an der akuter Bronchiolitis obliterans organisierter Pneumonie (BOOP) wird diskutiert <sup>105,131,54</sup>. Somit haben die Entzündungsprozesse wahrscheinlich auch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Mukoviszidose.

## 1.4. Zielsetzung der durchgeführten Untersuchung

Schon andere Untersuchungen nutzten die durchflußzytometrische Bestimmung der LS zur Bestimmung der Funktion des Immunsystems und des Krankheitsverlaufs bei entzündlichen Erkrankungen wie Sarkoidose<sup>52,104</sup>, Asthma<sup>46</sup> und BOOP<sup>103</sup>. Allerdings beschränkten sich die bei Patienten mit CF bisher durchgeführten Analysen der Lymphozytensubpopulationen (LS) auf eine geringe Zahl untersuchter Subpopulationen und wenige Patienten. Die Ergebnisse waren widersprüchlich. In der hier vorliegenden Untersuchung erfolgte erneut eine durchflußzytometrische Bestimmung der peripheren Lymphozytensubpopulationen im Blut, wobei sowohl die Bandbreite der untersuchten LS, als auch die Anzahl der untersuchten Patienten mit CF deutlich erweitert wurde.

Zur detaillierten Beurteilung der möglichen Veränderungen der LS bei Mukoviszidosepatienten wurden mit Hilfe gesunder Normalpersonen Normwerte der Lymphozyten und der einzelnen LS erstellt. Um CF-spezifische Veränderungen von infektionsbedingten Veränderungen differenzieren zu können, erfolgte weiterhin die Untersuchung einer Gruppe mit Patienten mit rezidivierenden Atemwegsinfektionen unter den gleichen Bedingungen. Die Ergebnisse der drei Gruppen wurden miteinander verglichen und speziell im Hinblick auf den pulmonalen Entzündungsprozess bei CF diskutiert.

Da im Gegensatz zum intrabronchialen Kompartement das Wissen über die interstitiellen Entzündungsvorgänge der Lunge von Patienten mit Mukoviszidose noch limitiert ist, wurden parallel zur durchflußzytometrischen Bestimmung der LS immunhistochemische Untersuchungen von CF-Lungengewebe durchgeführt. Durch den Vergleich der peripheren Veränderungen und der immunhistochemischen Befunde konnte so eine genauere Analyse der Bedeutung des lymphozytären Systems für die pulmonalen Vorgänge erreicht werden.

Die Veränderungen der LS bei Patienten mit CF wurden auch in bezug auf die persistierende *Pseudomonas-aeruginosa* Infektion bei diesen Patienten analysiert. Ein kausaler Zusammenhang mit peripheren Veränderungen der LS wurde diskutiert.

Abschließend wurden die erhaltenen Ergebnisse im Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung für die Pathophysiologie der Mukoviszidose diskutiert. Mögliche Auswirkung auf die Therapie der Erkrankung sollten erörtert werden.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Zielsetzungen der durchgeführten Untersuchung.

- Erstellung altersentsprechender Normwerte der LS durch Durchführung einer Lymphozytenphänotypisierung bei gesunden Kontrollpersonen.
- Untersuchung der altersabhängigen Veränderungen der LS bei Patienten mit CF und Normalpersonen.
- Direkter Vergleich der Lymphozytensubpopulationen zwischen den Patienten mit CF und der Kontrollgruppe
- Vergleich zwischen der histologischen Verteilung der Lymphozyten in der Lunge und den peripheren Veränderungen im Blut
- Vergleich der Unterschiede zwischen der CF-Gruppe und Kontrollgruppe sowie zwischen der Gruppe der rezidivierenden Infekte und der Kontrollgruppe.
- Diskussion eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem CFTR-Basisdefekt und den Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen.
- Analyse der Wirkung der LS-Veränderungen auf die Pathophysiologie bei CF.
- Untersuchung des Einfluss der veränderten Lymphozytensubpopulationen auf die Persistenz von *Pseudomonas aeruginosa* bei Mukoviszidose.
- Diskussion bestehender pathophysiologischer Konzepte der Mukoviszidose mit Hilfe der erarbeiteten Datenbasis.

**Tab. 1.1** Zielsetzung der durchgeführten Untersuchung

## 2. Patientengut, Material und Methoden

### 2.1. Patienten

Es wurden 56 Patienten mit CF (Alter: 1 Monat bis 36 Jahre, 26 weiblich), 23 Patienten mit rezidivierenden Luftwegsinfekten (Alter: 4 Monate bis 9 Jahre, 9 weiblich) und 83 gesunde Personen als Kontrollgruppe (Alter: 1 Monat bis 28 Jahre, 36 weiblich) untersucht.

Aus der Gesamtmenge der Messungen bei Patienten mit CF wurden 44 Messungen ausgewählt, bei denen nach Auswertung von klinischen Zeichen und Laborparametern (CRP < 15 mg/l) eine akute Exazerbation der Lungenerkrankung ausgeschlossen werden konnte. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten, die gleichzeitig Kortikosteroidtherapie (z.B. Decortin<sup>®</sup>, Pulmicort<sup>®</sup>) erhielten. Lagen bei einem Patienten mehrere Untersuchungen vor, wurde nach Anwendung der genannten Ausschlusskriterien die jeweils aktuellste Messung verwendet.

Bei den Personen der Kontrollgruppe handelte es sich um Freiwillige aus dem Klinik- und Laborpersonal oder um Patienten, die aufgrund einer Routineuntersuchung oder eines chirurgischen Elektiveingriffes die Kinderpoliklinik der RWTH-Aachen aufgesucht hatten. Keine der untersuchten Kontrollpersonen war in den letzten zwei Wochen vor der Blutentnahme an einem akuten Infekt erkrankt. Weitere Ausschlusskriterien waren jede Art von allergischen Erkrankungen, rezidivierende Infekte, Erkrankungen des Immunsystems, sowie akute oder chronische Medikamententherapie.

Die Gruppe der Patienten mit rezidivierenden Lungeninfekten (RI) diente als Vergleichsgruppe. Aufgenommen wurden 23 Kinder (Alter: 4 Monate bis 9 Jahre, 9 weiblich), die zur Abklärung ausgeprägter, rezidivierender Lungeninfekte die Kinderpoliklinik der RWTH-Aachen aufgesucht hatten. Ausschlusskriterien waren schwere, beziehungsweise primäre Erkrankungen des Immunsystems.

Die Zustimmung der Ethikkommission der RWTH-Aachen lag vor Beginn der Studie vor. Alle Patienten mit CF, alle Patienten mit rezidivierenden Infekten und alle Kontrollpersonen oder deren Eltern wurden über die Studie aufgeklärt. Die Blutentnahme erfolgte während einer Venenpunktion für Routineuntersuchung.

Für die histopathologische Untersuchung stand Lungengewebe von vier Patienten mit CF zur Verfügung:

Bei Patient Nummer 1 handelte es sich um ein sechs Monate altes Kind, das an Linksherzversagen infolge einer akuten Bronchopneumonie verstorben war. Von Patient Nummer 2, einem 20-jährigen Jungen mit CF und Bronchiolitis obliterans organisierter Pneumonie (BOOP) lag eine Lungenbiopsie vor. Die Patienten Nummer 3 und Nummer 4 waren zwölf und siebzehn Jahre alt. Ihnen war infolge einer schweren lebensbedrohlichen Erkrankung einer Lungenhälfte eine einseitige Pneumektomie durchgeführt worden.

Die technischen Grundlagen der Durchflußzytometrie, sowie die genaue Durchführung der Lymphozytenphänotypisierung und der Immunhistochemischen Färbung werden im folgenden näher erläutert.

## 2.2. Methoden

Es wurde 1ml Vollblut aus einer Venenpunktion entnommen (EDTA-Blutentnahmeröhrchen). Sofort nach Blutentnahme wurde eine automatische Bestimmung der Leukozytenzahl über einen Zählautomaten (Coulter®, MAXM) vorgenommen. Innerhalb der nächsten Stunden wurden der Färbeprogang und die Lymphozytenphänotypisierung durchgeführt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Blut bei Raumtemperatur gelagert.

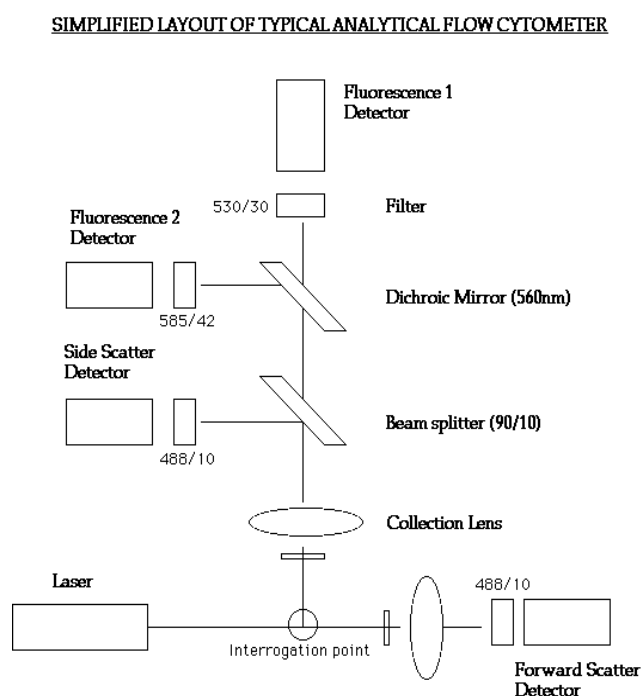
### 2.2.1. Durchflußzytometer

#### 2.2.1.1. Technische Grundlagen

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Differenzierung von Einzelzellen in Suspension. Dabei verwendet man eine Kombination physikalischer und immunologischer Messprinzipien: Im Laserlicht erfolgt die Zelltypisierung zum einen durch die Lichtstreuung und zum anderen durch die Mehrfarbenfluoreszenz nach Bindung Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper an Zelloberflächenmarker. Durch diese im folgenden näher beschriebenen Verfahren, kann jede einzelne Zelle anhand der Zellgröße, der Granularität und der Fluoreszenz eingeordnet werden .

Als Lichtstreuung definiert ist ein Prozess, bei dem ein Partikel mit einem einfallenden Lichtstrahl interagiert. Es kommt dabei zu einer Richtungsänderung des einfallenden Lichtes, die durch Zelleigenschaften, wie Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird. Als Lichtquelle dient ein blauer Argonlaser. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut: Der größte Teil geht in die Vorwärtsrichtung, also in Richtung des einfallenden Lichtstrahls. Er wird als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Licht gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht, side scatter, SSC) hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab (s. Abbildung 2.1.) .

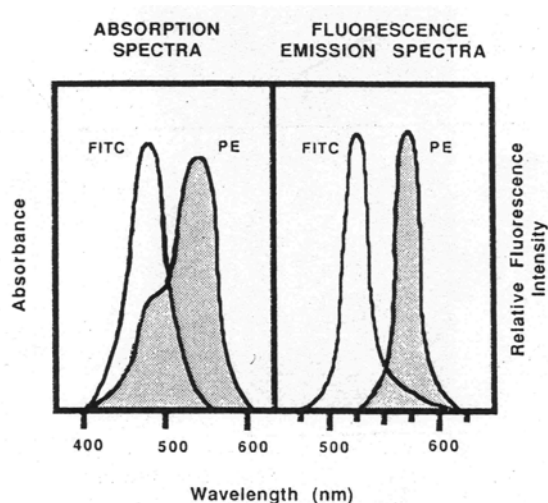
Unter Fluoreszenz versteht man das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum). Mit dieser Energie werden Elektronen in ein höheres Energieniveau



**Abb. 2.1** Schematische Darstellung des Aufbaus der optischen Messeinheit zur simultanen Messung von Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC), Fluoreszenz 1 (FITC) und Fluoreszenz 2 (PE)

gehoben. Beim Rückfall auf das Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon, welches schließlich von Detektoren (Photomultiplier) gemessen wird. Das abgestrahlte Licht ist langwelliger als das Anregungslicht und bildet das Emissionsspektrum.

Einmal angeregt, ist die Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes und damit auch zur Anzahl der Bindungsstellen auf dem Partikel. Die Bindung erfolgt mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Sie binden spezifisch an die Differenzierungsantigene („cluster of differentiation“, CD), d.h. an Zellmembranstrukturen, die von hämatopoetischen Zellen einer definierten Zellreihe in einem bestimmten Entwicklungsstadium exprimiert werden, und ermöglichen so eine Unterscheidung der Zellen.



**Abb. 2.2** Die Absorptions- und Emissionsspektren von FITC und PE im Wellenlängenvergleich

Der hier verwandte Durchflußzytometer (FACS-can<sup>®</sup>, Becton Dickinson) enthält einen luftgekühlten Argon-Ionenlaser, der Licht über eine Wellenlänge von 488 nm generiert. Die für die Zweifachfluoreszenz verwandten Farbstoffe FITC (Fluorescein-isothiocyanat, grün) und PE (Phycocerythrin, rotorange) haben beide ein Absorptionsmaximum in diesem Bereich. Die Gipfel ihrer Emissionsmaxima liegen aber davon getrennt (FITC: Emissionsmaximum ca. 515 nm, PE: ca. 580nm), so dass eine Unterscheidung möglich ist (s.a. Abbildung 2.2.).

Mit Hilfe von FACSCComp<sup>®</sup>-Software und CaliBRITE<sup>®</sup>-Beads wird vor der Messung die Instrumenteneinstellung justiert. Eine Justierung der Detektoren (Photomultiplier, PMT) muss erfolgen, da die durch den Laserstrahl angeregten Fluorochrome Licht in einem größeren Wellenbereich emittieren. Das emittierte Licht wird hauptsächlich über einem der drei Photomultiplier erfasst (primäre Signalerfassung), ein Teil des Signals wird aber auch von anderen Detektoren erkannt. Diese „Spektralüberlappung“ muss durch elektronische Kompensation korrigiert werden. Durch die CaliBRITE<sup>®</sup>-Beads, die aus unmarkierten Mikropartikeln, FITC-markierten und PE-markierten Mikropartikeln bestehen, wird eine geeignete Kompensationseinstellung ermittelt. Nach erfolgter Instrumenteneinstellung wird mit einer Multipartikelsuspension eine Empfindlichkeitsprüfung durchgeführt.

Zur Messung wird die in den Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension (siehe unten) durch Überdruck über eine Stahlkapillare in die Messküvette eingeführt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit („Sheath-fluid“ FACSFlow<sup>®</sup>, BD) stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Zellen in möglichst laminarer Strömung aneinandergereiht wie Perlen einer Perlenkette sequentiell den Analysepunkt erreichen (Hydrodynamische



Fokussierung). An dem Analysepunkt werden die Zellen in Sekundenbruchteilen durch die oben genannte Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz charakterisiert <sup>115</sup>.

### 2.2.1.2. Antikörper

Folgendes Antikörperpanel zur Untersuchung der einzelnen Zellen wurde eingesetzt:

	<b>Fluoreszenz CD (Kombination)</b>	<b>Klone</b>	<b>Bedeutung:</b>
<b>1</b>	FITC CD45 / PE CD14	2D1/MΦP9	LeukoGATE: Unterteilung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, sowie Zelltrümmern (Debris)
<b>2</b>	FITC $\gamma$ 1 / PE $\gamma$ 2	X40/X39	Negativkontrolle zur Festsetzung von Quadrantenmarkern und Bestimmung der nicht-antigenspezifischen Antikörperbindung (unspezifischen Färbung)
<b>3</b>	FITC CD3 / PE CD19	SK7/4G7	Unterscheidung von T- und B-Zellen.
<b>4</b>	FITC CD4 / PE CD8	SK3/SK1	Bestimmung der Helfer- / Inducer T-Lymphozyten und der Supressor- / Zytotoxischen T-Lymphozyten, sowie der Ratio CD4/CD8.
<b>5</b>	PE HLA-DR / FITC CD3	L243/SK7	Prozentualer Anteil der HLA-DR-Rezeptor tragenden reifen humanen aktivierten T-Lymphozyten.
<b>6</b>	FITC CD3 / PE CD25	SK7/2A3	Identifiziert aktivierte T-Zellen, die den IL2-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette) bilden.
<b>7</b>	FITC CD57 / PE CD8	HNK-1/SK1	Unterscheidung von CD57(+)/CD8(-) und CD57(+)/CD8(+).
<b>8</b>	FITC CD3 / PE CD16+CD56	SK1/B73.1,MY31	Identifizierung von T- und NK-Lymphozyten, sowie von T-Lymphozyten, die das CD16- und/oder das CD56-Antigen exprimieren.
<b>9</b>	FITC CD8 / PE CD11b	SK1/D12	Unterscheidung von Supressor-(CD8(+)/CD11b(+)) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8(+)/CD11b(-))

<b>10</b>	FITC CD19 / PE CD5	4F7/L17F12	Marker für B-Zellreifung
<b>11</b>	FITC CD45RA / PE CD4	L48/SK3	Ermittlung des Anteils der naiven, ruhenden T-Lymphozyten an den CD4(+) T-Lymphozyten.
<b>12</b>	FITC CD45RO / PE CD4	UCHL-1/SK3	Identifizierung des Anteils der Gedächtnis-T-Zellen an CD4(+) T-Lymphozyten

Außer FITC CD45RO (DAKO®) wurden alle verwendeten Antikörper von der Firma Becton-Dickinson® bezogen.

#### 2.2.1.3. Probenerstellung

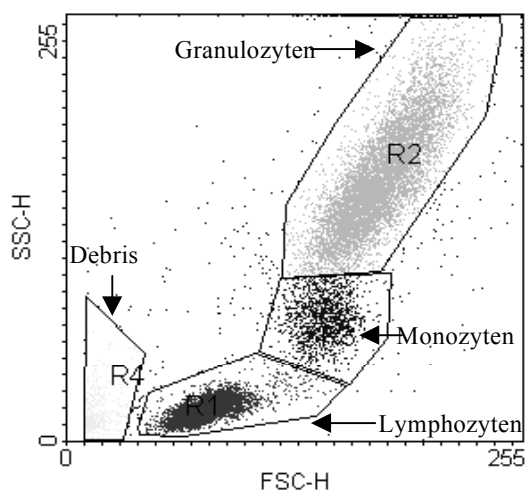
Zur Erstellung der Suspension wurden zunächst zwölf Röhrchen mit je 20µl Antikörperlösung in der im Panel genannten Reihenfolge gefüllt. 100 µl gut gemischtes Blut wurden hinzugefügt und das Gemisch zur Bindung der Antikörper 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden zur Lyse der Erythrozyten pro Röhrchen 2ml FACS Lysing Solution® (BD) in der Konzentration 1:10 mit aqua-bidest hinzugefügt. Diese Lösung enthält weniger als 50% Diethylenglykol und weniger als 15% Formaldehyd. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 10 min wurde mit 300G (1300 Umdrehungen) 10 min zentrifugiert (Megafuge® 1.0 Heraeus). Nach Abkippen des Überstandes, wurden 2 ml PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pro Röhrchen beigefügt und die Zellsuspension ein zweites Mal bei 300G 10 min zentrifugiert (Waschvorgang). Anschließend wurde der Überstand wieder abgekippt und die gewaschenen Leukozyten in 0.4ml PBS wieder in Lösung gebracht.

#### 2.2.1.4. Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte über die dem Durchflußzytometer angeschlossene Datenauswerteeinheit mit der halbautomatischen SimulSET®-Software (v 3.1). Die Daten des Patienten oder der Kontrollperson, die Anzahl der Leukozyten pro µl, sowie der prozentuale Anteil der Lymphozyten, ermittelt aus einem Differentialblutbild, wurden manuell eingetragen. Das Ergebnis jeder einzelnen Probe wurde in einer graphischen Zweiparameterdarstellung ausgegeben, wobei jeweils zwei Parameter, z.B. die beiden Fluoreszenzen, miteinander korreliert wurden. Dabei wurden die Intensitätsachsen der beiden Parameter gegeneinander aufgetragen, so dass eine gemessene Zelle als ein Punkt dargestellt wurde, dessen Lokalisation in der Darstellung von den Eigenschaften der Zelle bezüglich der beiden Parameter abhing (Dot Plot).

Außerdem berechnete die Software automatisch jede erfaßte Subpopulation als prozentualen Lymphozytenanteil, bezogen auf den prozentualen Anteil von Lymphozyten im Analysefensters, das mit dem LeucoGATE-Röhrchen ermittelt wurde. Nach Eingabe der Leukozytenzahl und des prozentualen

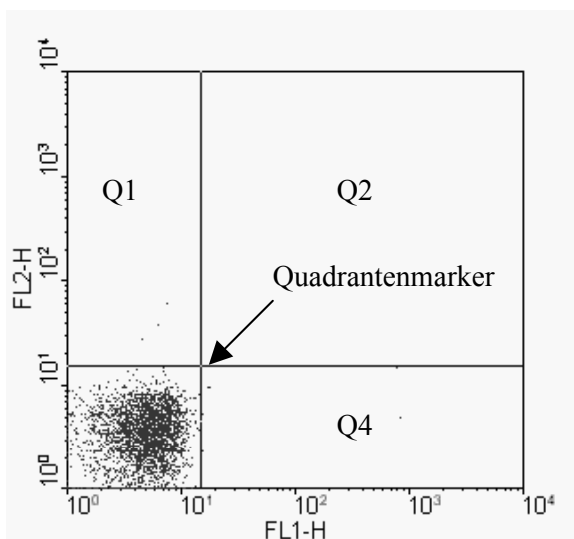
Lymphozytenanteils aus einem Differentialblutbild war ergänzend die Berechnung der absoluten Zellzahl (Z/ $\mu$ l) für jede Subpopulation möglich.



**Abb. 2.3** LeukoGATE zur Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten

Durch CD45/CD14 (LeucoGATE) erfolgte nach Zählung von 15000 Events die Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Durch die Software wurde daraus automatisch ein Lymphozytenanalysefenster erstellt (Gating), das mindestens 98% der normalen reifen Lymphozyten der Probe einschließen musste. Bei den Messungen der weiteren Proben wurden nur noch die im Gate erfassten Lymphozyten analysiert (s. Abbildung 2.3).

Die Antikörper in der negativen Kontrolle (Röhrchen 2) sind spezifisch gegen Antigene gerichtet, die auf humanen Leukozyten nicht vorkommen. Sie dienen zum einen dazu, Quadrantenmarker (Fluoreszenz 1, Fluoreszenz 2) um die ungefärbten Lymphozytenpopulationen zu setzen und zum anderen dazu, das Ausmaß der nicht-antigenspezifischen Antikörperbindung (unspezifischen Färbung) abzuschätzen.



**Abb. 2.4** Negativkontrolle zur Beurteilung der unspezifischen Färbung

Die Quadrantenmarker teilten die Grafik in vier Quadranten ein (Q1-4). Sie wurden automatisch in die Auswertung der weiteren Proben übernommen. Jede Position der Marker wurde während der Messung kontrolliert und bei Bedarf verändert (s. Abbildung 2.4).

Mit Hilfe der vier Quadranten konnte eine genaue quadrantenspezifische Auswertung durchgeführt werden. Diese enthielt die prozentuale Angabe der Subpopulationen pro Lymphozyten sowie die Absolutzahl der Zellen pro  $\mu$ l. Dadurch war es möglich, eine noch detaillierte Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen vorzunehmen.

Alle zwölf Analyseröhrchen wurden in festgelegter Reihenfolge und nach dem genannten Schema gemessen. Die am Ende der Auswertung angegebene Summe der relativen T- (CD3), B- (CD19) und NK- (CD16/CD56) betrug  $100 \pm 5\%$ .

### 2.2.2. Histopathologie

Die 4µm dicken Paraffin-Blöcke des Lungengewebes wurden mit Hämatoxylin-Eosin, Elastica van Gieson und einer Immunfärbung gefärbt. Der Vorgang der einzelnen Färbungen wird im folgenden erläutert:

#### 2.2.2.1. HE-Färbung

Vor dem Färbevorgang wurde eine Hämalaun-Lösung nach folgendem Schema angesetzt: 1,0g Hämatoxylin wurden mit 0,2g Natriumjodat und 500ml Aqua destillata gemischt. Nach einer Inkubation über 24 Stunden wurden der Mischung 50g Kaliumaluminiumsulfat, 50g Chloralhydrat, 1g Citronensäure sowie 500 ml Aqua destillata hinzugefügt. Nach 10 Tagen Inkubation war die Lösung gebrauchsfertig.

Die entparaffinierten Schnitte wurde 10 Minuten in dieser Hämalaunlösung gefärbt. Nach dem Abspülen mit Wasser und einer 10-minütigen Übergangsperiode, in der die Schnitte bläuen konnten, erfolgte eine weitere Färbung für die Dauer von 5 Minuten in 1%iger wässriger Eosinlösung, der fünf Tropfen Eisessig zugesetzt worden waren. Nach zweimaligem Abspülen mit Aqua destillata erfolgte die Differenzierung und Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe: Kurzes Tauchbad in 70%igem Alkohol, 30 Sekunden Tauchbad in 96%igem Alkohol, dreimaliges Tauchbad über mindestens 2 Minuten in absolutem Alkohol.

#### 2.2.2.2. Elastica-van-Gieson Färbung

Zunächst wurden die Schnitte für 20 Minuten bei 65°C in Resorcin-Fuchsin-Lösung gefärbt. Nach dem Abspülen mit Aqua destillata erfolgte die Differenzierung in 80%igem Alkohol. Nach einem doppelten Abspülen mit Aqua destillata wurde die 10-minütige Kernfärbung in Weigert's Eisenhämatoxylin durchgeführt. Diese Lösung mußte vor dem Färben aus 10g Hämatoxylin und 1000ml 96%igem Alkohol (Lösung A), sowie 40ml 29%ige Eisen-III-chlorid-Lösung, 950 ml Aqua destillata und 7,5 ml konzentrierte Salzsäure (Lösung B) erstellt werden. Es erfolgte anschließend Abspülen mit Aqua destillata, eine dreifache Spülung mit HCl-Alkohol (=1000 ml 70%iger Alkohol plus 10 ml konzentrierte HCl) und eine doppelte Spülung mit Aqua destillata. Die folgenden 10 Minuten im Wasserbad wurden zum Bläuen des Präparates genutzt. Danach erfolgte für 3 Minuten eine weitere Färbung mit Pikrofuchsinlösung (= 400 ml kalt gesättigte, wässrige filtrierte Pikrinsäure plus 30 ml 1%ige wässrige Säurefuchsinlösung). Nach dem Abspülen mit Aqua destillata wurde das Präparat in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem, 96%igem und absolutem Alkohol differenziert und entwässert.

#### 2.2.2.3. Immunfärbung

Gefärbt wurde nach dem Routineprotokoll für die indirekte Peroxidase-Methode mit DAB als Chromogen:

Nach Entparaffinisierung und Hydratisierung der Schnitte wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch 10-minütige Inkubation mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Nach Spülung mit Puffer erfolgte die Inkubation der Schnitte mit verdünntem Normalserum über 20 Minuten bei Raumtemperatur. Dann die Inkubation mit dem Primärantikörper. Danach wurde mit Puffer zweimal gespült und die Schnitte mit biotinylierten Zweitantikörpern 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hier-

nach fand wieder ein doppelter Spülvorgang mit Puffer statt. Dann erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Vectastain ABC-Peroxidase-Komplex bei Raumtemperatur. Nach einem dreimaligen Spülen mit Puffer wurde mit dem Peroxidase-Substrat/DAB über 10 Minuten inkubiert. Es erfolgte eine Spülung mit Wasser über 5 Minuten sowie eine Fixierung. Schnitte aus hyperplastischen Tonsillen dienten als negative oder positive Kontrollen.

Die folgenden Antikörper (alle von der Firma DAKO®) wurden benutzt:

	Fluoreszenz CD (Kombination)	Klon	Gefärbte Zellpopulation
1	CD 68	M814	Monozyten
2	CD20	M755	B-Zellen
3	CD4	MT310	T-Helfer-Zellen, Monozyten
4	CD8	M7103	Supressorische/zytotoxische T-Zellen
5	CD56	MOC-1	NK-Zellen
6	CD45RA	4KB5	Naive T-Zellen, ruhende B-Zellen
7	CD45RO	UCHL-1	Gedächtnis-T-Zellen

### 2.2.3. Mikrobiologie

Bei jedem der Patienten mit CF wurde ein tiefer Rachenabstrich entnommen und im mikrobiologischen Labor auf die Präsenz von *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* hin untersucht. Angegeben wurde jeweils nur das Vorhandensein der Bakterien; eine Mengendifferenzierung wurde nicht vorgenommen.

### 2.2.4. Auswertung und Statistik

Die erhaltenen Daten der Lymphozytenphänotypisierung und der mikrobiologischen Untersuchungen wurden zusammen mit den weiteren Daten der Patienten und der Normalpersonen (Geburtsdatum, Alter, Größe und Körpergewicht) in einer EXCEL®-Datentabelle zusammengestellt. Es wurden vier verschiedenen Altersgruppen gebildet:

- Altersgruppe I: 1 Monat bis 3 Jahre;
- Altersgruppe II: 4-9 Jahre,
- Altersgruppe III: 10-15 Jahre;
- Altersgruppe IV: älter als 16 Jahre.

Die Einteilung der Altersgruppen wurde zwecks besserer Vergleichbarkeit an frühere Arbeiten zu Untersuchungen der Lymphozytensubpopulationen angepasst.

44 Patienten mit CF wurden ausgewertet. Aufgrund des im Untersuchungszeitraum geänderten Antikörperpanels lagen für CD3/CD16CD56 von 41, für CD8/CD11b von 42, für CD19/CD5 von 36 und für CD45 RO/RA von 37 Patienten Daten vor.

Die 23 Patienten der RI-Gruppe konnte vollständig ausgewertet werden. Allerdings erfolgte hier nur eine Datenerhebung in den ersten beiden Altersgruppen (1 Monat – 9 Jahre).

In der Kontrollgruppe wurden insgesamt 83 Personen ausgewertet, wobei bei CD45Ra und CD45Ro nur 81 Personen untersucht werden konnten.

Für alle anderen Subpopulationen ergab sich folgende Verteilung in den Altersgruppen:

<b>Altersgruppe</b>	<b>CF:</b>	<b>Rezidivierende Infekte</b>	<b>Normal:</b>
AG I	n= 6	n= 14	n= 17
AG II	n= 8	n= 9	n= 21
AG III	n= 12		n= 19
AG IV	n= 18		n= 26

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS-Software. Durchgeführt wurden der zweiseitige Mann-Whitney U Test, der Wilcoxon Test und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman.

Zunächst wurde eine „over-all“-Analyse mit einer Signifikanzgrenze von  $p < 0,001$  erstellt. Zu diesem Zweck wurden die Daten der Gruppen ohne Beachtung der Altersgruppen gebündelt und miteinander verglichen. Dieser Test diente dazu, die grundlegenden signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit ausreichender Sicherheit zu erfassen. Da in diesem Test keine Differenzierung in Altersgruppen erfolgt war, konnten altersabhängige Veränderungen nicht erkannt werden.

Da altersabhängige Veränderungen der LS aber schon bekannt sind, wurde zur Beurteilung dieser Veränderungen weiterhin ein Vergleich der CF-, RI- und Kontrollgruppe, jeweils aufgeteilt in die verschiedenen Altersgruppen, durchgeführt. Als Signifikanzgrenzen wurde früheren Arbeiten entsprechend  $p < 0,05$  (5%) und  $p < 0,03$  (3%) festgelegt. Die erhaltenen Ergebnisse konnten aber aufgrund eines hohen Fehlers 1. Grades bei vielen verschiedenen abhängigen Variablen und einer geringen Populationsgröße nur als Tendenz gewertet werden. Daher sollen sie in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich deskriptiven Charakter haben und als plausible Möglichkeit mit in die Diskussion einbezogen werden. Eine Untersuchung der altersabhängigen Veränderungen der LS mit Hilfe einer größeren Population wird empfohlen.

Die Ergebnisse der Histopathologie wurden wegen der kleinen Patientenzahl nicht statistisch ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Lymphozytenphänotypisierung

##### 3.1.1. Altersunabhängiger Vergleich

Der altersunabhängige Vergleich mit Hilfe einer „over-all“-Statistik zeigte eine deutliche Abnahme der CD8(+)-Zellen, der CD4CD45RO(+)-Memory-Zellen, der IL2-R(+)-Zellen und der CD16(+)/CD56(+)-NK-Zellen. Für die CD3(+)-T-Zellen pro Lymphozyten hingegen wurde bei den Patienten mit CF ein erhöhter Wert beobachtet. Alle weiteren Lymphozytensubpopulationen ergaben in dieser Statistik im Vergleich mit den Kontrollpersonen keine signifikanten Unterschiede. Eine Übersicht der Ergebnisse der „over-all“-Statistik zeigt Tabelle 3.1:

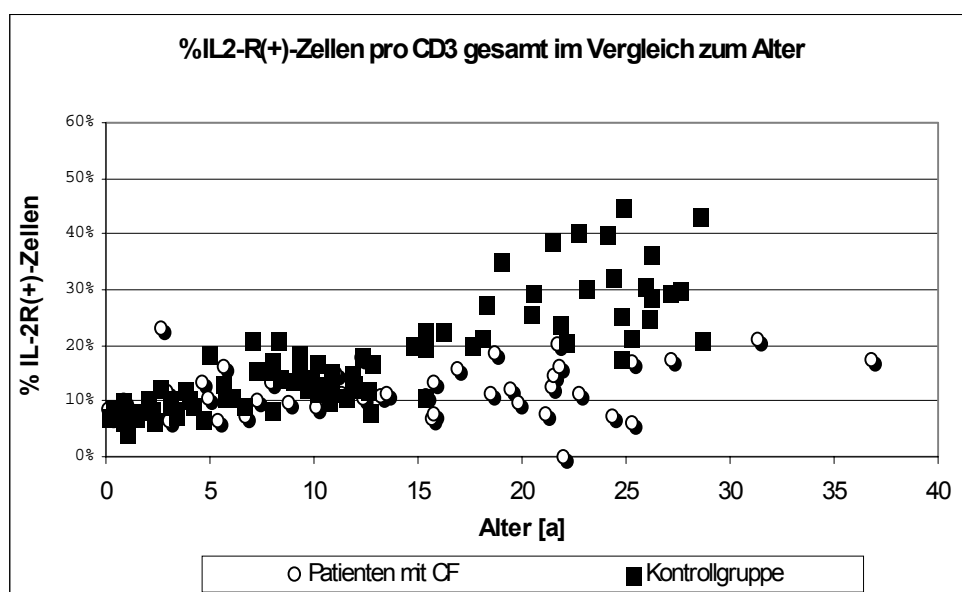
Zellpopulation	Alle Patienten mit CF	Alle Kontrollen	Signifikante Unterschiede
	Alter: 1 Mo. – 36 Jahre. (n = 44)	Alter: 1 Mo. – 29 Jahre (n = 83)	
Leukozyten x 10 <sup>-3</sup> /μl	6,3 (4,9-7,9)	6,7 (5,4-8,7)	
Lymphozyten x 10 <sup>-3</sup> /μl	1,9 (1,4-2,4)	2,5 (1,8-3,3)	
CD3+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	1,5 (1,1-1,8)	1,8 (1,3-2,6)	
% CD3+ in Lymph.	76 (69-81)	69 (65-74)	<b>P&lt;0,001</b>
% HLADR+ in CD3+	9 (6-11)	8 (6-12)	
% CD25+ in CD3 gesamt	11 (9-16)	15 (11-23)	
CD25+CD25 x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,19 (0,14-0,24)	0,3 (0,23-0,36)	<b>P&lt;0,001</b>
CD19+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,28 (0,19-0,41)	0,38 (0,26-0,74)	
% CD19+ in Lymph.	15 (12-18)	17 (13-21)	
% CD16+56+ in Lymph.	9 (6-13)	12 (9-15)	
CD16+56+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,15 (0,11-0,27)	0,3 (0,23-0,39)	<b>P&lt;0,001</b>
Ratio CD4/CD8	1,5 (1,1-2)	1,2 (1-1,5)	
CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,6 (0,4-0,8)	0,9 (0,6-1,2)	<b>P&lt;0,001</b>
% CD8+ in Lymph.	29 (24-36)	33 (28-38)	
Ratio CD8+11-/CD8+11+	3,5 (2,3-5,9)	3 (2-4,4)	
CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,9 (0,5-1,1)	1 (0,7-1,4)	
% CD4+ in Lymph.	44 (38-50)	40 (35-46)	
CD45RA+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,6 (0,3-0,8)	0,7 (0,4 -1,1)	
% CD45RA+ in CD4+	63 (56-73)	60 (51-69)	
C45RO+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	0,4 (0,3-0,5)	0,7 (0,5-1)	<b>P&lt;0,001</b>
% C45RO+ in CD4+	49 (37-57)	57 (45-67)	

Tab 3.1 Ergebnis der altersunabhängigen Auswertung. Daten als dargestellt als Median und 25%/75% Perzentilen.

### 3.1.2. Altersabhängiger Vergleich

Zusätzlich wurden alle Lymphozytensubpopulationen bezüglich der altersabhängigen Veränderungen und bezüglich der Unterschiede zwischen der Gruppe der Patienten mit CF, der Kontrollgruppe und der Gruppe der rezidivierenden Infekte untersucht.

Zunächst ergab sich, dass die Unterschiede mit dem Alter der Patienten kontinuierlich zunahmten, so dass ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der LS und dem Krankheitsverlauf vermutet werden kann. Abbildung 3.1 zeigt dies am Beispiel der IL-2-positiven Zellen im Bezug zum zunehmenden Alter.



**Abb.3.1** Entwicklung der IL-2(+)-Zellen bei zunehmendem Alter. Ein Vergleich der CF-Patienten mit den Kontrollpersonen.

Besonders auffallende signifikante Unterschiede im Vergleich der Patienten mit CF mit den gesunden Kontrollpersonen zeigten die folgenden Subpopulationen:

Die CD4(+)CD45RO(+)-Memory-Zellen pro  $\mu$ l zeigten in den Altersgruppen I, II und IV eine deutliche Erniedrigung. Der Anteil der CD45RO(+)-Zellen an der Gesamtzahl der CD4-Zellen war in den Altersgruppen II und IV erniedrigt. Parallel war der Anteil der CD45RA(+)-Zellen innerhalb der CD4-Zellen in den Altersgruppen III und IV erhöht.

Auch die den IL-2-Rezeptor exprimierenden CD3(+)-Zellen waren in den Altersgruppen III und IV signifikant erniedrigt. Gleiches wurde für die Absolutzahl der CD3(+)CD25(+)-Zellen pro  $\mu$ l in den Altersgruppen II und IV beobachtet.

Weiterhin vermindert waren die CD16(+)CD56(+)-NK-Zellen/ $\mu$ l in den Altersgruppen II, III und IV. Ebenso waren sowohl der relative Anteil als auch die Absolutzahl der CD3(+)CD16(+)CD56(+)-Zellen in diesen Altersgruppen signifikant vermindert.



Die CD4(+)-Zellen pro Lymphozyten waren in den Altersgruppen II und III gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. In den Altersgruppen II und III war außerdem eine erhöhte CD4/CD8-Ratio beobachtet worden. Bei den Patienten älter als 16 Jahre dagegen war die Ratio dieser Zellen wieder im Normbereich, wohingegen die Absolutzahl der CD4(+) und CD8(+)-Zellen erniedrigt war.

Der überwiegende Teil der signifikanten Unterschiede ließ sich bei den Patienten älter als 16 Jahre (Altersgruppe IV) beobachten.

Im folgenden werden die Ergebnisse des altersabhängigen Vergleiches für jede Subpopulation sowohl als Tabelle, als auch in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Im Diagramm ist für jede Altersgruppe der Median, sowie die 25%- und 75%-Perzentilen abgebildet. Im begleitenden Text werden nur signifikante Veränderungen oder Unterschiede beschrieben.

### 3.1.2.1. Leukozyten

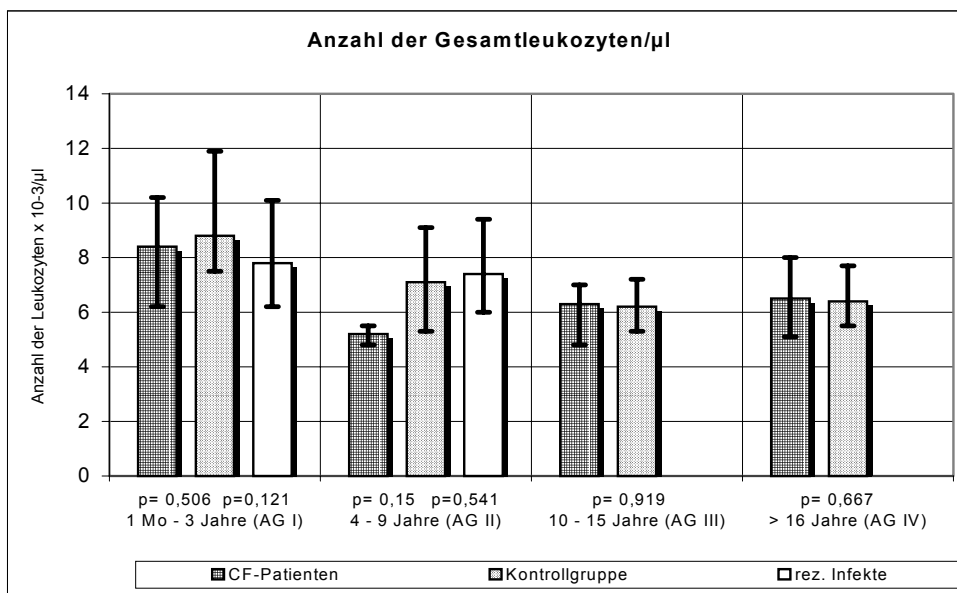
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
Leukozyten x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	8,4 (6,2-10,2)	5,2 (4,8-5,5)	6,3 (4,8-7,0)	6,5 (,1-8)	0,161
Leukozyten x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	8,8 (7,5-11,9)	7,1 (5,3-9,1)	6,2 (5,3-7,2)	6,4 (5,5-7,7)	0,001
Leukozyten x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	7,8 (6,2-10,1)	7,4 (6-9,4)	-	-	
Vergleich CF/N		0,506	0,15	0,919	0,667	
Vergleich RI/N		0,121	0,541	-	-	

#### Altersabhängige Veränderungen:

Bei den gesunden Kontrollpersonen findet sich eine altersabhängige Abnahme der Leukozytenabsolutzahl.

#### Signifikante Veränderungen der Leukozyten

Weder im Vergleich der Kontrollgruppe mit der CF-Gruppe, noch im Vergleich mit der RI-Gruppe lässt sich ein Unterschied feststellen.



### 3.1.2.2. Lymphozyten

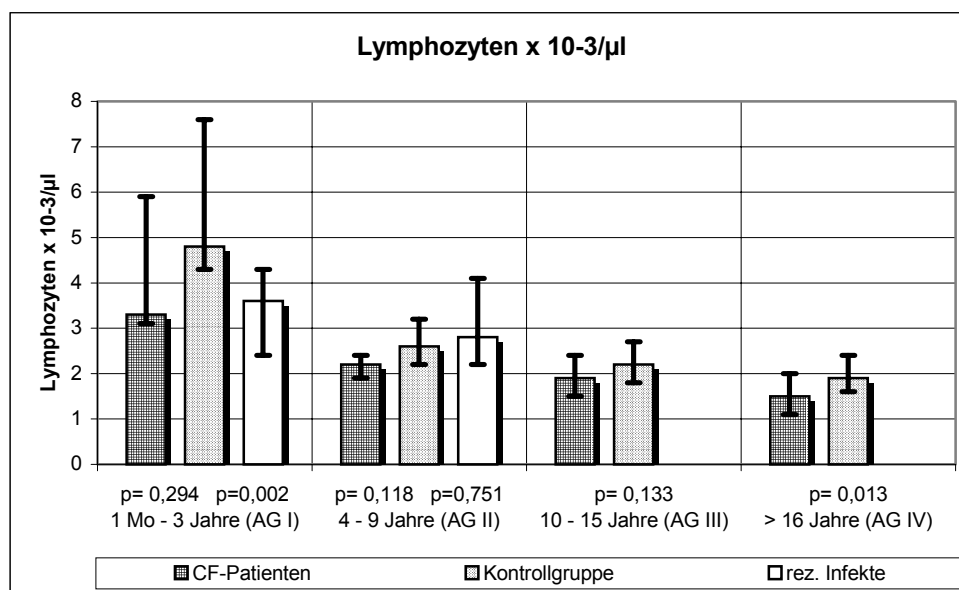
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
Lymphozyten x 10 <sup>3</sup> /µl	CF	3,3 (3,1-5,9)	2,2 (1,9-2,4)	1,9 (1,5-2,4)	1,5 (1,1-2)	0,004
Lymphozyten x 10 <sup>3</sup> /µl	N	4,8 (4,3-7,6)	2,6 (2,2-3,2)	2,2 (1,8-2,7)	1,9 (1,6-2,4)	0
Lymphozyten x 10 <sup>3</sup> /µl	RI	3,6 (2,4-4,3)	2,8 (2,2-4,1)	-	-	
Vergleich CF/N		0,294	0,118	0,133	0,013	
Vergleich RI/N		0,002	0,751	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%Lymphozyten/Leuk.	CF	46 (38-54)	41 (38,5-45,5)	34 (26,75-35,75)	26,5 (19-30)	0
%Lymphozyten/Leuk.	N	61 (48,25-64,25)	40 (29,75-43,5)	35 (31-42)	31 (27-37)	0
%Lymphozyten/Leuk.	RI	41 (31,5-51,75)	38 (30-47)	-	-	
Vergleich CF/N		0,032	0,494	0,201	0,003	
Vergleich RI/N		0,001	0,454	-	-	

#### Altersabhängige Veränderungen:

Die Absolutzahlen der Lymphozyten und der relative Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten zeigen sowohl bei den Patienten mit CF, als auch bei der Kontrollgruppe eine altersabhängige Abnahme.

#### Signifikante Veränderungen der Lymphozyten pro µl

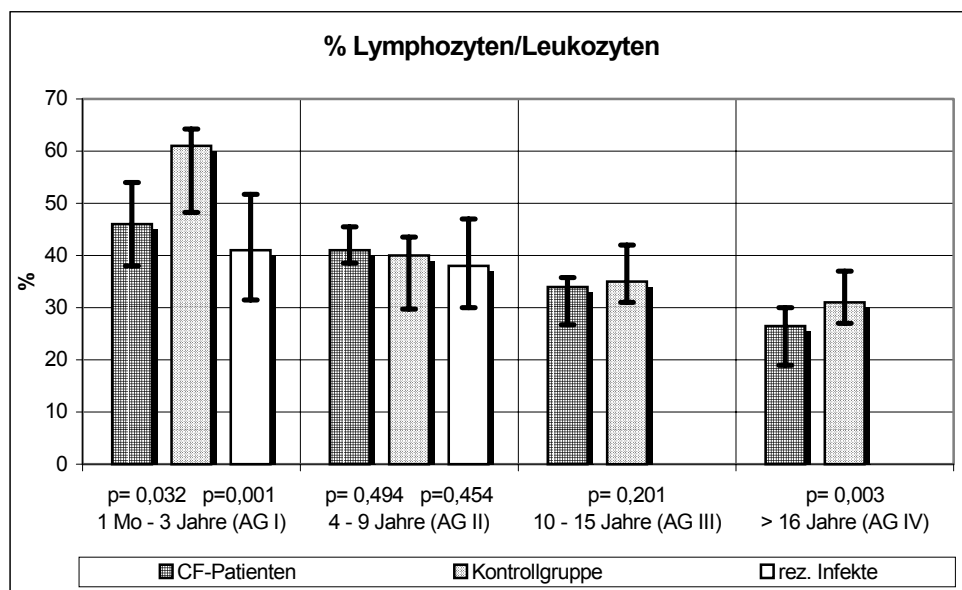
Nur in der Altersgruppe IV sind die Lymphozyten pro µl bei den Patienten mit CF gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Bei der RI-Gruppe sind diese Zellen in der Altersgruppe I vermindert.



#### Signifikante Veränderungen der Lymphozyten pro Leukozyten

Beim prozentualen Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten zeigt sich im Vergleich CF/Normal bei den Patienten mit CF der Altersgruppe I und Altersgruppe IV ein kleinerer Wert.

In der RI-Gruppe sind diese Zellen nur in Altersgruppe I gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt.



### 3.1.2.3. T-Lymphozyten (CD3):

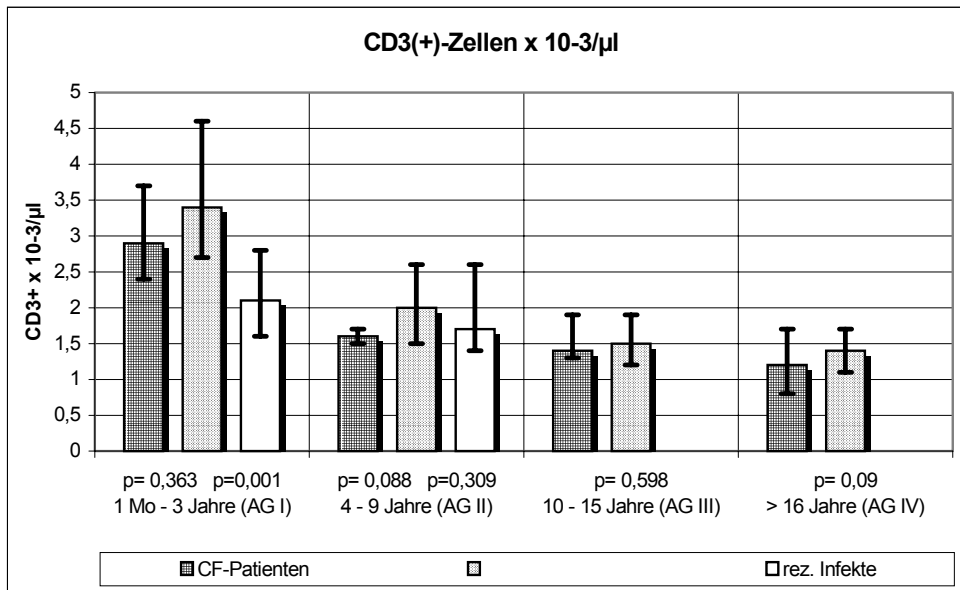
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD3+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	CF	2,9 (2,4-3,7)	1,6 (1,5-1,7)	1,4 (1,3-1,9)	1,2 (0,8-1,7)	0,015
CD3+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	N	3,4 (2,7-4,6)	2 (1,5-2,6)	1,5 (1,2-1,9)	1,4 (1,1-1,7)	0
CD3+ x 10 <sup>-3</sup> /μl	RI	2,1 (1,6-2,8)	1,7 (1,4-2,6)	-	-	
Vergleich CF/N		0,363	0,088	0,598	0,09	
Vergleich RI/N		0,001	0,309	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
% CD3+ in Lymphozyten	CF	76 (61-81)	74 (66-79)	77 (66-84)	76 (70-81)	0,774
% CD3+ in Lymphozyten	N	67 (63-74)	68 (65-73)	69 (68-74)	71 (66-77)	0,336
% CD3+ in Lymphozyten	RI	64 (54-67)	65 (60-70)	-	-	
Vergleich CF/N		0,195	0,293	0,064	0,024	
Vergleich RI/N		0,107	0,286	-	-	

#### Altersabhängige Veränderungen:

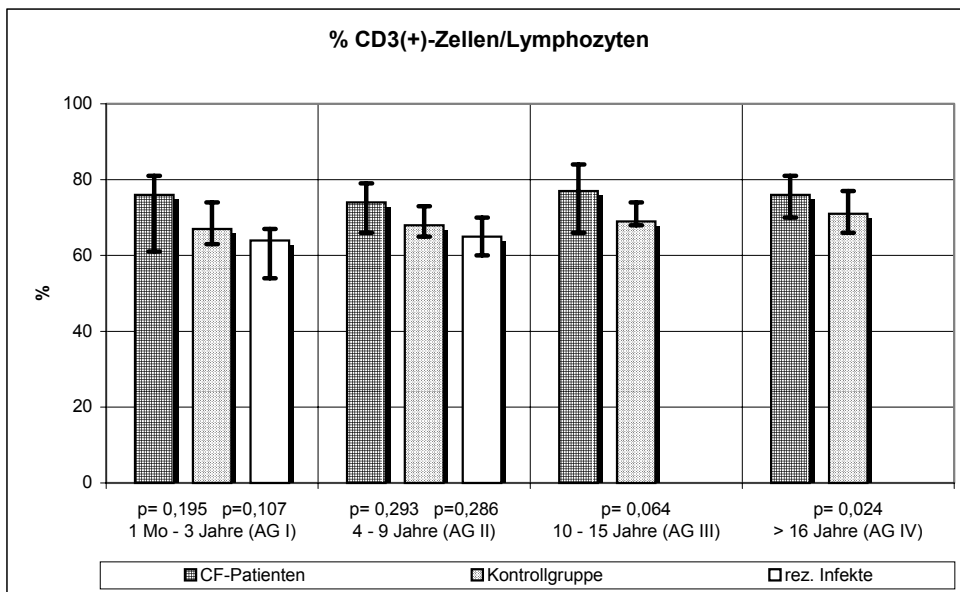
Nur die Absolutzahlen der T-Lymphozyten sowohl in der Gruppe der Patienten mit CF, als auch in der Kontrollgruppe zeigen eine altersabhängige Abnahme.

#### Signifikante Veränderungen der CD3-positiven Zellen pro μl

Bei den absoluten T-Zellen ist nur bei den Patienten mit CF ab 16 Jahren (Altersgruppe IV) ein verminderter Wert erkennbar. In der Gruppe der rezidivierenden Infekte sind die absoluten Lymphozyten in der Altersgruppe I erniedrigt.



Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD3-positiven Zellen an den Lymphozyten  
 Bei den relativen T-Zellen ist in der Altersgruppe IV der Wert der CF-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.



## 3.1.2.4. B-Zellen (CD19):

Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD19+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	0,4 (0,2-1,3)	0,4 (0,3-0,6)	0,3 (0,2-0,5)	0,2 (0,2-0,3)	0,04
CD19+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	1,2 (1-1,9)	0,5 (0,3-0,7)	0,4 (0,3-0,5)	0,2 (0,2-0,3)	0
CD19+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	1 (0,7-1,2)	0,8 (0,5-1,1)	-	-	
Vergleich CF/N		0,08	0,329	0,274	0,055	
Vergleich RI/N		0,037	0,455	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
% CD19+ in Lymphozyten	CF	14 (10-22)	16 (14-26)	14 (8-26)	14 (10-16)	0,416
% CD19+ in Lymphozyten	N	24 (20-27)	18 (15-22)	17 (13-19)	12 (10-16)	0
% CD19+ in Lymphozyten	RI	27 (23-40)	26 (21-30)	-	-	
Vergleich CF/N		0,027	0,769	0,516	0,692	
Vergleich RI/N		0,044	0,123	-	-	

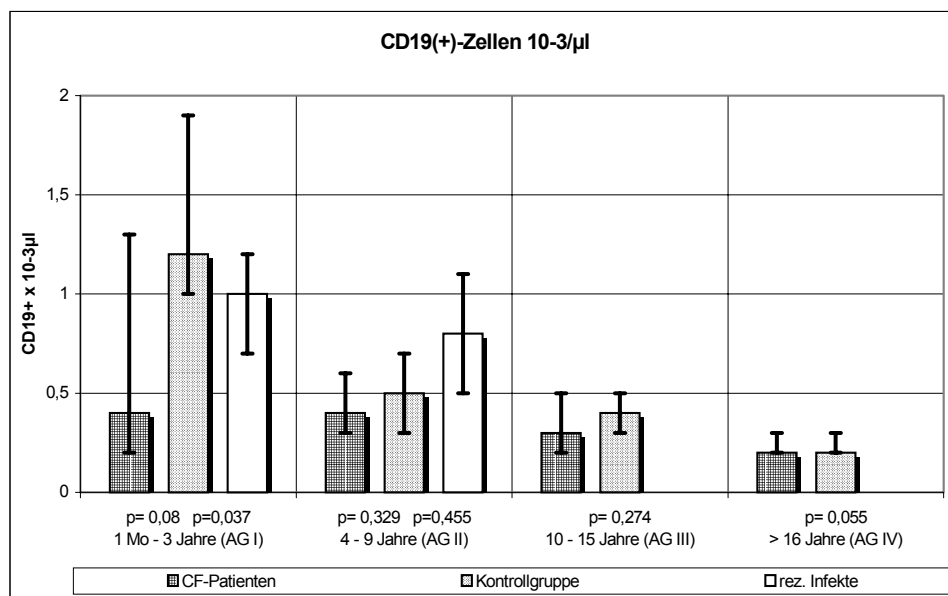
*Altersabhängige Veränderungen:*

Bei den B-Zellen/µl zeigt sich sowohl in der CF- als auch in der Kontrollgruppe eine altersabhängige Abnahme.

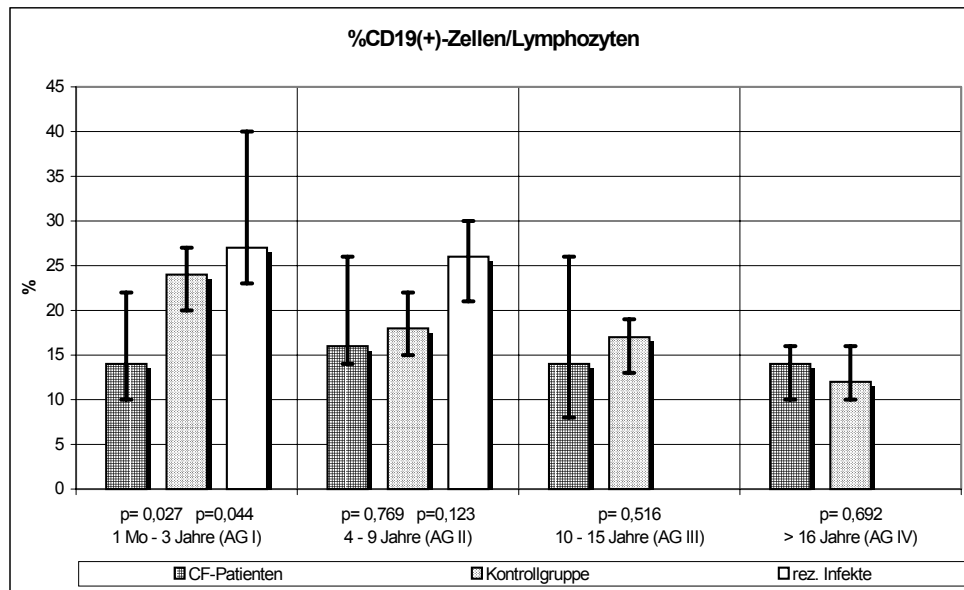
Die CD19(+)-Zellen pro Lymphozyten dagegen zeigen nur in der Kontrollgruppe eine altersabhängige Abnahme.

*Signifikante Veränderungen der Absolutzahl der CD19-positiven Zellen pro µl*

In der Altersgruppe I sind die absoluten CD19(+)-B-Zellen bei der RI-Gruppe erniedrigt.

*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD19-positiven Zellen an den Lymphozyten*

Bei den CD19 positiven Zellen pro Lymphozyten erkennt man in der Altersgruppe I der CF-Patientengruppe einen verminderten Wert und in der RI-Gruppe einen erhöhten Wert.



### 3.1.2.5. CD5(+)-Zellen in CD19(+)-Zellen:

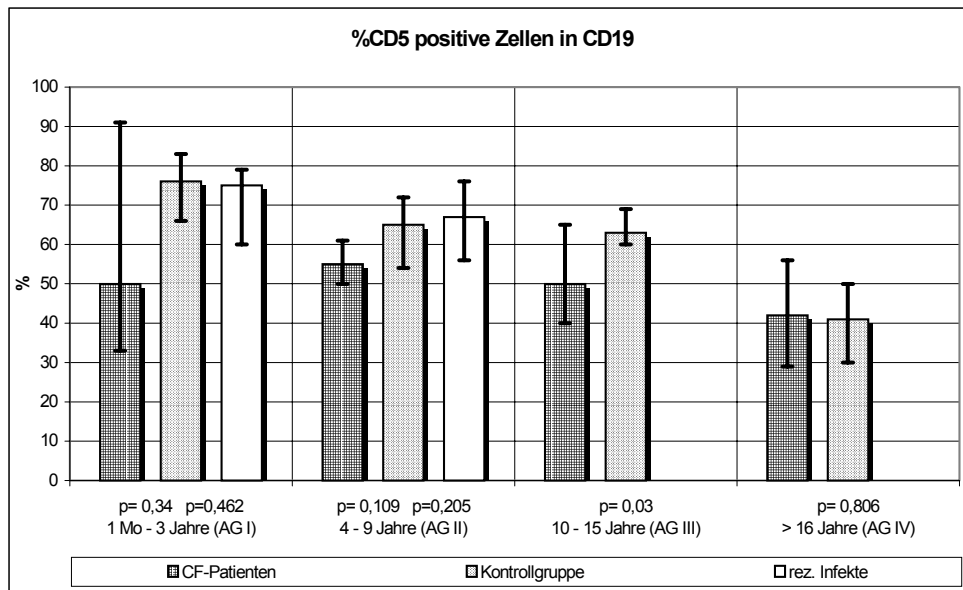
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD5+ in CD19+ gesamt	CF	50 (33-91)	55 (50-61)	50 (40-65)	42 (29-56)	0,114
%CD5+ in CD19+ gesamt	N	76 (66-83)	65 (54-72)	63 (60-69)	41 (30-50)	0
%CD5+ in CD19+ gesamt	RI	75 (60-79)	67 (56-76)	-	-	
Vergleich CF/N		0,34	0,109	0,03	0,806	
Vergleich RI/N		0,462	0,205	-	-	

#### Altersabhängige Veränderungen:

Die Kontrollgruppe weist eine altersabhängige Abnahme des prozentualen Anteils der CD5 positiven Zellen an den B-Zellen auf

#### Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD5-positiven Zellen an CD19-gesamt

In der Altersgruppe III der Patienten mit CF findet sich eine verminderte Anzahl der CD5 positiven Zellen in den B-Zellen.





## 3.1.2.6. Helferzellen, Suppressor/Zytotoxische Zellen, CD4/CD8 Ratio:

Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl I	CF	2,1 (1,7-2,2)	1 (0,9-1,1)	0,8 (0,6-1)	0,6 (0,5-0,9)	0,004
CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	2,4 (1,7-3,2)	1,1 (0,8-1,4)	0,8 (0,6-1)	0,9 (0,7-1,1)	0
CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	1,2 (1-1,9)	1,1 (0,9-1,7)	-	-	
Vergleich CF/N		0,441	0,354	0,715	0,005	
Vergleich RI/N		0,001	0,402	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD4+ in LY	CF	51 (46-64)	46 (40-51)	42 (36-45)	44 (34-50)	0,264
%CD4+ in LY	N	41 (40-50)	37 (35-39)	34 (31-40)	46 (41-48)	0
%CD4+ in LY	RI	38 (32-46)	37 (33-47)	-	-	
Vergleich CF/N		0,159	0,017	0,017	0,667	
Vergleich RI/N		0,067	0,401	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	0,9 (0,6-1,9)	0,6 (0,5-0,7)	0,7 (0,4-0,8)	0,4 (0,4-0,6)	0,1
CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	1,2 (1-1,7)	0,9 (0,7-1,2)	0,8 (0,6-1)	0,6 (0,5-0,9)	0
CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	0,9 (0,5-1,2)	0,7 (0,5-1,2)	-	-	
Vergleich CF/N		0,141	0,051	0,1	0,006	
Vergleich RI/N		0,010	0,081	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD8+ in LY	CF	27 (23-31)	26 (22-33)	30 (25-36)	34 (27-39)	0,28
%CD8+ in LY	N	26 (21-28)	35 (32-38)	35 (29-41)	34 (30-41)	0
%CD8+ in LY	RI	26 (21-29)	27 (23-29)	-	-	
Vergleich CF/N		0,551	0,04	0,166	0,266	
Vergleich RI/N		0,968	0,006	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
RATIO CD4/CD8	CF	2.1 (1.5-2.3)	1.8 (1.1-2)	1.3 (1.1-1.8)	1.4 (0.9-1.7)	0,218
RATIO CD4/CD8	N	1.8 (1.3-2.2)	1.1 (1-1.3)	1 (0.7-1.2)	1.4 (1-1.6)	0
RATIO CD4/CD8	RI	1,7 (1,2-2)	1,6 (1,3-2)	-	-	
Vergleich CF/N		0,484	0,03	0,017	0,659	
Vergleich RI/N		0,512	0,022	-	-	

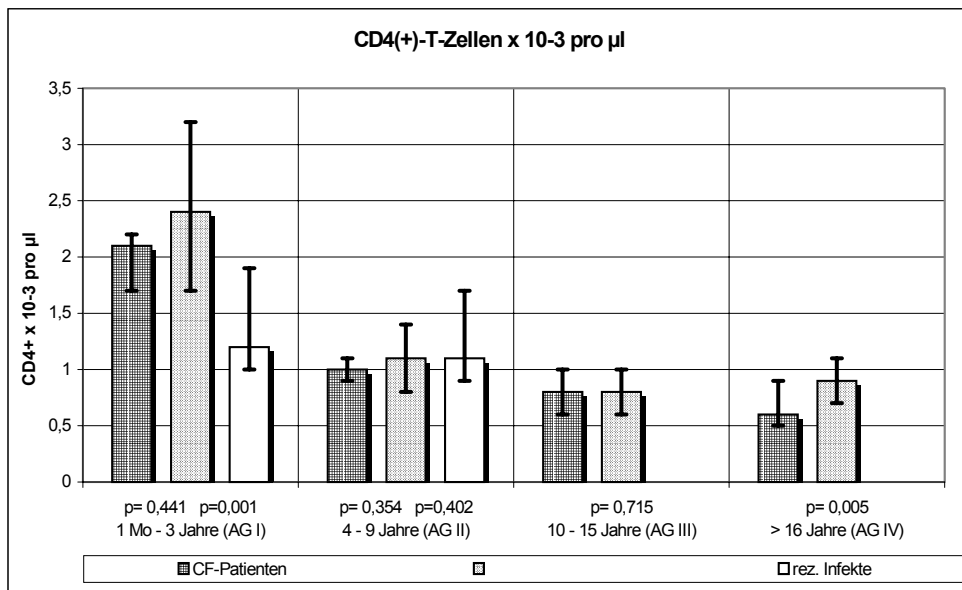
*Altersabhängige Veränderungen*

Bei den Patienten mit CF weisen nur die CD4(+)-Zellen pro µl eine altersabhängige Abnahme mit zunehmendem Alter auf.

In der Kontrollgruppe finden sich immer altersabhängige Veränderungen: CD4(+)/µl nehmen ab, die relativen CD4 nehmen zu. CD8(+)/µl nehmen genau wie die Ratio CD4/CD8 ab. Die CD8 positiven Zellen pro Lymphozyten nehmen zu.

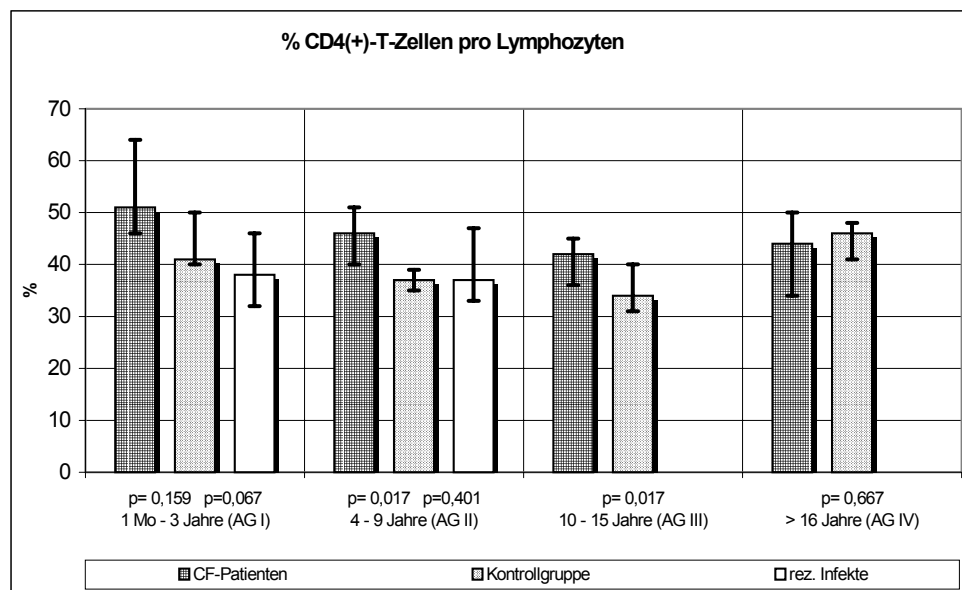
*Signifikante Veränderungen der Absolutzahl der CD4-positiven Zellen pro µl*

Die Anzahl der CD4(+)/µl in der CF-Gruppe ist erst ab dem 16. Lebensjahr (Altersgruppe IV) vermindert. Die CD4(+)-Zellen/µl sind nur in der Altersgruppe I der RI-Gruppe signifikant erniedrigt.



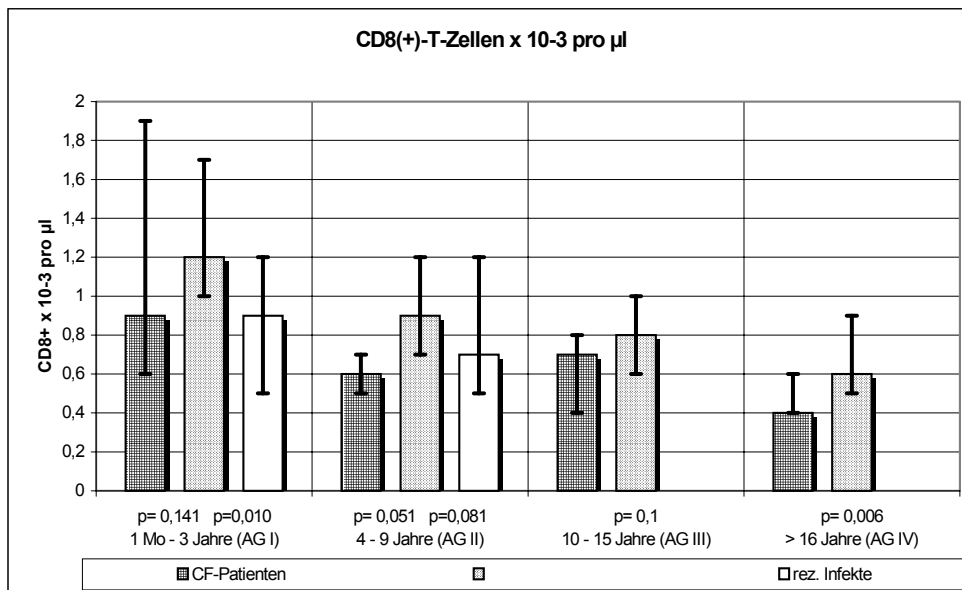
*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD4-positiven Zellen an den Lymphozyten*

Der relative Anteil der CD4 positiven Zellen pro Lymphozyten ist bei den Patienten mit CF im Alter von 4-15 Jahre (Altersgruppe II-III) erhöht.



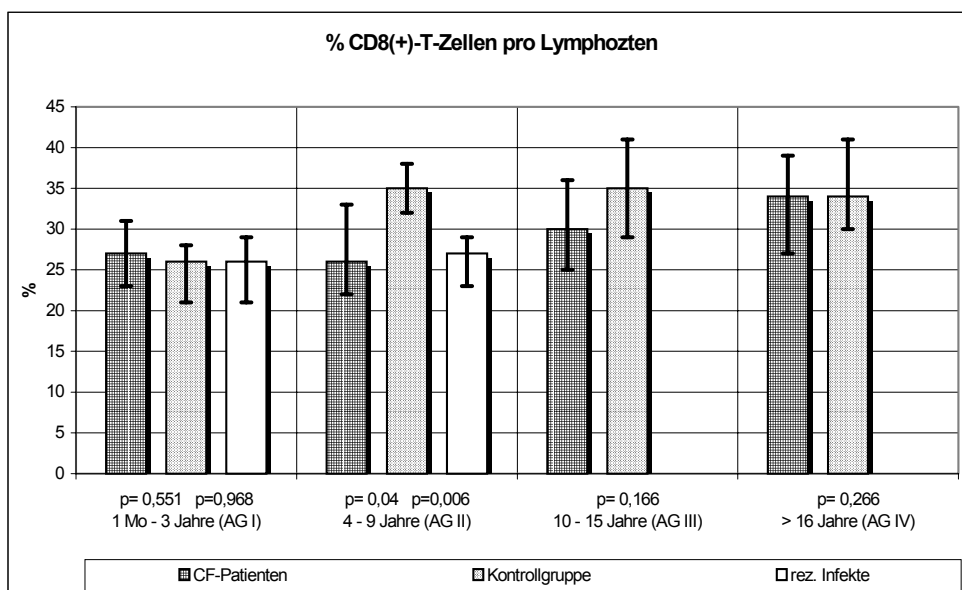
*Signifikante Veränderungen der Absolutzahl der CD8-positiven Zellen pro  $\mu$ l*

Die CD8(+)/ $\mu$ l der CF-Patientengruppe sind nur in der Altersgruppen IV vermindert. In der RI-Gruppe sind diese Zellen in der Altersgruppe I erniedrigt.



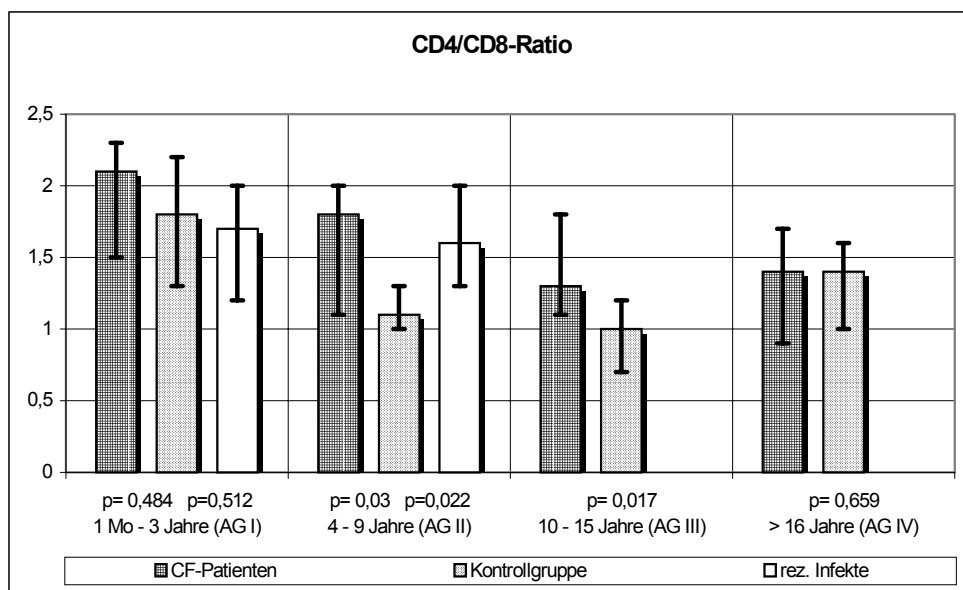
### Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD8-positiven Zellen an den Lymphozyten

Die CD8 positiven Zellen pro Lymphozyten sind in der Altersgruppe II der CF-Patientengruppe vermindert. Bei der RI-Gruppe sind diese Zellen in der Altersgruppe II verringert.



### Signifikante Veränderungen der CD4/CD8-Ratio

Die Ratio CD4/CD8 ist in den Altersgruppen II und III bei den Patienten mit CF erhöht. Bei den RI-Patienten ist sie in der Altersgruppe II kleiner als bei der Kontrollgruppe.



3.1.2.7. IL2-Rezeptor-Zellen (CD25):

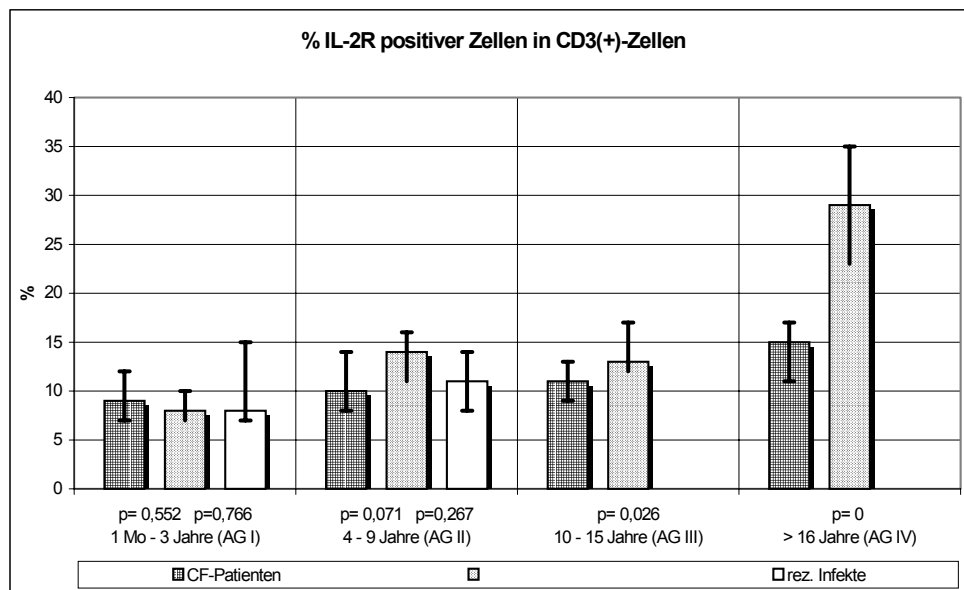
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD25+ in CD3 gesamt	CF	9 (7-12)	10 (8-14)	11 (9-13)	15 (11-17)	0,191
%CD25+ in CD3 gesamt	N	8 (7-10)	14 (11-16)	13 (12-17)	29 (23-35)	0
%CD25+ in CD3 gesamt	RI	8 (7-15)	11 (8-14)	-	-	
Vergleich CF/N		0,552	0,071	0,026	0	
Vergleich RI/N		0,766	0,267	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD3+CD25+/Lymp.	CF	6 (5-8)	8 (5,5-10,75)	8,5 (6,25-10)	12 (8-13)	0,104
%CD3+CD25+/Lymp.	N	6 (5-6,25)	10 (7-11,25)	9 (8-13)	21 (17-25)	0
%CD3+CD25+/Lymp.	RI	6 (4,75-7,25)	7 (5-8)	-	-	
Vergleich CF/N		0,383	0,248	0,235	0	
Vergleich RI/N		0,903	0,282	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD3+CD25+ /µl	CF	234 (160-301)	186 (140-221)	198 (118-218)	174 (133-237)	0,475
CD3+CD25+ /µl	N	287 (270-369)	285 (216-330)	226(167-282)	383 (331-488)	0
CD3+CD25+ /µl	RI	186 (140-261)	201 (146-259)	-	-	
Vergleich CF/N		0,183	0,017	0,109	0	
Vergleich RI/N		0,001	0,124	-	-	

Altersabhängige Veränderungen:

Nur bei der Kontrollgruppe zeigt sich immer eine altersabhängige Zunahme.

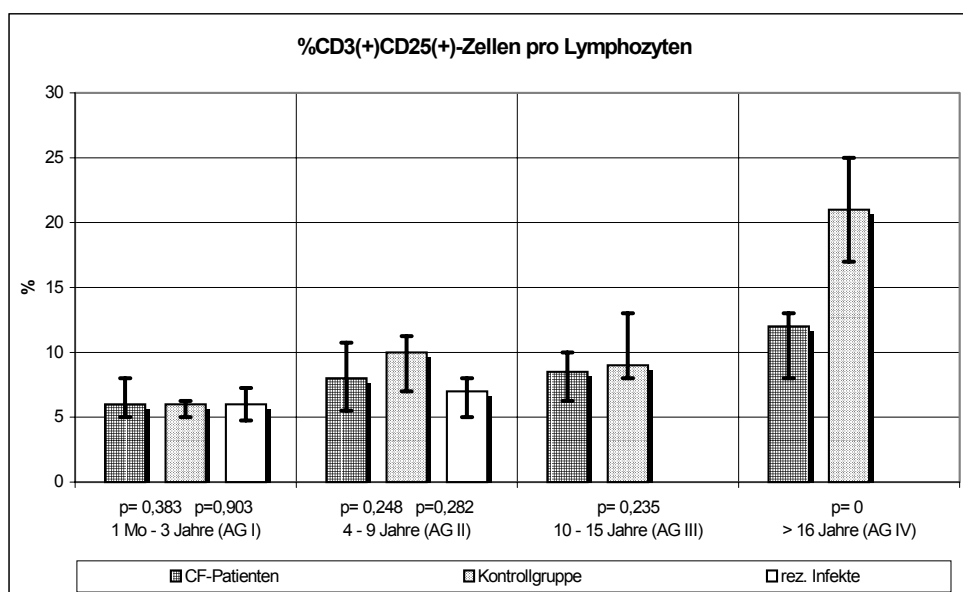
Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD25-positiven Zellen an CD3-gesamt

Die CD25(+)-Zellen in CD3 gesamt sind in der CF-Patientengruppe ab der Altersgruppe III erniedrigt.



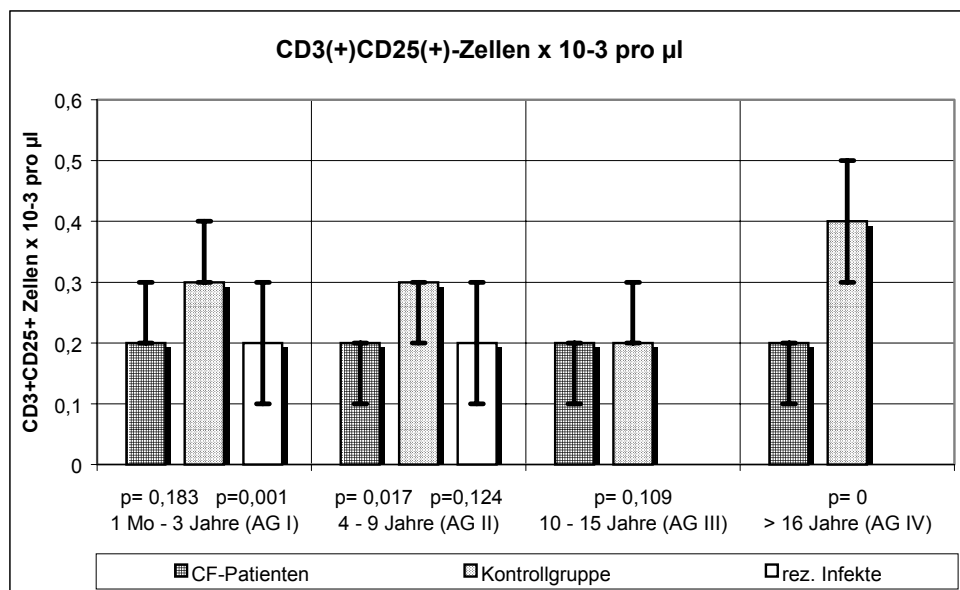
#### Signifikante Veränderungen der CD3CD25-positiven Zellen pro Lymphozyten

Bei den CD25(+)CD3(+)-Zellen pro Lymphozyten findet sich nur bei den Patienten mit CF älter als 16 Jahre (Altersgruppe IV) eine Verminderung gegenüber der Kontrollgruppe.



#### Signifikante Veränderungen des CD3CD25-positiven Zellen pro $\mu$ l

Die CD25(+)CD3(+)-Zellen pro  $\mu$ l sind nur in den Altersgruppen II und IV gegenüber dem Wert der entsprechenden Altersgruppe der Kontrollpersonen vermindert. In der RI-Gruppe zeigen die CD25(+)CD3(+)-Zellen pro  $\mu$ l nur in der Altersgruppe I eine Verringerung.



### 3.1.2.8. HLA-DR(+)-Zellen:

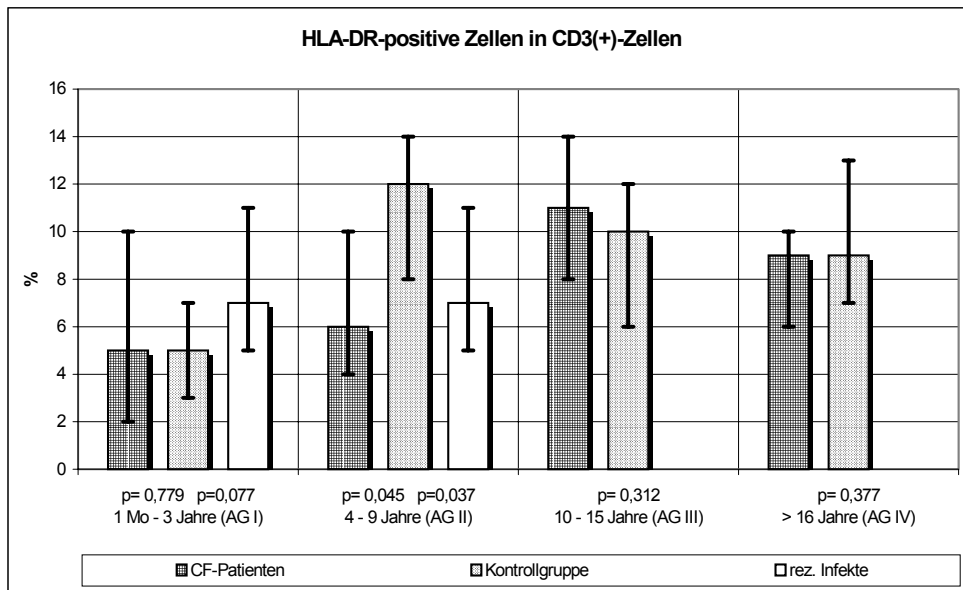
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%HLADR+ in CD3+	CF	5 (2-10)	6 (4-10)	11 (8-14)	9 (6-10)	0,09
%HLADR+ in CD3+	N	5 (3-7)	12 (8-14)	10 (6-12)	9 (7-13)	0
%HLADR+ in CD3+	RI	7 (5-11)	7 (5-11)	-	-	
Vergleich CF/N		0,779	0,045	0,312	0,377	
Vergleich RI/N		0,077	0,037	-	-	

#### Altersabhängige Veränderungen:

Die HLA-DR positiven Zellen innerhalb der CD3-Zellen zeigen sowohl bei den Patienten mit CF als auch bei der gesunden Kontrollgruppe eine altersabhängige Zunahme.

#### Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der HLA-DR-positiven Zellen an CD3-gesamt

Sowohl bei der CF-Patientengruppe als auch bei der Gruppe der rezidivierenden Infekte ist nur in der Altersgruppe II eine Verminderung der HLA-DR positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen.



## 3.1.2.9. NK-Zellen (CD1656):

Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppe
%CD16+56+/Lymphozyten	CF	12 (4-14)	9 (6-13)	8 (6-11)	9 (6-16)	0,865
%CD16+56+/Lymphozyten	N	6 (6-11)	13 (10-16)	13 (11-15)	15 (12-15)	0,004
%CD16+56+/Lymphozyten	RI	8 (5-12)	8 (5-13)	-	-	
Vergleich CF/N		0,595	0,078	0,001	0,116	
Vergleich RI/N		0,825	0,318	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppe
CD16+56+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	0.3 (0.1-1.1)	0.2 (0.1-0.3)	0.2 (0.1-0.3)	0.1 (0.1-0.3)	0,405
CD16+56+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	0.4 (0.3-0.8)	0.3 (0.2-0.5)	0.3 (0.3-0.4)	0.3 (0.2-0.3)	0,94
CD16+56+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,3)	-	-	
Vergleich CF/N		0,484	0,02	0,011	0,006	
Vergleich RI/N		0,035	0,167	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppe
%CD3+16+56+/Lymphozyten	CF	2 (0,75-2,25)	3 (1,25-3)	3 (2-5)	3 (2-7,25)	0,111
%CD3+16+56+/Lymphozyten	N	2 (1-5,25)	4 (2,75-7)	6,0 (4,0-8,0)	9 (5-14)	0
%CD3+16+56+/Lymphozyten	RI	1 (0-1)	1 (1-1)	-	-	
Vergleich CF/N		0,494	0,028	0,009	0	
Vergleich RI/N		0,002	0	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppe
CD3+16+56+ /µl	CF	32 (16,5-137,75)	61 (28-71,25)	52 (42-90)	65 (21-128,5)	0,963
CD3+16+56+ /µl	N	109 (73,5-212,5)	123 (69-209,75)	117 (83-170)	177,5 (122-222)	0,119
CD3+16+56+ /µl	RI	29 (0-42)	34 (17-42)	-	-	
Vergleich CF/N		0,183	0,01	0,01	0	
Vergleich RI/N		0	0	-	-	

*Altersabhängige Veränderungen:*

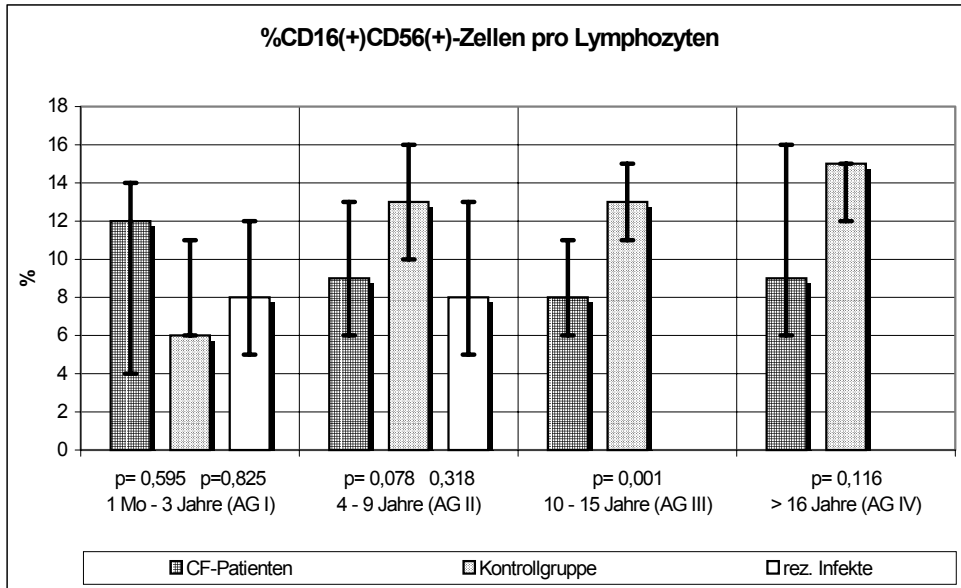
Bei der Kontrollgruppe nimmt der prozentuale Anteil der CD16+/CD56+ Zellen in den Lymphozyten mit zunehmendem Alter zu.

Auch die CD3(+)CD16(+)CD56(+)-Zellen pro Lymphozyten zeigen bei den Normalpersonen eine signifikante Zunahme.

*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD16(+)CD56(+)-Zellen pro Lymphozyten*

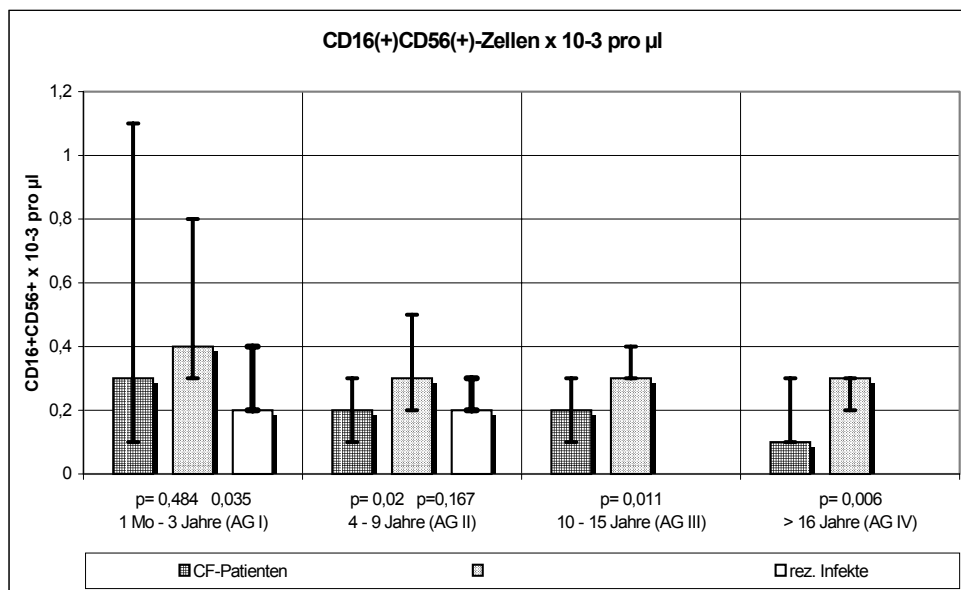
Für den prozentualen Anteil der CD16(+)CD56(+)-Zellen in den Lymphozyten zeigt sich in der Altersgruppe III der CF-Gruppe eine Verringerung.





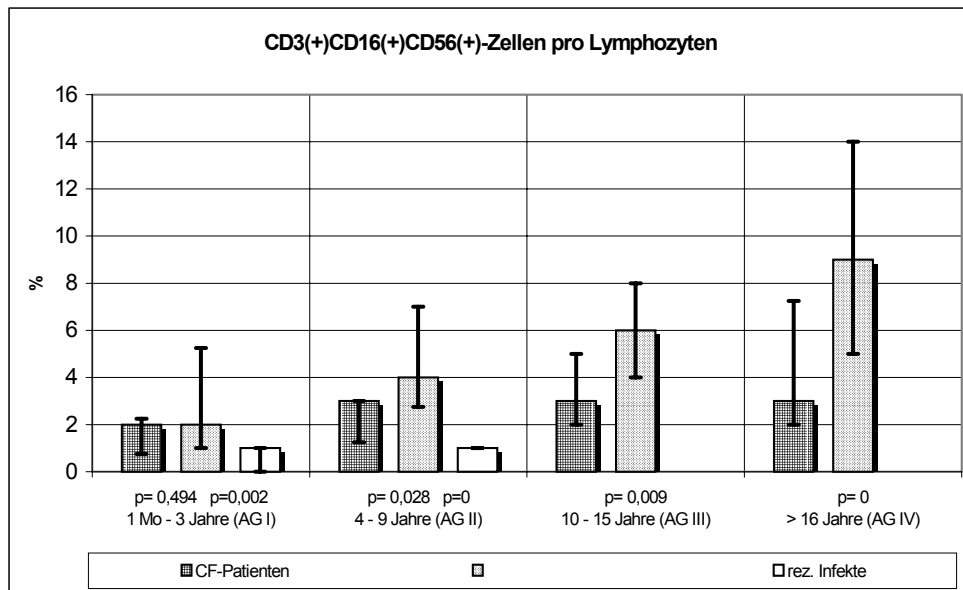
*Signifikante Veränderungen der CD16(+)/CD56(+)-Zellen pro µl*

CD16(+)/CD56(+)-Zellen absolut sind in den Altersgruppen II – IV der Patienten mit CF im Vergleich zu den Normalpersonen vermindert. In der Gruppe der rezidivierenden Infekte ist die Anzahl der CD16(+)/56(+)-Zellen pro µl in der Altersgruppe I erniedrigt.



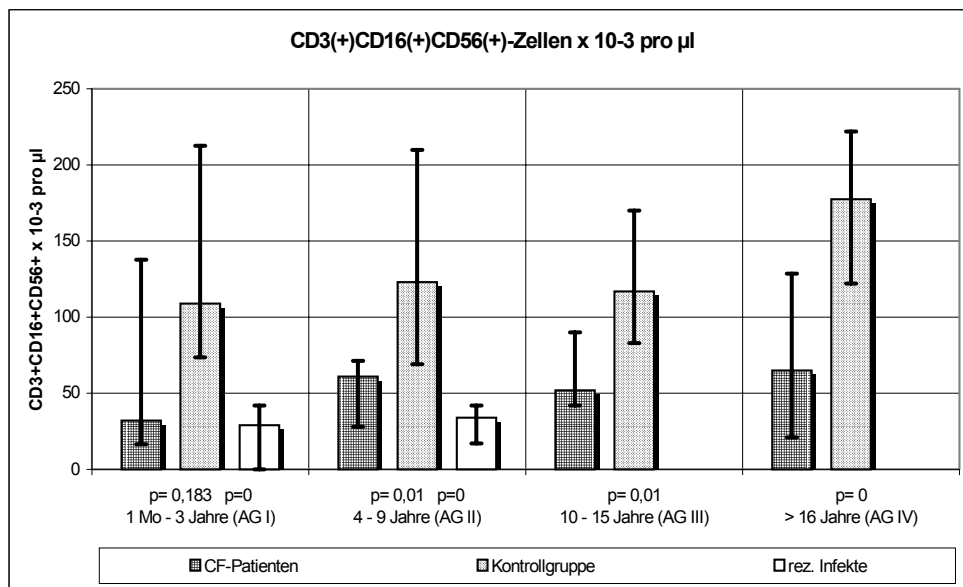
*Signifikante Veränderungen der CD3(+)/CD16(+)/CD56(+)-Zellen pro Lymphozyten*

Die Anzahl der CD3(+)/CD16(+)/CD56(+) Zellen pro Lymphozyten ist bei Patienten mit CF in den Altersgruppe II-IV gegenüber der Kontrollgruppe kleiner. In der RI-Gruppe sind diese Zellen in beiden Altersgruppen erniedrigt.



### Signifikante Veränderungen der CD3(+) CD16(+) CD56(+)-Zellen pro $\mu$ l

Die Absolutzahlen der CD3(+)  
CD16(+)  
CD56(+)-Zellen weisen in der Altersgruppen II-IV der CF-Gruppe einen verminderten Wert auf. In der RI-Gruppe sind diese Zellen in den Altersgruppen I und II erniedrigt.



## 3.1.2.10. CD8(+)CD11b(+) T-Supressor-Zellen/CD8(-)CD11b(+) Zytotoxische T-Zellen:

Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD11+CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	0,12 (0,05-0,6)	0,13 (0,11-0,15)	0,13 (0,06-0,26)	0,09 (0,04-0,1)	0,152
CD11+CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	0,22 (0,14-0,37)	0,21 (0,16-0,28)	0,15 (0,12-0,18)	0,19 (0,15-0,28)	0,123
CD11+CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	0,11 (0,08-0,17)	0,13 (0,08-0,18)	-	-	
Vergleich CF/N		0,327	0,051	0,685	0	
Vergleich RI/N		0,015	0,118	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD11-8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	0,7 (0,4-1,0)	0,4 (0,4-0,5)	0,4(0,3-0,5)	0,3(0,2-0,5)	0,209
CD11-8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	0,9 (0,7-1,0)	0,6 (0,4-0,9)	0,6 (0,5-0,7)	0,4 (0,3-0,5)	0
CD11-8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	0,65 (0,32-0,9)	0,58 (0,35-0,75)	-	-	
Vergleich CF/N		0,183	0,137	0,02	0,086	
Vergleich RI/N		0,017	0,455	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD11+8+/LY	CF	6 (2-7)	5,5 (4-7)	5,5 (2,5-10,5)	5,0 (4,0-7,0)	0,9
%CD11+8+/LY	N	4,0 (2,75-5,75)	8 (5,75-10,25)	7,0 (5,0-8,0)	9,0 (7,0-13)	0
%CD11+8+/LY	RI	3,5 (3-6,25)	4 (3-6)	-	-	
Vergleich CF/N		0,777	0,094	0,775	0	
Vergleich RI/N		0,763	0,068	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD11-8+/LY	CF	16 (13-22)	18 (16-19)	20,5 (15,5-23,75)	23,5 (17-28)	0,095
%CD11-8+/LY	N	18 (14-21,25)	21 (18,75-25,25)	25 (22-31)	21 (19-24)	0,001
%CD11-8+/LY	RI	17,5 (13,25-20,25)	18 (16-21)	-	-	
Vergleich CF/N		0,805	0,043	0,008	0,488	
Vergleich RI/N		0,75	0,351	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
Ratio11-11+	CF	2,9 (1,8-7)	3,1 (2,7-3,5)	4 (1,8-7,6)	4,7 (2,8-6,2)	0,597
Ratio11-11+	N	4,7 (2,7-6,6)	2,9 (1,9-4,5)	3,7 (2,8-4,4)	2,3(1,6-2,9)	0
Ratio11-11+	RI	4 (2,8-6,8)	4,2 (3-5,7)	-	-	
Vergleich CF/N		0,599	0,683	0,776	0	
Vergleich RI/N		0,751	0,277	-	-	

*Altersabhängige Veränderungen:*

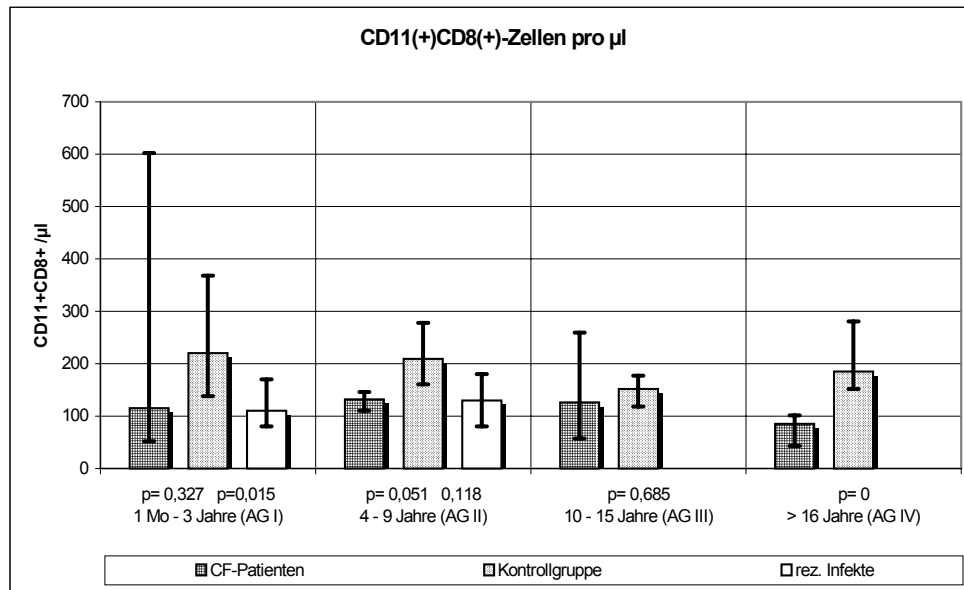
Die CD11(-)CD8(+)-Zellen pro µl und die Ratio CD11(-)/CD11(+) nehmen bei der gesunden Kontrollgruppe altersabhängig ab.

Die CD11(+)-CD8(+)-Zellen pro Lymphozyten und CD11(-)CD8(+)-Zellen pro Lymphozyten dagegen zeigen eine Zunahme mit zunehmendem Alter.

Bei den Patienten mit CF findet sich keine altersabhängige Veränderung.

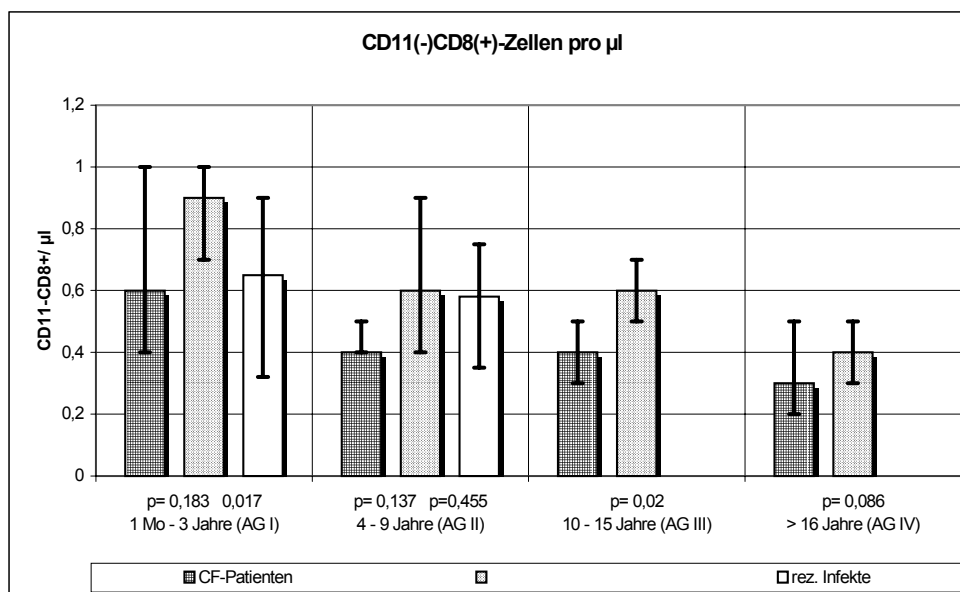
*Signifikante Veränderungen der CD11(+)-CD8(+)-Zellen pro µl*

Die Absolutzahl der CD11(+)-CD8(+)- der Patienten mit CF zeigt nur in der Altersgruppe IV einen niedrigeren Wert. In der RI-Gruppe sind diese Zellen in der Altersgruppe I vermindert



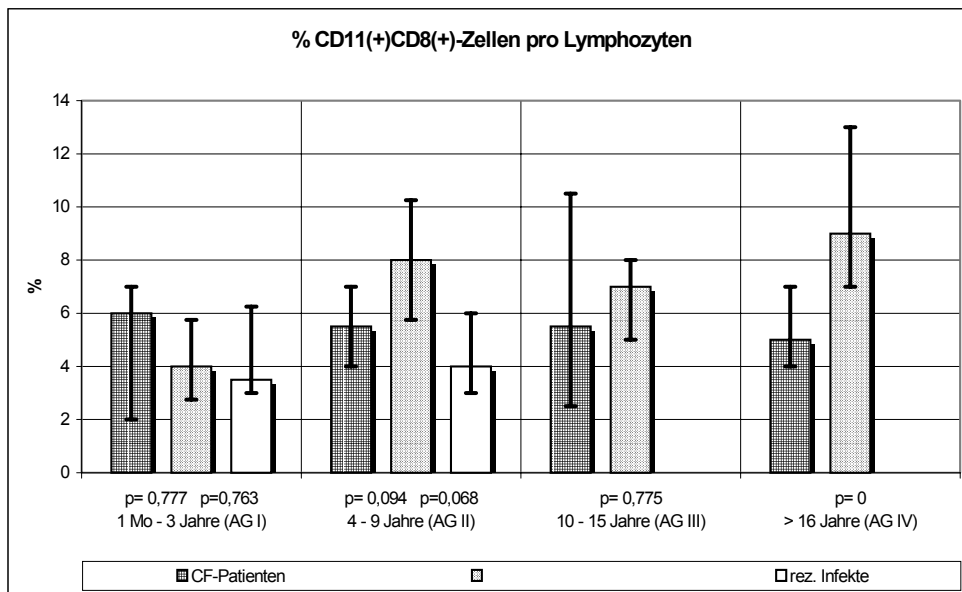
### Signifikante Veränderungen der CD11(-)CD8(+)-Zellen pro $\mu$ l

Bei den CD11(-)CD8(+) pro  $\mu$ l ist bei der CF-Patientengruppe nur in der Altersgruppe III ein kleinerer Wert feststellbar. In der RI-Gruppe sind diese Zellen in der Altersgruppe I erniedrigt.

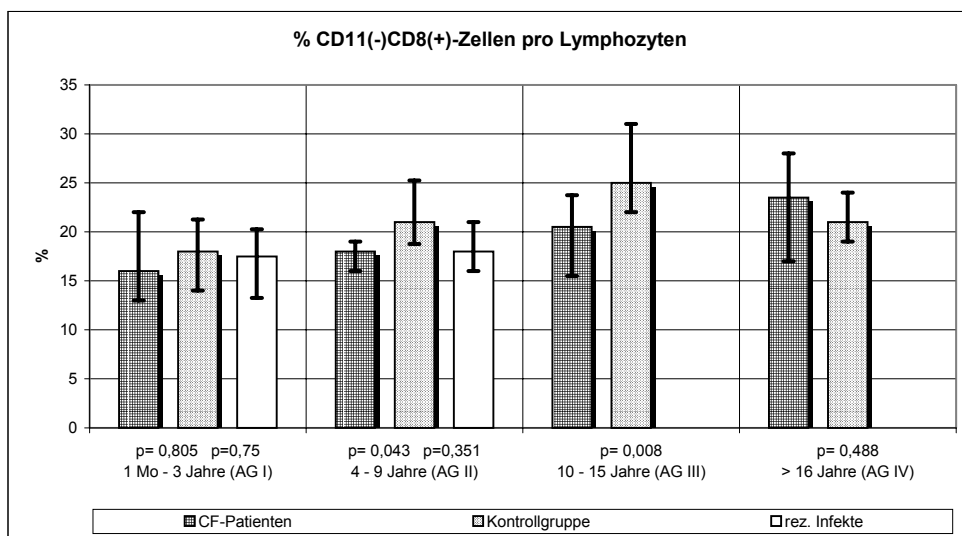


### Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD11(+)CD8(+)-Zellen an den Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der CD11(+)CD8(+)-Zellen pro Lymphozyten ist nur in Altersgruppe IV der CF-Patientengruppe vermindert.

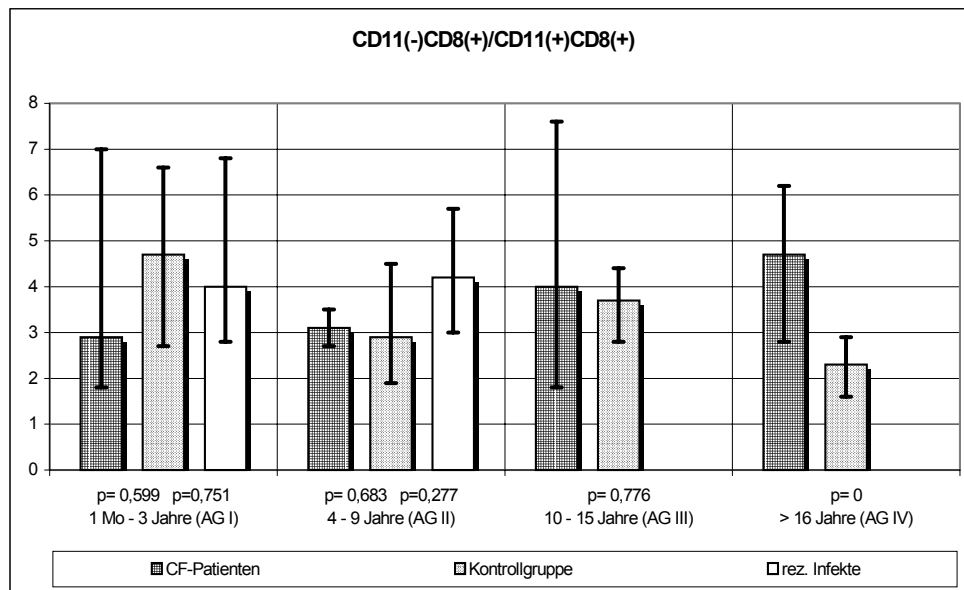


*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD11(-)CD8(+)-Zellen an den Lymphozyten*  
Der relative Anteil der CD11(-)CD8(+)-Zellen pro Lymphozyten weist bei der CF-Patientengruppe im Alter von 4-15 Jahren (Altersgruppe II und III) einen verminderten Wert auf.



*Signifikante Veränderungen der Ratio CD11(-)/CD11(+)*

Die Ratio CD11-/CD11+ ist bei den Patienten mit CF in der Altersgruppe IV erhöht.



## 3.1.2.11. CD57/CD8-Zellen:

Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
C57+CD8+/ $\mu$ l	CF	42 (0-96)	52 (28-137)	115 (57-181)	120 (65-133)	0,213
C57+CD8+/ $\mu$ l	N	85 (61-93)	188 (74-256)	183 (126-252)	140 (107-184)	0,006
C57+CD8+/ $\mu$ l		60 (33-120)	62 (27-167)	-	-	
Vergleich CF/N		0,22	0,018	0,109	0,115	
Vergleich RI/N		0,451	0,022	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD57+8+ /Lymph.	CF	1 (0-7)	3 (1-6)	6 (3-10)	7 (5-12)	0,024
%CD57+8+ /Lymph.	N	2 (1-2)	6 (4-9)	8 (6-11)	8 (6-10)	0
%CD57+8+ /Lymph.	RI	2,5 (1-4)	3 (1-4)	-	-	
Vergleich CF/N		0,504	0,023	0,222	0,674	
Vergleich RI/N		0,219	0,102	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD57+CD8-/ $\mu$ l	CF	33,5 (32-96)	28,5 (21,25-75,75)	66,5 (39-107,75)	51,5 (27,0-82)	0,342
CD57+CD8-/ $\mu$ l	N	134 (79,5-232)	93 (72,75-114)	87 (76-114)	59,5 (40-84)	0,001
CD57+CD8-/ $\mu$ l		48,5 (33,5-89)	49 (27-85)	-	-	
Vergleich CF/N		0,042	0,002	0,15	0,496	
Vergleich RI/N		0,001	0,037	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD57+8- /Lymph.	CF	1,0 (1,0-4,0)	1,0 (1,0-3,5)	3,0 (2,0-6,25)	3,5 (2,0-6,0)	0,037
%CD57+8- /Lymph.	N	2,0 (2,0-3,0)	4,0 (2,0-6,0)	4,0 (3,0-5,0)	3,0 (2,0-4,0)	0,01
%CD57+8- /Lymph.		1,5 (1-3,25)	2 (1-4)	-	-	
Vergleich CF/N		0,23	0,006	0,128	0,409	
Vergleich RI/N		0,235	0,142	-	-	

*Altersabhängige Veränderungen:*

CD57(+)  
CD8(+)-Zellen pro  $\mu$ l zeigen nur bei der Kontrollgruppe altersabhängige Veränderungen.

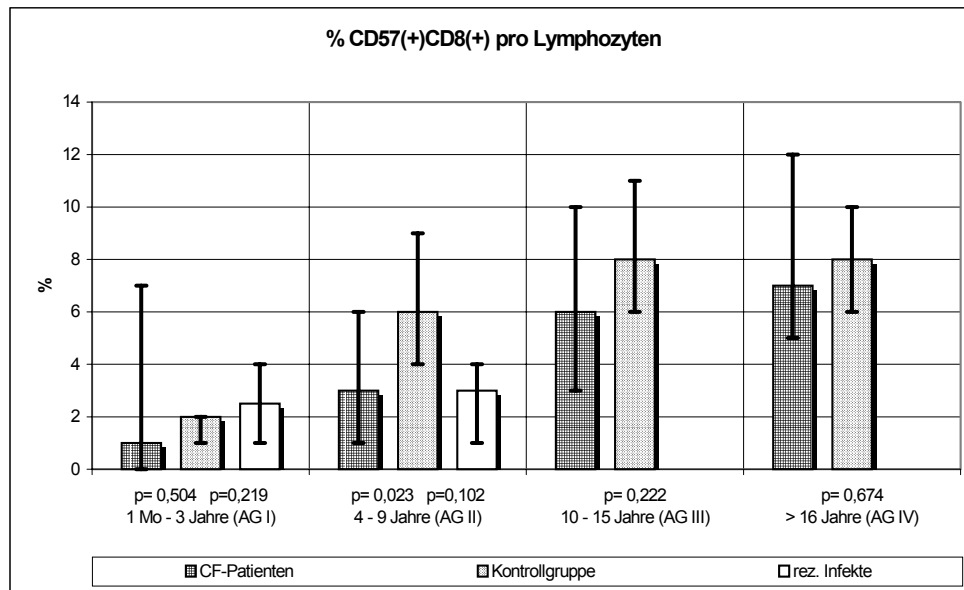
Die CD57(+)  
CD8(-) Zellen pro  $\mu$ l nehmen nur bei der Kontrollgruppe altersabhängig ab.

Der prozentuale Anteil der CD57(+)  
CD8(+)- und der CD57(+)  
CD8(-) Zellen an den Lymphozyten zeigt sowohl bei der CF-Patientengruppe als auch bei den Kontrollpersonen eine altersabhängige Zunahme.

*Signifikante Veränderungen der CD57(+)  
CD8(+)-Zellen pro  $\mu$ l*

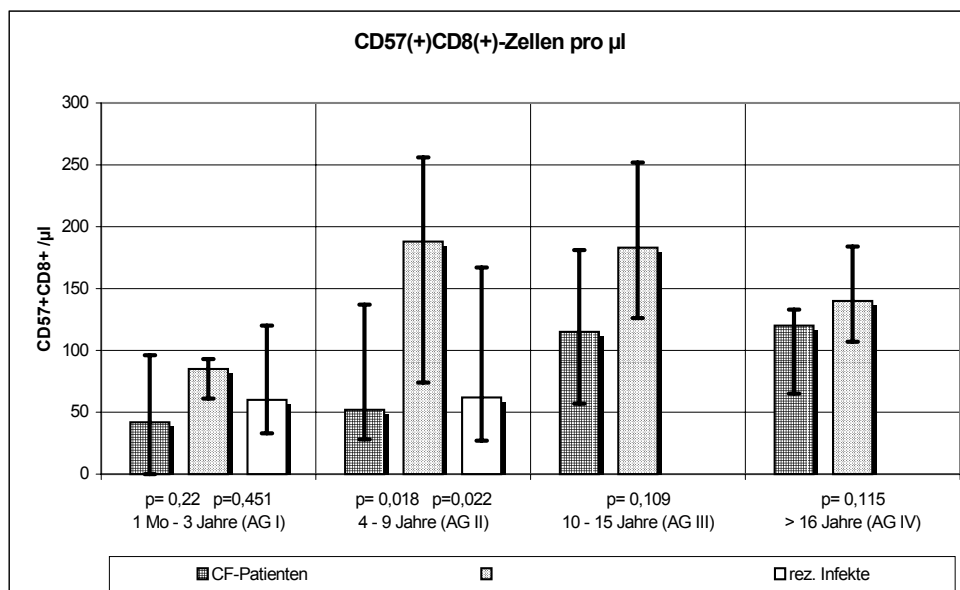
Die CD57(+)  
CD8(+)-Zellen pro  $\mu$ l ist bei der CF-Patientengruppe nur in der Altersgruppe II vermindert.

Bei der RI-Gruppe sind sie in Altersgruppe II verringert



*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD57(+)CD8(+)-Zellen pro Lymphozyten*

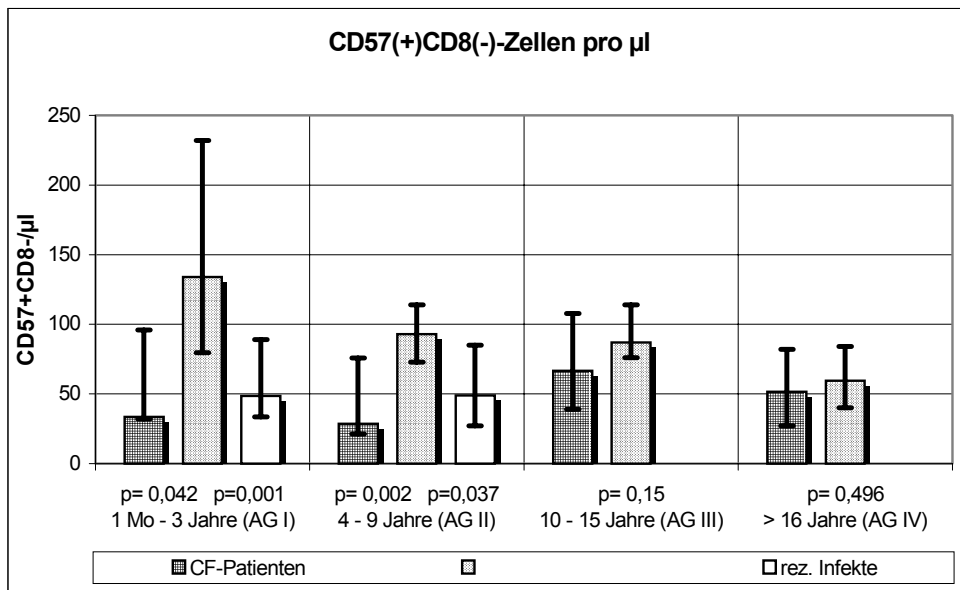
Auch der prozentuale Anteil der CD57(+)CD8(+)-Zellen an den Lymphozyten ist nur in der Altersgruppe II der Patienten mit CF vermindert.



*Signifikante Veränderungen der CD57(+)CD8(-)-Zellen pro  $\mu$ l*

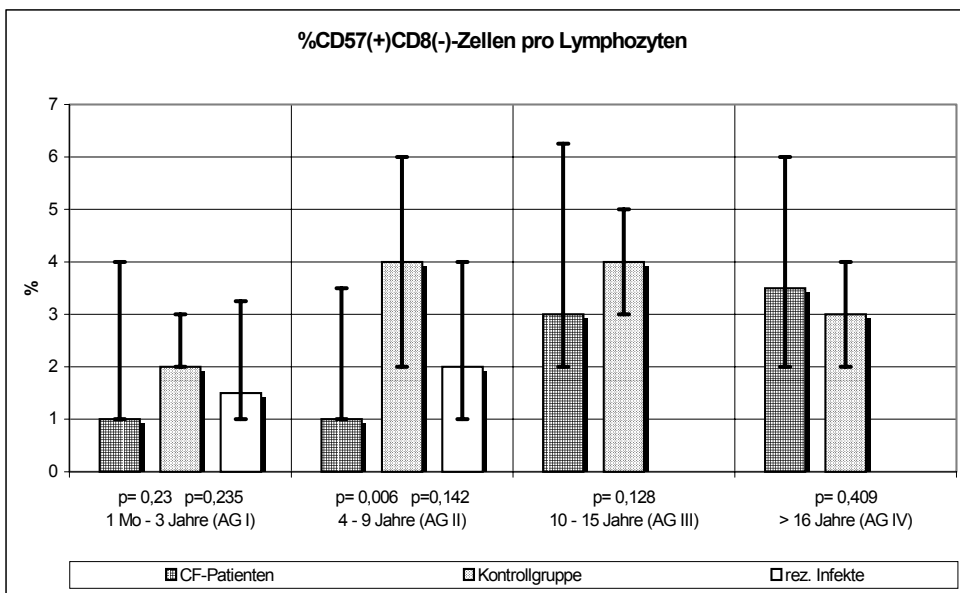
Bei den CD57(+)CD8(-) Zellen pro  $\mu$ l zeigt sich ein kleinerer Wert in den Altersgruppen I und II der CF-Patientengruppe. Diese Zellen/ $\mu$ l sind auch in den Altersgruppen I und II der RI-Gruppe erniedrigt.





*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD57(+)/CD8(-)-Zellen pro Lymphozyten*

Bei dem prozentualen Anteil der CD57(+)/CD8(-) Zellen an den Lymphozyten ist der Wert der CF-Gruppe im Vergleich zu den Gesunden nur in der Altersgruppe II kleiner



## 3.1.2.12. CD4(+)CD45RA(+)-T-Zellen:

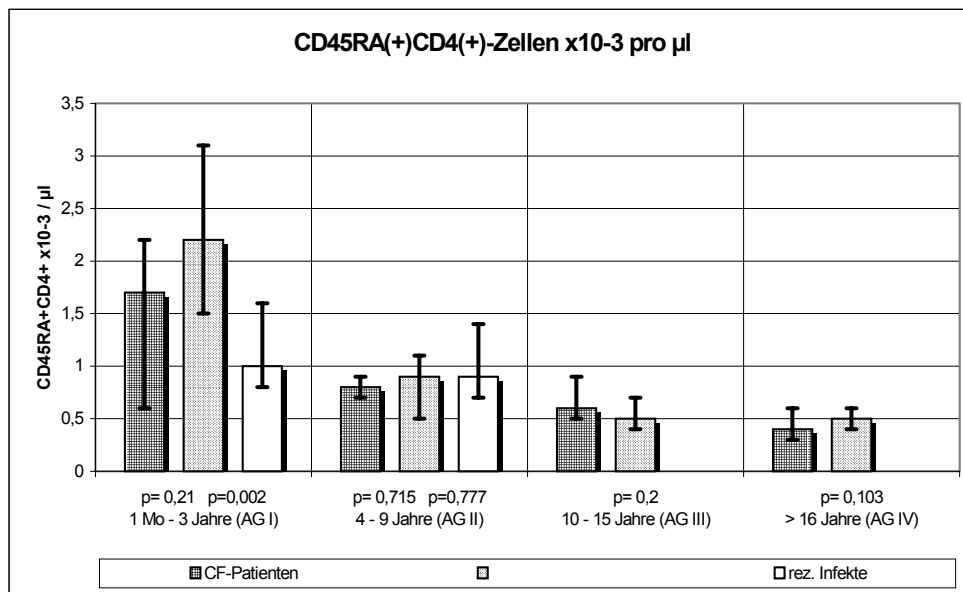
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD45RA+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	1.7 (0.6-2.2)	0.8 (0.7-0.9)	0.6 (0.5-0.9)	0.4 (0.3-0.6)	0,008
CD45RA+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	2.2 (1.5-3.1)	0.9 (0.5-1.1)	0.5 (0.4-0.7)	0.5 (0.4-0.6)	0
CD45RA+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	1 (0,8-1,6)	0,9 (0,7-1,4)	-	-	
Vergleich CF/N		0,21	0,715	0,2	0,103	
Vergleich RI/N		0,002	0,777	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD45RA+CD4+/Lymph.	CF	51,5 (36,25-66,0)	36 (30-37)	29 (26-37)	26 (23-33)	0,039
%CD45RA+CD4+/Lymph.	N	38 (35,75-47)	27,5 (25-31,75)	22,5 (20-25)	25,5 (20-29)	0
%CD45RA+CD4+/Lymph	RI	32,5 (25,75-42,5)	32 (27-42)	-	-	
Vergleich CF/N		0,178	0,143	0,007	0,542	
Vergleich RI/N		0,041	0,137	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD45RA+/CD4 gesamt	CF	84 (66-97)	72 (67-72)	63 (58-73)	57 (50-64)	0,022
%CD45RA+/CD4 gesamt	N	80( 76-83)	61 (57-70)	54 (51-61)	52 (45-57)	0
%CD45RA+/CD4 gesamt	RI	79 (71-85)	75 (68-83)	-	-	
Vergleich CF/N		0,37	0,059	0,016	0,031	
Vergleich RI/N		0,905	0,017	-	-	

*Altersabhängige Veränderungen:*

CD45RA(+)CD4(+) /µl, der prozentuale Anteil der CD45RA(+)CD4(+) an den Lymphozyten und der prozentuale Anteil der CD45RA positiven Zellen an CD4 gesamt zeigen sowohl bei der Patienten als auch bei der Kontrollgruppe eine Abnahme der Werte mit zunehmendem Alter.

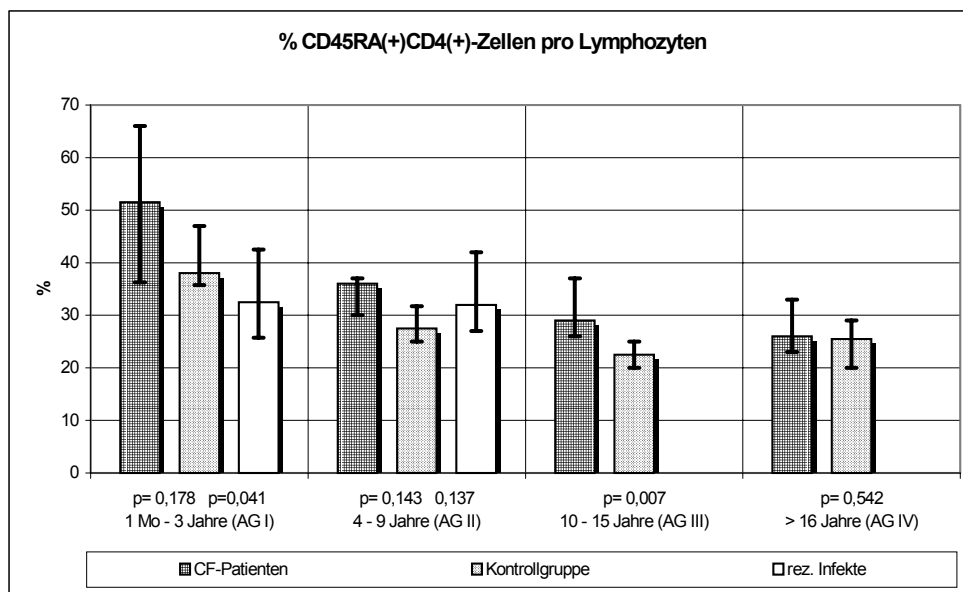
*Signifikante Veränderungen der CD4(+)CD45RA(+)-Zellen pro µl*

CD45RA(+)CD4(+) /µl weist keinen Unterschied im Vergleich der CF-Gruppe mit der Kontrollgruppe auf. Bei der RI-Gruppe sind diese Zellen in der ersten Altersgruppe der RI-Gruppe erniedrigt.



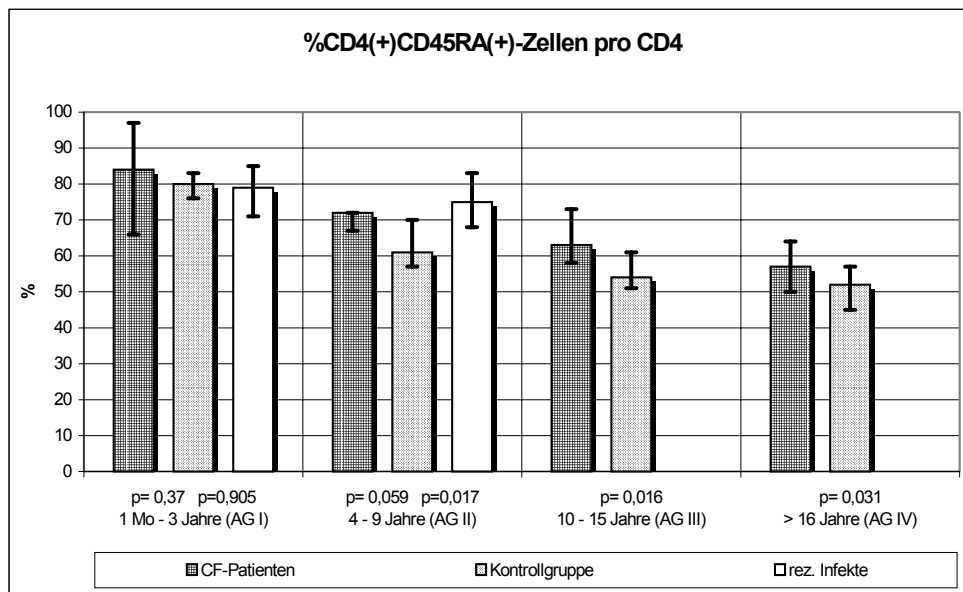
*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD4(+)/CD45RA(+)-Zellen pro Lymphozyten*

Der prozentuale Anteil der CD45RA(+)/CD4(+)-T-Zellen an den Lymphozyten ist bei den Patienten mit CF gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nur in der Altersgruppe III erhöht. Diese Zellen sind in der Altersgruppe I der RI-Gruppe vermindert.



*Signifikante Veränderung der CD4(+)/CD45RA(+)-Zellen innerhalb der CD4(+)-Zellen*

In der Gruppe der Patienten mit CF ist der Anteil der CD4(+)/CD45RA(+)-Zellen innerhalb der CD4-Zellen in den Altersgruppen III und IV erhöht. Die CD45RA(+) Zellen pro CD4 gesamt sind in der Altersgruppe II der RI-Gruppe erhöht.



## 3.1.2.13. CD45RO(+)/CD4(+)-Memory-T-Zellen:

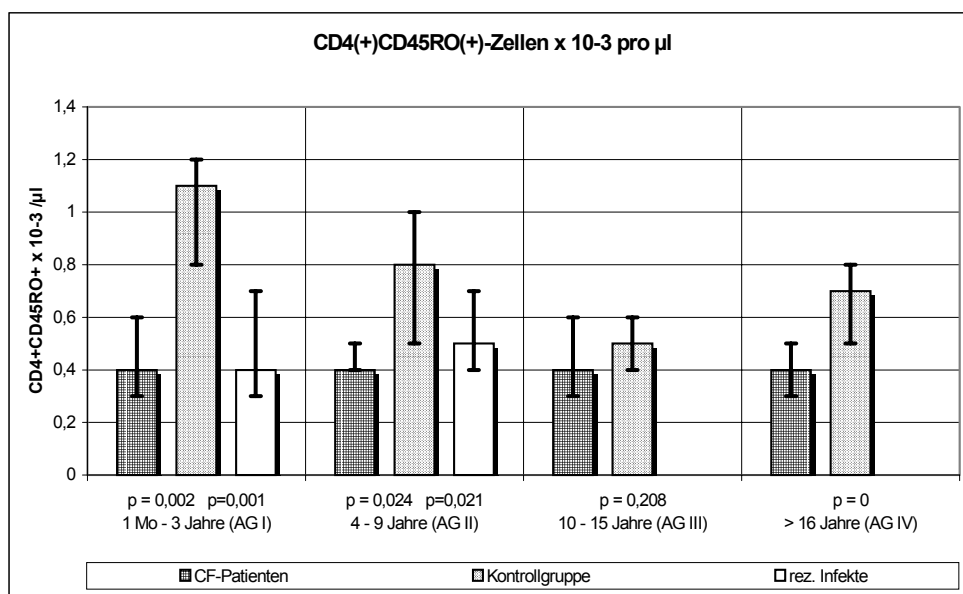
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
CD45RO+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	CF	0.4 (0.3-0.6)	0.4 (0.4-0.5)	0.4 (0.3-0.6)	0.4 (0.3-0.5)	0,673
CD45RO+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	N	1.1 (0.8-1.2)	0.8 (0.5-1)	0.5 (0.4-0.6)	0.7 (0.5-0.8)	0
CD45RO+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	RI	0,4 (0,3-0,7)	0,5 (0,4-0,7)	-	-	
Vergleich CF/N		0,002	0,024	0,208	0	
Vergleich RI/N		0,001	0,021	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD45RO+CD4+/Lymph.	CF	15,5 (13,25-24,5)	20,5 (15-23)	19 (17-23)	23,5 (21,25-28)	0,069
%CD45RO+CD4+/Lymph.	N	21 (16,5-23,25)	27 (23,75-30,75)	21 (18-26)	35 (28-42)	0
%CD45RO+CD4+/Lymph.	RI	17,5 (10,75-21)	17 (11-21)	-	-	
Vergleich CF/N		0,3	0,067	0,499	0	
Vergleich RI/N		0,098	0,022	-	-	
Altersgruppe		I	II	III	IV	Vergleich Altersgruppen
%CD45RO+/CD4 gesamt	CF	25 (21-46)	44 (38-45)	43 (36-56)	53 (46-60)	0,051
%CD45RO+/CD4 gesamt	N	38 (34-51)	59 (54-66)	54 (49-59)	63 (56-69)	0
%CD45RO+/CD4 gesamt	RI	38 (23-53)	42 (24-57)			
Vergleich CF/N		0,128	0,033	0,121	0,007	
Vergleich RI/N		0,578	0,021	-	-	

*Altersabhängige Veränderungen*

Bei den CD45RO weist nur die Kontrollgruppe altersabhängige Veränderungen auf: CD45RO(+)/CD4(+)/µl nimmt mit zunehmenden Alter ab, der prozentuale Anteil der CD45RO(+)/CD4(+)-Zellen an der Lymphozyten und der prozentuale Anteil der CD45RO(+)-Zellen an CD4 gesamt nehmen mit zunehmendem Alter zu.

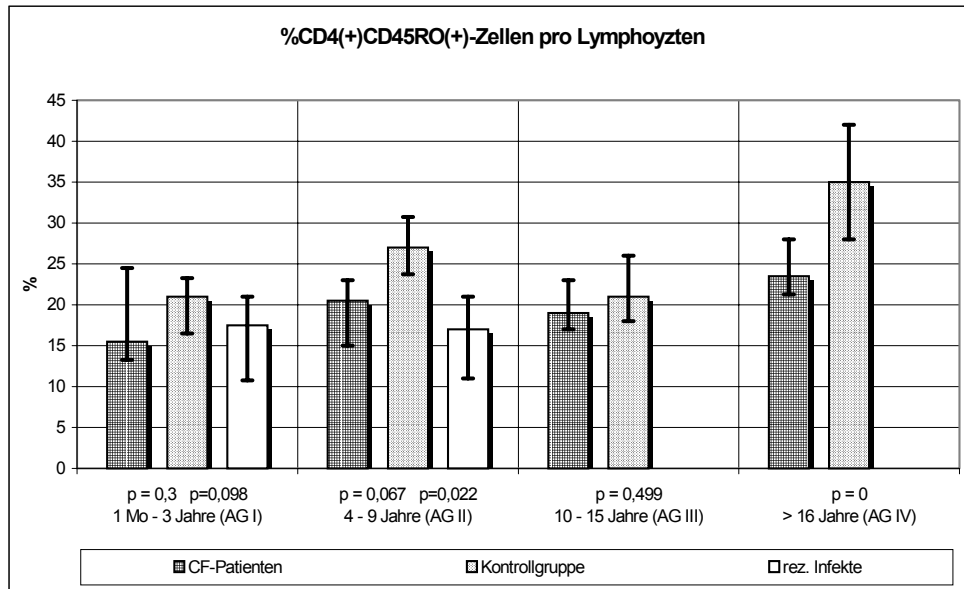
*Signifikante Veränderungen der CD4(+)/CD45RO(+)-Zellen pro µl*

Die Anzahl der CD45RO(+)/CD4(+)-Zellen pro µl ist bei der CF-Patientengruppe in den Altersgruppen I, II und IV erniedrigt. Diese Zellen sind in der Altersgruppe I und II der RI-Gruppe erniedrigt.



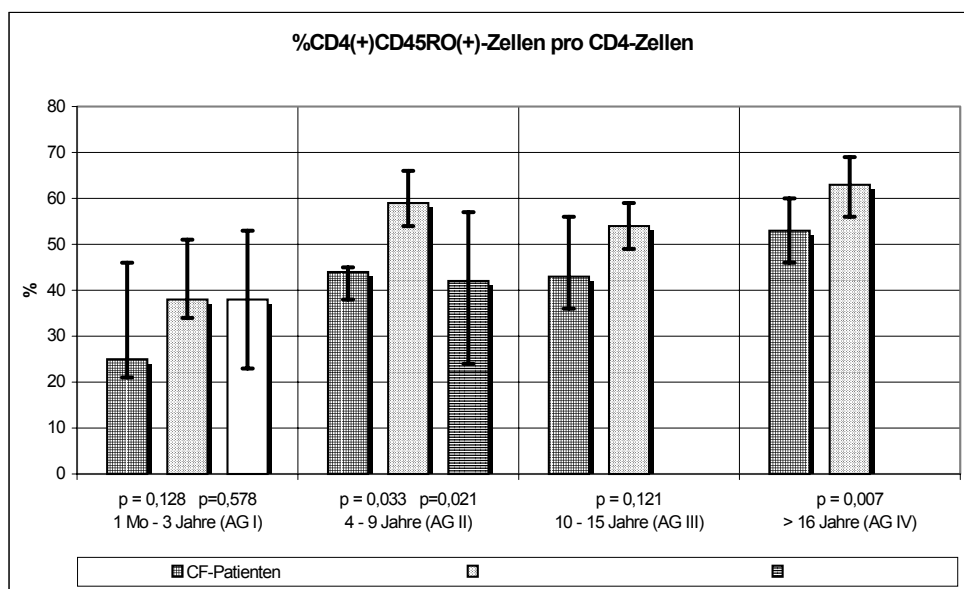
*Signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils der CD4(+)CD45RO(+)-Zellen pro Lymphozyten*

Die CD45RO(+)CD4(+)-Zellen pro Lymphozyten sind in der Altersgruppe IV der Patienten mit CF vermindert. Bei den RI-Patienten sind diese Zellen nur in der Altersgruppe II vermindert



*Signifikante Veränderung der CD4(+)CD45RO(+)-Zellen innerhalb der CD4(+)-Zellen*

Der prozentuale Anteil der CD45RO(+)-Zellen pro CD4 gesamt ist in der Altersgruppe II und IV der CF-Gruppe erniedrigt. Bei der RI-Gruppe sind diese Zellen nur in Altersgruppe II vermindert.



## 3.2. Histopathologie und Immunhistochemische Färbung

Die Histopathologie und die immunhistochemische Färbung des Lungengewebes der vier Patienten mit CF ergaben die folgenden Ergebnisse. Eine Übersicht zeigt Tabelle 3.2.

### 3.2.1. Histologie

#### *Patient 1 (Alter: 6 Monate)*

Die Patientin zeigte eine akute Bronchopneumonie mit einer großen Ansammlung intraalveolärer Granulozyten. Zeichen einer interstitiellen Pneumonie, lymphozytäre Aggregate oder Lymphfollikel wurden nicht gefunden. Lymphozyten waren kaum vorhanden.

#### *Patient 2 (Alter: 20 Jahre)*

Das Lungengewebe dieses Patienten zeigte typische Charakteristika einer Bronchiolitis obliterans organisierter Pneumonie (BOOP)<sup>54</sup>, sowie deutliche lymphozytäre Aggregate und Follikel, vor allem lokalisiert in der bronchialen Submukosa.

#### *Patient 3/Patient 4 (Alter: 12 Jahre / 17 Jahre)*

Bei diesen Patienten fanden sich im Lungengewebe Bereiche mit Abszessformationen, aber auch Bereiche mit erhaltener Alveolararchitektur mit oder ohne begleitende Alveolarseptenverdickung. Weiterhin zeigten sich Areale mit fibrosierender Vernarbung. Eine große Anzahl Schaumzellen wurden innerhalb der Alveolen nachgewiesen.

Makrophagen und neutrophile Granulozyten waren in den Abszessformationen reichlich vorhanden, wohingegen das interstitielle Gewebe weitestgehend frei von Granulozyten war. Weiterhin zeigten sich insbesondere in der bronchialen Submukosa deutliche lymphozytäre Aggregate und Follikel.

Zusammenfassend konnten, entsprechend zu anderen Erkrankungen mit pulmonaler Entzündung<sup>143</sup> drei Kompartimente der interstitiellen lymphozytären Entzündung unterschieden werden: Das Alveolarseptum, die subepitheliale und submuköse Schicht der Bronchien und das bronchus-assoziierte lymphozytäre Gewebe (BALT) mit lymphozytären Aggregaten und Follikeln. Letzteres besteht aus einem follikulären Bereich, welcher durch das parafollikuläre Areal und die „dome-area“ umgeben ist.

### 3.2.2. Immunhistochemie

#### *Patient 1*

Vereinzelte T-Lymphozyten fanden sich verstreut im interstitiellen Gewebe. Sie waren CD45RA(+) und CD4(+) positiv. Da CD20(+)-Zellen im interstitiellen Gewebe praktisch nicht vorhanden waren, handelte es sich bei den CD45RA(+)-Zellen eher um naive T-Lymphozyten. Ausgeprägte, zufällig verteilte interstitielle Ansammlungen von CD56(+)-Zellen wurden nur bei diesem Patienten beobachtet. CD45RO(+)- oder CD8(+)-Zellen wurden nicht gefunden.

*Patienten 2,3 und 4*

Bei den Patienten 2-4 wurden T-Zellen überwiegend in den parafollikulären Bereichen gefunden. Außerdem fanden sich T-Zellaggregate in follikulären Arealen, sowie in der dome-area, in den Alveolarsepten und subepithelialen Schichten der Bronchien. Der Hauptanteil der T-Zellen war CD4(+) und CD45RO(+) positiv. Ausgeprägte CD8(+)-Zellansammlungen wurden nur im parafollikulären Bereich und in der subepithelialen Schicht der Bronchien von Patient 2 gefunden.

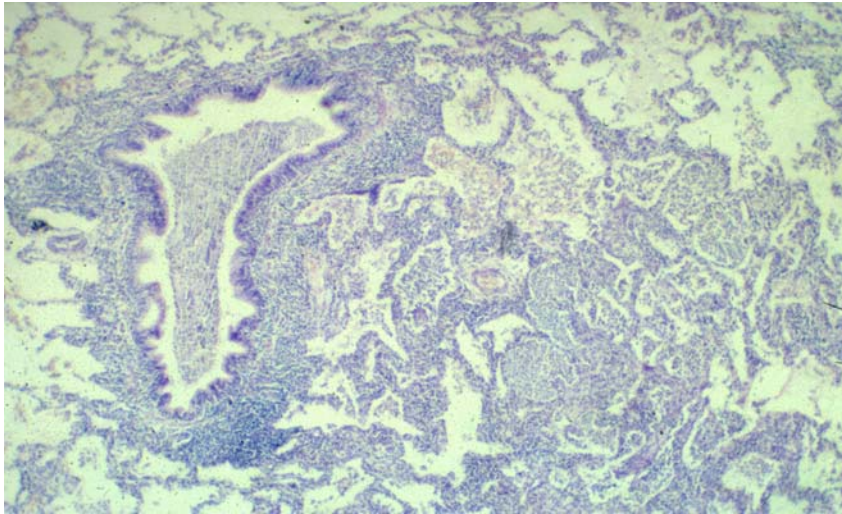
CD20(+)-Zellen waren bei den Patienten 2-4 in den follikulären Bereichen vorhanden. Weniger häufig wurden CD20(+)-B-Zellen im parafollikulären Areal, in der dome-area und im an die Lymphfollikel angrenzenden submukösen Gewebe gefunden. Vereinzelte CD20(+)-B-Zellen wurden auch im bronchialen Subepithel beobachtet. Dort wurden auch deutliche Plasmazellinfiltrate (CD20(-)) gesehen. Die Plasmazellen waren von CD4(+)- und CD45RO(+)-T-Zellen umgeben. CD45RA(+)-Zellen (ruhende B-Zellen oder naive T-Zellen) fanden sich nur in den follikulären Arealen.

Patient	Histologie	Immunhistochemie
<b>1</b> (6 Mo.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Akute Bronchopneumonie</li> <li>▪ Reichlich intraalveoläre Granulozyten</li> <li>▪ Wenige Lymphozyten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vereinzelte CD45RA(+) und CD4(+)-Zellen (naive T-Lymphozyten)</li> <li>▪ Ausgeprägte interstitielle Ansammlung von CD56(+)-Zellen.</li> </ul>
<b>2</b> (20 a)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ BOOP</li> <li>▪ Deutliche lymphozytäre Anhäufungen und Follikel v.a. in der bronchialen Submukosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ausgeprägte CD8(+)-Zellansammlung im parafollikulären Bereich und in der subepitheliale Schicht der Bronchien.</li> <li>▪ Sonst wie Pat. 3 und 4</li> </ul>
<b>3 / 4</b> (12a/17a)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Abszessformationen mit Ansammlung von Makrophagen und neutrophile Granulozyten</li> <li>▪ Bereiche erhaltener Alveolararchitektur mit und ohne Septenverdickung</li> <li>▪ Areale fibrosierender Vernarbung</li> <li>▪ Ansammlung schaumiger Makrophagen in den Alveolen</li> <li>▪ Deutliche lymphozytäre Anhäufungen und Follikel v.a. in der bronchialen Submukosa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Überwiegend T-Zellen (CD4/CD45RO positiv) im parafollikulären Bereich, in follikulären Arealen, im Kuppelbereich, in den Alveolarsepten und in Subepithel der Bronchien.</li> <li>▪ Viele CD20(+)-Zellen im follikulären Bereich</li> <li>▪ Deutliche Ansammlung von Plasmazellen im bronchialen Subepithel umgeben von CD4 und CD45RO positiven Zellen.</li> </ul>

**Tab. 3.2** Übersicht über die histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse



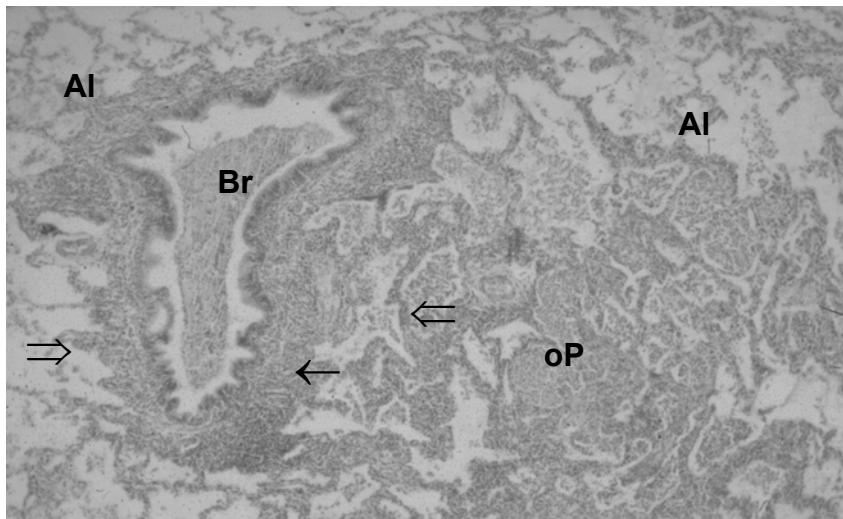
### 3.2.3. Histologische Schnitte



**Abb. 3.1**

**Histologisches Übersichtsbild mit typischen Zeichen einer organisierten Pneumonie (BOOP)**

HE-Färbung

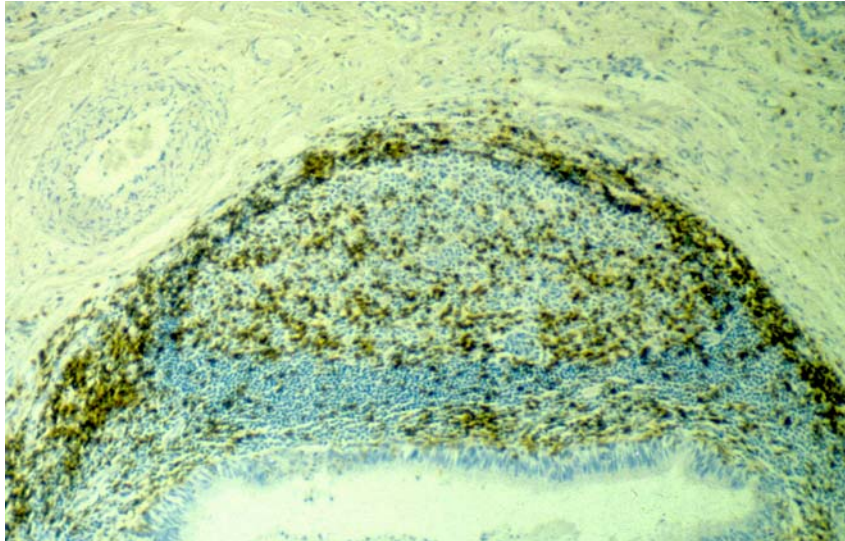


Es zeigt sich das für BOOP charakteristische fokale betonte Granulationsgewebe in Bronchioli, Alveolargängen und Alveolen. Die bronchoalveoläre Struktur ist weitgehend erhalten.

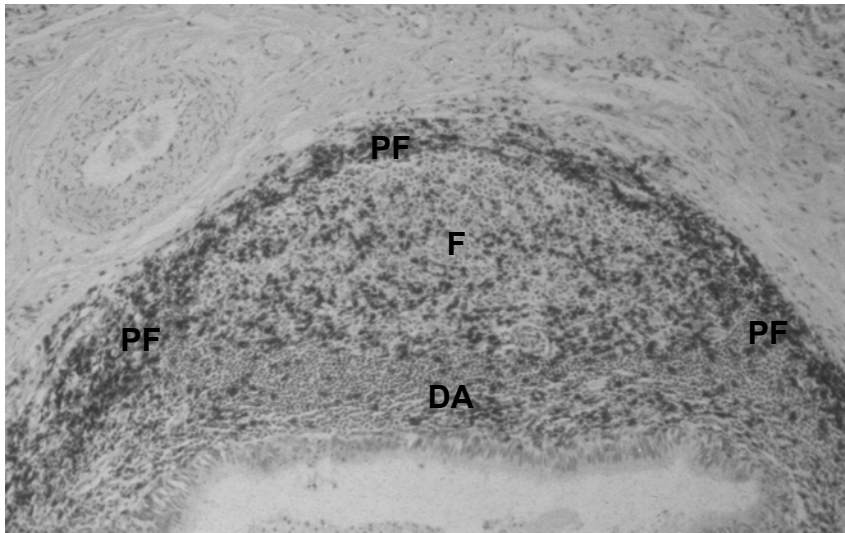
Die bronchiale Submukosa ist infolge lymphozytärer Ansammlungen verdickt.

Vereinzelt zeigen auch die Alveolarsepten eine Verdickung aufgrund mononukleärer Infiltrate.

- **Br** = kleiner Lungenbronchus
- **Al** = normale Alveolen
- **oP** = Organisierende Pneumonie
- → = bronchiale Submukosa mit lymphozytärer Anhäufung
- ⇒ = verdickte Alveolarsepten mit mononukleären Infiltraten

**Abb. 3.2****Detailansicht eines CF-Lungenbronchus mit BALT**

Eine immunohistochemische Färbung mit anti-CD45RO- (Memory-T-zell-) Antikörpern.



Die T-Zellansammlungen (in dieser Färbung braun) finden sich im parafollikulären Bereich und fokal in der dome area und im follikulären Areal.

- **F** = Follikulärer Bereich
- **DA** = dome area
- **PF** = Parafollikulärer Bereich

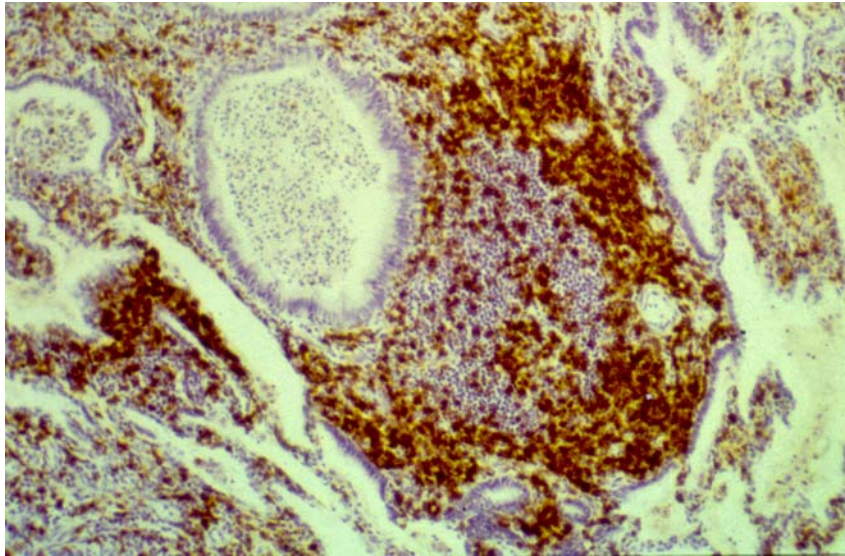
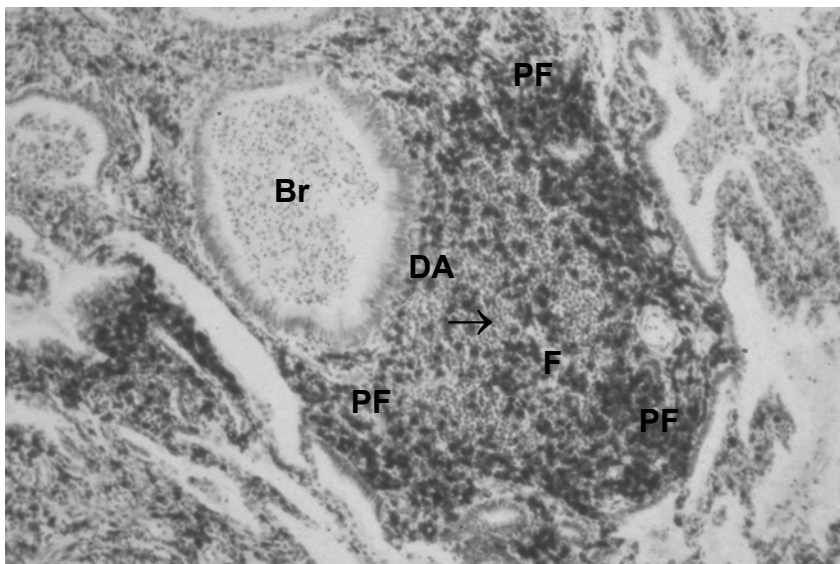


Abb. 3.3

**Detailansicht eines CF-Lungenbronchus und eines angrenzenden Lymphfollikels.**

Eine immunhistochemische Färbung mit anti-CD45RO Antikörpern.



Die im BALT Gewebe gefundenen T-Zellen sind überwiegend CD4-CD45RO-positiv.

- **Br** = Lungenbronchus
- **F** = Follikulärer Bereich
- **DA** = dome area
- **PF** = Parafollikulärer Bereich
- **→** = CD45 RO(+)-T-Zellen (bräunlich)

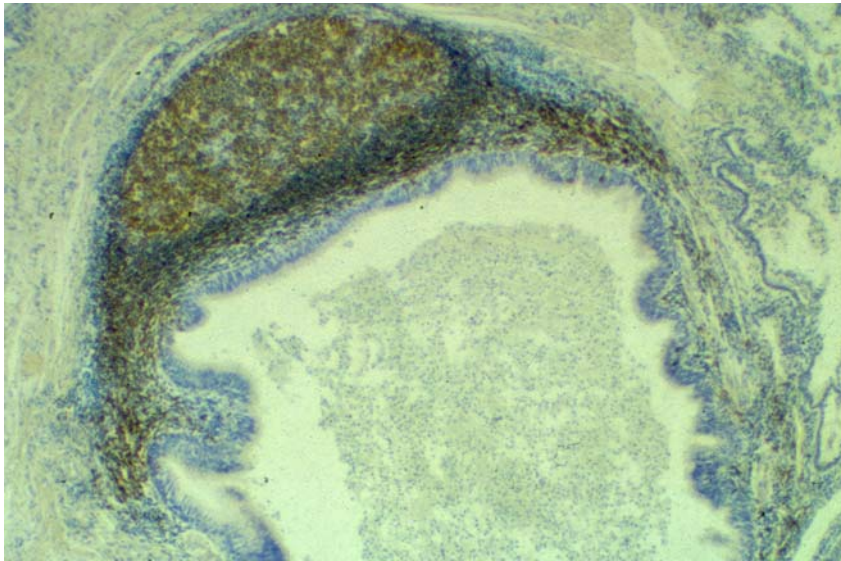
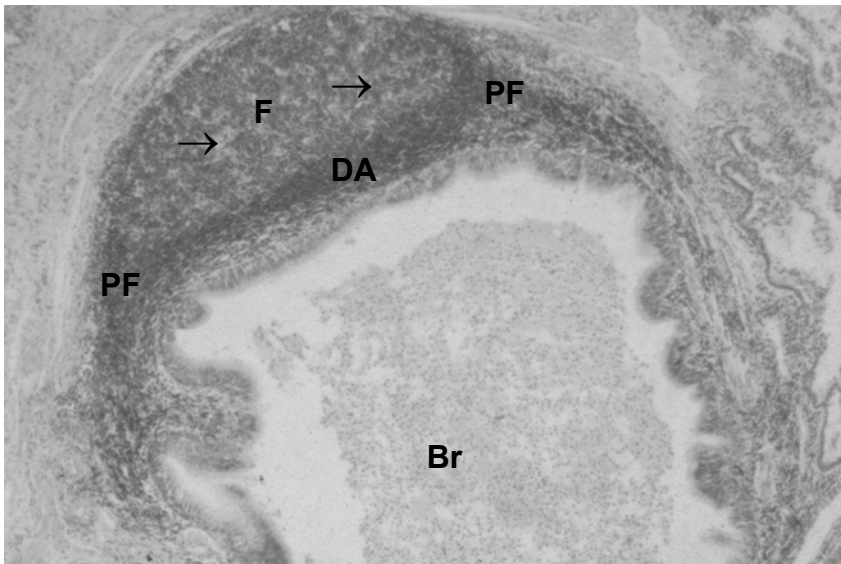


Abb. 3.4

**Detailansicht eines CF-Lungenbronchus mit BALT**

Eine immunhistochemische Färbung mit anti-CD20-Antikörpern

CD20(+)-B-Zellen finden sich bevorzugt im folliculären Bereich. Geringe Mengen können aber auch im parafolliculären Bereich und in der dome area beobachtet werden.



- **F** = Lymphfollikel
- **DA** = dome area
- **PF** = Parafollikulärer Bereich
- → = CD20(+)-B-Zellen (bräunlich)
- **Br** = Lungenbronchus

## 4. Diskussion

### 4.1. Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst altersentsprechende Normwerte für die untersuchten Lymphozytensubpopulationen (LS) erstellt. Mit Hilfe dieser Vergleichsdaten konnten krankheitsspezifische

Zellpopulation	Patienten mit CF	Kontrollgruppe	Erkeller et al.	Hulstaert et al.	Shahabudin et al.	Osugi et al.
Leukozyten x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	↓	↓	↓	↓	
% Lymphozyten	↓	↓				
Lymphozyten x 10 <sup>-3</sup> /µl	↓	↓	↓	↓	↓	
CD3+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	↓	↓	↓	↓	↓	-
% CD3+ in Lymph.	-	-	↑	↑	↑	
CD19+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	↓	↓	↓	↓	↓	
% CD19+ in Lymph.	-	↓	↓	↓	↓	-
% CD5+ in CD19 gesamt	-	↓	↓			↓
% CD16+56+ in Lymph.	-	↑	↓		-	↑
CD16+56+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	-	↓	↓	↓	
% CD3+CD16+56+ in Ly.	-	↑				
CD3+CD16+56+ /µl	-	-				
% HLADR+ in CD3+	↑	↑	↑	↑	↑	
% CD25+ in CD3 gesamt	-	↑	↑	↑		
% CD3+CD25+ in Lymph.	-	↑				
CD3+CD25+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	↑				
Ratio CD4/CD8	-	↓	-		↓	
CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	↓	↓		↓	
% CD8+ in Lymph.	-	↑	↑		↑	↑
% C57+CD8+ in Lymph.	↑	↑	↑			
C57+CD8+ /µl	-	↑				
% C57+CD8- in Lymph.	↑	↑				
C57+CD8- /µl	-	↓				
% CD11+CD8+ in Lymph.	-	↓				
% CD11-CD8+ in Lymph.	-	↑				
CD11+CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	-				
CD11-CD8+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	↓				
Ratio CD8+11-/CD8+11+	-	↓				
CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	↓	↓	↓		↓	
% CD4+ in Lymph.	-	↑	↑		↓	↓
CD45RA+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	↓	↓		↓		
% CD45RA+CD4+ in Ly	↓	↓				↓
% CD45RA+ in CD4+	↓	↓	↓	↓		
C45RO+CD4+ x 10 <sup>-3</sup> /µl	-	↓				
% CD45RO+CD4+ in Ly.	-	↑				↑
% C45RO+ in CD4+	-	↑				

↑ = signifikante altersabhängige Zunahme  
 ↓ = signifikante altersabhängige Abnahme  
 - = keine signifikante altersabhängige Veränderung.

**Tab. 4.1** Altersabhängige Veränderungen der LS. Ein Vergleich mit weiteren Studien.

Veränderungen der Patienten mit Zystischer Fibrose („cystic fibrosis“, CF) ermittelt werden.

Nach einer Untersuchung altersunabhängiger Unterschiede der LS zwischen den Patienten mit CF und der gesunden Kontrollgruppe, wurden auch die Unterschiede innerhalb jeder Altersgruppe dieser beiden Populationen bestimmt. Die physiologische Bedeutung der einzelnen LS und der Einfluss einer eventuellen Veränderung auf den Krankheitsverlauf der Mukoviszidose wurde unter Einbeziehung bereits vorhandener Studien zu diesem Thema diskutiert.

Zur vollständigen Interpretation der gewonnenen Ergebnisse diente der Vergleich mit Patienten mit rezidivierenden Infekten (RI) und die immunhistochemische Untersuchung von vier CF-Lungenpräparaten.

Alle Beobachtungen wurden abschließend in Bezug zu aktuellen Konzepten der Pathophysiologie bei CF gestellt. Eventuell aus den Ergebnissen ableitbare Modifikationen dieser Konzepte wurden diskutiert.

Mit in die Diskussion eingeschlossen wurde die grundsätzliche Frage, ob es sich jeweils um krankheitsbedingte oder eher statistisch bedingte Veränderungen, hervorgerufen durch ein kleines Patientenkollektiv, handelt.

## 4.2. Altersabhängige Veränderungen bei Patienten mit CF

Altersabhängige Veränderungen und Normwerte der LS bei Gesunden sind bereits bekannt. Für Patienten mit CF ist dies aber die erste Studie, welche periphere Veränderungen einer so großen Anzahl von Lymphozytensubpopulationen, einschließlich ihrer altersabhängigen Veränderungen, erfasst.

### 4.2.1. Altersabhängige Veränderungen der Kontrollpersonen

In der gesunden Kontrollgruppe wurden bei der relativen Anzahl der T-Lymphozyten, der Absolutzahl der CD16CD56-positiven Zellen und der Absolutzahl der CD3CD16CD56-positiven Zellen keine signifikanten altersabhängigen Veränderungen festgestellt. Alle weiteren untersuchten LS zeigen diese Veränderungen.

Ähnliche altersabhängige Veränderungen der LS bei gesunden Personen sind bekannt und physiologisch (siehe Tabelle 4.1). Sie sind vermutlich Folge einer Auseinandersetzung des Immunsystems mit externen Antigenen und spiegeln die Reifung und Umwandlung dieses Systems vom Kindes- bis zum Erwachsenenalter wieder <sup>47,48,89</sup>.

Wie aber der Vergleich in Tabelle 4.1. zeigt, können Unterschiede im Vergleich der LS bei gesunden Kontrollgruppen auftreten. Als Begründung werden unter anderem rassische und ethnische Einflüsse auf die einzelnen LS diskutiert. In der Tabelle 4.1. werden kaukasische, japanische und arabische Populationen verglichen. Dies könnte die dort beobachteten Unterschiede erklären. Auch *Shahabuddin* et al. erklärten die Diskrepanz der Ergebnisse in einem Vergleich von LS zwischen der eigenen Studie und einer ähnlichen Vergleichsstudie von *Osugi* et al. hauptsächlich durch die unterschiedliche Rassenangehörigkeit der untersuchten Personen <sup>107,130</sup>. Diese These wird gestützt durch weitere Arbeiten, die Veränderungen der LS bezüglich verschiedener Rassenzugehörigkeit untersucht haben <sup>111,129</sup>. Auffallend ist außerdem, dass die Daten von *Erkeller* et al., die auch eine kaukasische Population untersucht hatten, mit denen aus dieser Studie komplett übereinstimmen.

Da in der vorliegenden Studie erstmals ein großes Spektrum an LS untersucht wurde, lagen nicht für alle LS Vergleichsstudien vor. Eine physiologische altersabhängige Veränderung im Sinne einer Reifung kann aber wahrscheinlich auch hier angenommen werden.

### 4.2.2. Altersabhängige Veränderungen der Patienten mit CF

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe ließen sich bei den Patienten mit CF kaum altersabhängige Veränderungen nachweisen. Sie fanden sich nur bei der relativen und absoluten Anzahl der Lymphozyten, der Absolutzahlen der T-Zellen, B-Zellen und CD4-positiven T-Zellen, den relativen und totalen CD4CD45RA-positiven Zellen und den CD45RA(+) Zellen pro CD4 gesamt. Der prozentuale Anteil der CD57(+)CD8 positiven und negativen Zellen pro Lymphozyten nahm altersabhängig zu. Die HLA-DR(+) Zellen in CD3 gesamt nahmen ebenfalls zu. Die anderen LS zeigten keine altersabhängigen Veränderungen (s.a. Tabelle 4.1).

Das Fehlen der altersabhängigen Veränderungen bei einem Großteil der LS der Patienten mit CF wurde erstmals in dieser Studie gezeigt. Auch unter Beachtung der geringen Fallzahl innerhalb einzelner Altersgruppe kann die Beobachtung der fehlenden altersabhängigen Veränderungen speziell bei den IL2-R-positiven Zellen und den CD45RO(+)-Zellen vermutlich als krankheitsbedingt angenommen werden. Welche Faktoren ursächlich an den genannten Vorgängen beteiligt sein können, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### **4.2.3. Mögliche Ursache für die fehlenden altersabhängigen LS-Veränderungen**

Die Vermutung, dass schon kurz nach der Geburt bei Patienten mit CF keine ausreichende Menge immunkompetenter Zellen vorliegen, kann verworfen werden, da frühere Untersuchungen einen primären Immundefekt bei CF ausgeschlossen haben <sup>75</sup>. Dagegen spricht auch, dass die fehlenden altersabhängigen Veränderungen nur einzelne Zellreihen betreffen. Somit kommt es trotz regelrechter immunologischer Ausgangslage zu einer fehlenden Bereitstellung spezieller Subpopulationen. Deshalb könnte auch ein Reifungsdefekt der Lymphozyten angenommen werden. Infolge der Grunderkrankung ist möglicherweise eine in den Reifungsprozess eingreifende Größe gestört. Denkbar ist dies besonders für die Zytokine, die innerhalb der Lymphozytenreifung eine wichtige Steuer- und Koordinationsfunktion einnehmen und schon wiederholt als reduziert bei Patienten mit CF beschrieben wurden <sup>101,102</sup>. Außerdem könnte eine kontinuierliche Auseinandersetzung des gesamten Immunsystems mit exogenen Antigenen, wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, die Reifung der Immunzellen verzögern. Bakterielle oder virale Einflüsse könnten eine Rolle spielen. Ein Einfluss viraler Infektionen auf die Lymphozytenpopulationen wurde beschrieben <sup>81,114</sup>. Auch ein erhöhter Verbrauch als Folge der ständigen Immunantwort muss bedacht werden. Ebenfalls kann die Abspaltung einzelner CD-Oberflächenmarker eine Rolle spielen. Dies hätte zur Folge, dass die Zellen nicht mehr durchflußzytometrisch nachgewiesen werden könnten. Darauf wird in der Folge noch detailliert eingegangen.

Das CFTR-Gen wird auch in menschlichen Lymphozyten exprimiert <sup>88</sup>. Was genau der Defekt des Genes bei CF für diese Zellen bedeutet, ist noch unklar, ein Einfluss auf die Funktion oder die physiologische Lebensdauer kann aber nicht ausgeschlossen werden. So könnte das Fehlen der altersabhängigen Veränderungen bei Patienten mit CF auf den CFTR-Gendefekt zurückgeführt werden. Die Vorgänge wären damit CF-spezifisch. Zur Überprüfung dieser These wäre ein Vergleich mit der RI-Gruppe interessant, da aber in dieser Gruppe nur die ersten beiden Altersgruppen vorliegen, konnten die altersabhängigen Veränderungen nicht bestimmt werden.

Zusätzlich kann auch eine veränderte Ernährung bedingt durch die Grunderkrankung einen Einfluss auf die LS haben. Die Auswirkung nutritiver Mangelzustände auf die Lymphozyten und deren Subpopulationen wurde beschrieben <sup>31</sup>. Da ein Hauptmanifestationsort der Mukoviszidose neben der Lunge das Pankreas ist, führt beispielsweise die exokrine Pankreasinsuffizienz mit Steatorrhoe zu einem Mangel an fettlöslichen Vitaminen E, D, K und A. Nutritive Mangelzustände, die sich klinisch oft in Form von Gedeihstörungen zeigen, sind die Folge. Die Bedeutung von Zink für die zelluläre Immunität ist ebenfalls untersucht und wird im Zusammenhang mit der Besprechung der IL2-R-positiven Zellen

näher erörtert<sup>94,164</sup>. Fehlende altersabhängige Veränderungen der LS könnten also auch durch das Fehlen wichtiger Nahrungsbestandteile bedingt sein.

Als Ursache diskutiert werden muss auch die bei Patienten mit CF oft schon früh durchgeführte Antibiotikatherapie. Ein Einfluss von Antiinfektiva auf immunologische Zellpopulationen ist bekannt<sup>121</sup>. Die regelmäßig stattfindende, normalerweise über mehrere Tage oder Wochen laufende Therapie, könnte deshalb auch die Entwicklung der Lymphozyten stören und ursächlich für das Fehlen der signifikanten Veränderungen sein

Abschließend beeinflusst auch die unterschiedliche Anzahl der in den beiden Vergleichsgruppen untersuchten und statistisch ausgewerteten Patienten die gemachten Beobachtungen: 44 Patienten mit CF und 81 Kontrollpersonen gingen in die Auswertung ein. Schon alleine durch diesen quantitativen Unterschied können Signifikanzunterschiede auftreten. So war auffällig, dass die LS der Patienten mit CF im Allgemeinen weitestgehend den altersabhängigen Veränderungen der gesunden Personen folgen. Es könnte daher vermutet werden, dass die altersabhängigen Veränderungen vorhanden sind, sich aber aufgrund der kleineren Fallzahlen eben nicht signifikant im Vergleich zur Normalgruppe darstellen.



### 4.3. Vergleich der LS der Patienten mit CF und der Kontrollgruppe

Die Erstellung von Normwerten für alle untersuchten LS anhand gesunder Kontrollpersonen ermöglichte neben der schon besprochenen Untersuchung der altersabhängigen Veränderungen einen Vergleich der Normwerte mit den Werten der Patienten mit CF. Der altersunabhängige Vergleich diente dabei der Erfassung grundlegender signifikanter Unterschiede, wohingegen der altersabhängige Vergleich eine detailliertere Beurteilung erlaubte.

Vor der Besprechung der physiologischen Funktion der einzelnen untersuchten LS, der beobachteten Veränderungen bei Patienten mit CF und der möglichen Bedeutung für den Krankheitsverlauf bei Mukoviszidose, soll die Möglichkeit eines primären Immundefekt bei CF diskutiert werden.

#### 4.3.1. Gibt es einen primären Immundefekt bei Mukoviszidose?

Wie bei der Besprechung der altersabhängigen Veränderungen schon kurz erläutert, erscheint die Erklärung der in dieser Studie beobachteten LS-Veränderungen durch einen primären Immundefekt unwahrscheinlich, da die natürlichen, unspezifischen Immunitätsmechanismen, wie das Komplementsystem und die phagozytierenden Zellen, schon früher als weitestgehend normal beschrieben worden sind<sup>140</sup>. Außerdem sind die erhöhte Infektionsneigung und der inflammatorische Prozess trotz des Befalls verschiedener Organsysteme mit einem ähnlichen Sekretionsdefekt auf die Lunge beschränkt. Hier ist die Entzündungsreaktion laut der erstellten Histopathologie (s.u.) eher verstärkt. Hinzukommt, dass die gravierenden LS-Veränderungen erst im Laufe der Kindheit auftreten und eher Folge einer physiologischen Entzündungsreaktion sind. Da also vermutlich nicht von einem primären Immundefekt gesprochen werden kann, sondern eher krankheitsassoziierte Veränderungen eine wichtige Rolle spielen, werden nun die Lymphozyten und deren Subpopulationen näher untersucht.

#### 4.3.2. Lymphozyten

Lymphozyten sind für die spezifische, adaptive Immunantwort zuständig. Sie setzen sich aus Zellsubpopulationen unterschiedlicher Art zusammen.

Die vorliegende Untersuchung bestätigte die Beobachtung, dass man bei den Patienten mit CF nicht von einer allgemeinen Lymphopenie sprechen kann. Allerdings zeigten die Daten eine Erniedrigung der relativen und absoluten Lymphozyten in der Altersgruppe IV. Dies widerspricht anderen Untersuchungen, die für die zellvermittelte Immunität inklusive der Lymphozytenanzahl keine Unterschiede zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt hatten<sup>160,135</sup>. Möglicherweise lässt sich die periphere Erniedrigung der Lymphozyten auf einen Verlust oder Verbrauch einzelner Subpopulationen infolge der ablaufenden Entzündungsreaktionen erklären. Weiterhin könnte bei nicht signifikant unterschiedlicher Leukozytenanzahl eine Verschiebung in Richtung der Granulozyten, wie beispielsweise bei bakteriellen Infekten erfolgt sein. Diese sind in der Altersgruppe IV signifikant erhöht.

#### 4.3.3. B-Zellen (CD19(+)-Zellen)

Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sie differenzieren sich nach Stimulation durch spezifische Antigene weiter zu Plasmazellen, die Antikörper in großer Menge als lösliche Moleküle sezernieren. Für eine Antikörperantwort gegen die überwiegende Zahl von Antigenen benötigen die B-Lymphozyten allerdings die Hilfe von CD4(+)-T-Helfer-Zellen.

Verschiedene Studien haben bereits unterschiedliche Aspekte der antikörpervermittelten Immunität, wie beispielsweise auch die Anzahl der zirkulierenden B-Zellen bei CF als normal beurteilt<sup>60,137</sup>. Dies wurde in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt.

Welche immunologische Rolle die CD5(+)-B-Zellen spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt. Die CD5(+)-Zellen stammen aus dem Peritoneum, nehmen nicht an der adaptiven Immunantwort teil und bilden wahrscheinlich ein ontogenetisch älteres Immunsystem. Bei Geburt sind fast alle B-Zellen CD5 positiv; sie werden als polyreaktiv bezeichnet. Mit zunehmendem Alter nehmen die CD5(-)-Zellen, vermutlich infolge einer weiteren Differenzierung zum Beispiel nach Antigenkontakt zu. In dieser Studie war der Anteil der CD5(+)-B-Lymphozyten nur in der Altersgruppe III erniedrigt. Dies könnte bedeuten, dass es bei den Patienten mit Mukoviszidose durch ständigen Antigenkontakt und einen kontinuierlichen Reiz zur Immunglobulinproduktion zu einer früheren Reifung des B-Zellsystems kommt. Vielleicht wird dadurch auch die im späteren Krankheitsverlauf auftretenden Hypergammaglobulinämie erklärt<sup>86</sup>.

#### 4.3.4. T-Zellen (CD3(+)-Zellen)

Die T-Lymphozyten sind Regulator- und Effektorzellen der Immunantwort und für die zelluläre Immunantwort verantwortlich. Unterteilt werden sie in zwei Gruppen: Die T-Helfer-Lymphozyten, charakterisiert durch das CD4-Molekül, unterstützen über sezernierte Zytokine die Stimulation von B-Lymphozyten und ihre oben genannte Differenzierung in Plasmazellen (Humorale Immunantwort). Weiterhin aktivieren sie Makrophagen und andere Effektorzellen (Zellvermittelte Immunantwort). Die zytotoxischen Zellen, charakterisiert durch das CD8-Molekül, können virusinfizierte Zellen zerstören. In der weiteren Unterteilung finden sich auch T-Suppressor-Zellen, die eine Immunantwort unterdrücken können.

Bezüglich der T-Zellen bestätigte die vorliegende Arbeit weitestgehend die Feststellung früherer Arbeiten, die im Vergleich der Patienten mit CF und der Kontrollgruppe keinen grundsätzlichen signifikanten Unterschied der Anzahl der T-Lymphozyten beschrieben haben<sup>60</sup>. Eine Veränderung innerhalb der Lymphozytensubpopulation mit einem Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Mukoviszidose wird dadurch aber nicht ausgeschlossen.

Im folgenden wird auf die einzelnen Subpopulationen der T-Lymphozyten genauer eingegangen.

#### 4.3.5. CD4(+)-T-Lymphozyten / CD8(+)-T-Lymphozyten / CD4(+)/CD8(+)-Ratio

Wie in der Einleitung beschrieben, werden die CD4(+) T-Lymphozyten durch ihre spezifische Zytokinproduktion in zwei funktionell unterschiedliche Populationen, die  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Helferzellen, unterteilt<sup>128</sup>. Zwischen den beiden Populationen existiert eine gegenseitige Beeinflussung im Sinne einer Hemmung. Somit wird frühzeitig festgelegt, ob eine Immunantwort vorwiegend humoral oder zellulär ist. Studien haben belegt, dass in der Lunge aufgrund verschiedener Einflüsse bevorzugt eine  $T_H2$ -Immunantwort abläuft<sup>21,23,155</sup>. Die von  $T_H2$ -Zellen sezernierten Zytokine unterstützen die B-Zellen bei der Aktivierung und Differenzierung in antikörpersezernierende Zellen.

Die wichtigste Aufgabe der zytotoxischen Zellen ist das Abtöten virusinfizierter Zellen. Nach ihrer Oberflächenmarkerexpression können verschiedene Unterklassen der CD8(+)-Zellen bestimmt werden. Dazu gehören die CD11b(+)/CD8(+)-Zellen, die eine suppressorische Wirkung auf das Immunsystem zu haben scheinen, die CD11b(-)/CD8(+)-zytotoxischen-Zellen und die CD57(+)/CD8(+)-Zellen, die nach neueren Untersuchungen möglicherweise die Bildung der zytotoxischen T-Lymphozyten supprimieren<sup>153</sup>.

Die vorliegende Studie zeigte eine Erhöhung des prozentualen Anteils der CD4(+)-Zellen an den Lymphozyten in den Altersgruppen II und III, sowie eine Erniedrigung ihrer Absolutzahl in der Altersgruppe IV. Der prozentuale Anteil der CD8(+)-Zellen an den Lymphozyten war dagegen in der Altersgruppe II erniedrigt, wie auch die Absolutzahl/ $\mu$ l dieser Zellen in Altersgruppe IV.

Diese Ergebnisse widersprechen anderen Studien: Während *Van Geffel* et al. weder für CD4(+)- und CD8(+)- Zellen noch für die CD4/CD8-Ratio einen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit CF und den Kontrollpersonen feststellen konnten (das Alter der untersuchten Personen wird in dieser Arbeit nicht genannt)<sup>152</sup>, fanden weitere Studien eine signifikante Erniedrigung der CD8(+)-Zellen<sup>135</sup>. *Knutsen* et al. schließlich wiesen eine signifikante Erniedrigung des prozentualen Anteils der CD4(+)-Zellen an den Lymphozyten nach<sup>72</sup>.

Für die Erhöhung könnten die in früheren Studien beobachteten unterschiedlichen Verläufe der proliferativen Antwort der CD4- und CD8-positiven T-Zellen auf eine Infektion verantwortlich sein. Die Aktivierung der CD4-Zellen erfolgt im Vergleich zu CD8-Zellen schneller<sup>83</sup>. Außerdem wurde eine höhere Aktivierungsschwelle der naiven CD8(+)-Zellen für die Umwandlung in zytotoxische Effektorzellen beschrieben. Auf diese Vorgänge und die Möglichkeit der Abspaltung einzelner Oberflächenmarker durch Leukozytenelastase wird im folgenden noch eingegangen werden.

Die CD57(+)/CD8(+)- und CD57(+)/CD8(-)-Lymphozyten waren nur in der Altersgruppe II signifikant erniedrigt. Eine große Anzahl CD57(+)/CD8(+)-Zellen korrelierte in früheren Studien mit einer verringerten Fähigkeit eine Zytomegalievirusinfektion zu bekämpfen<sup>122</sup>. Die hier festgestellte Erniedrigung könnte eine gegenteilige Wirkung haben und bedeuten, dass der suppressorische Effekt auf die zytotoxischen Zellen wegfällt, was zu einer gesteigerten Immunantwort und zur beschriebenen Persistenz der pulmonalen Entzündungsreaktion beitragen könnte. Die Funktion der CD57(+)/CD8(-)-Zellen im

Rahmen der immunologischen Abwehr ist noch unklar. Bei den Patienten mit CF machen sie aber eine ähnliche Veränderung durch wie die CD57(+)CD8(+)-Zellen, so dass ein Zusammenspiel der beiden Zellpopulationen möglich ist.

Die CD11b(-)CD8(+)-Zellen waren in den Altersgruppen II und III der Patienten mit CF reduziert. Dies widerspricht Untersuchungen bei Patienten mit BOOP und Panbronchiolitis, die im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen keinen Unterschied im prozentualen Anteil der peripheren CD11bCD8-Zellen aufwiesen<sup>66,103</sup>.

Abschließend muss festgehalten werden, dass die immunologische Funktion der CD8-Untergruppen noch unzureichend bekannt ist. Auch die hier gewonnenen Ergebnisse lassen keine eindeutige Interpretation zu. Sie können aber zum allgemeinen Verständnis beitragen.

#### **4.3.6. HLA-DR(+)-Zellen**

Bei HLA-DR handelt es sich um einen Oberflächenmarker, der durch aktivierte T-Lymphozyten verstärkt exprimiert wird. Hauptsächlich bei Virusinfektionen findet sich eine verstärkte HLA-DR Expression besonders auf den CD8(+)-T-Lymphozyten.

In dieser Untersuchung war der prozentuale Anteil der HLA-DR(+)-Zellen an der Gesamtmenge der CD3-Zellen in der Altersgruppe II reduziert.

Einerseits könnte dies bedeuten, dass bei Patienten mit Mukoviszidose auf eine Virusinfektion eine reduzierte oder fehlerhafte Aktivierung erfolgt. Da aber andererseits der HLA-DR-Rezeptor hauptsächlich auf CD8(+)-T-Lymphozyten exprimiert wird, könnte die beobachtete Erniedrigung dieser Zellen auch Folge der gleichzeitigen Abnahme der CD8(+)-Zellen sein.

#### **4.3.7. Natürliche Killerzellen (CD16(+)/CD56(+)-Zellen)**

Neben den antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten sind die Natürlichen Killerzellen (NK) zur Abtötung von Zellen fähig. Im Gegensatz zu den Zellen des adaptiven Immunsystems besitzen sie jedoch keine große Vielfalt an Rezeptorspezifitäten, da ihre zytotoxische Aktivität unabhängig von einem vorausgegangenen spezifischen Antigenkontakt ist. NK-Zellen können Zellen, die mit einem Virus oder einem intrazellulären Bakterium infiziert sind, sowie bestimmte Tumorzellen erkennen und lysieren.

Wie genau die NK-Zellen ihre Zielzellen erkennen, ist noch unklar, es gibt aber Hinweise, dass die Erkennung auch über MHC-codierte Strukturen erfolgt<sup>3</sup>. Außerdem haben Rezeptoren, die auf den NK-Zellen exprimiert werden, eine Bedeutung für die Wirkung der NK-Zellen. Dazu gehört auch der Fc $\gamma$ -Rezeptor III (CD16), der vor allem IgG1- und IgG3 Antikörper bindet, wenn sie an ein Antigen gebunden sind. Es erfolgt eine Vernetzung der CD16-Moleküle, was zur Aktivierung der NK-Zellen führt, die dann ihre zytotoxische Wirkung entfalten können („antibody-dependent-cell-mediated cyto-

xicity“, ADCC). Die zytotoxische Aktivität kann durch bestimmte Zytokine wie Interferone, TNF- $\alpha$  und IL-2 gesteigert werden.

In der vorliegenden Arbeit waren die CD16(+) $56(+)$ -Zellen pro  $\mu$ l, der relative Anteil der CD3(+) $CD16(+)$  $56(+)$ -Zellen und ihre Absolutzahl ab der Altersgruppe II erniedrigt.

Dies widerspricht der Arbeit von *Smith* et al., in der keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe bezüglich der NK-Zellen beschrieben wurden<sup>135</sup>. Eine verminderte NK-Anzahl könnte eine Schwächung der nicht-adaptiven Immunität bei Patienten mit Mukoviszidose bedeuten. Es sind verschiedene NK-Zellen bekannt, hier kann aber nur der Anteil der NK-Zellen diskutiert werden, der mit Hilfe von CD16 und Gammaglobulinen opsoniert. Eine Verminderung dieser Zellen könnte bei CF möglicherweise eine reduzierte zytotoxische Aktivität bedeuten, da bei Rezeptormangel weniger Aktivierung erfolgt. Eine Erniedrigung des prozentualen Anteils der CD16(+) $CD56(+)$ -Zellen an den Lymphozyten wurde auch bei gesunden Rauchern beschrieben<sup>29</sup>.

Laut *Mocchegiani* et al. könnte auch ein gestörter Zinkstoffwechsel, der bei Patienten mit CF diskutiert wird, die Ursache der Erniedrigung der NK-Zellen sein oder zumindest daran beteiligt sein<sup>94</sup>. Auf diesen Punkt wird in der folgenden Besprechung der IL-2R-Zellen noch näher eingegangen.

#### 4.3.8. IL-2R-Zellen (CD3(+) $CD25(+)$ -Zellen)

Der IL-2 Rezeptor wird von T-Lymphozyten gebildet, wenn sie durch ein Antigen aktiviert werden. Im Gegensatz zu den HLA-DR positiven Zellen wird der IL-2 Rezeptor bei bakteriellen Infekten verstärkt produziert. IL-2R-positive Zellen stimulieren die Sekretion von IL-2, dem wichtigsten Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigte vor allem in Altersgruppe IV der Patienten mit CF eine Erniedrigung der CD25(+)-T-Zellen. Diese Beobachtung war besonders unter der Betrachtung der Schwere des Entzündungsprozesses überraschend. Sie könnte bedeuten, dass bei den Patienten mit CF überwiegend nicht-bakterielle, also virale Infekte eine Rolle spielen. Allerdings spricht sowohl die klinische Erfahrung als auch eine fehlende parallele Hochregulation der HLA-DR positiven Zellen (s.o.), wie man sie bei viralen Infektionen beobachtet hat, gegen dieses Überlegung. Es wurde im Gegenteil eine Erniedrigung beobachtet. Vielleicht kann bei den Mukoviszidosepatienten deshalb eine verminderte Aktivierung der IL-2R-Zellen angenommen werden, besonders auffällig im höheren Alter (hier AG IV), also bei fortgeschrittener Erkrankung.

Als eine Ursache beschrieben *Mocchegiani* et al. auch hier eine positive Korrelation zwischen der bei Patienten mit CF erniedrigten Zink-Konzentration und der erniedrigten IL-2 Aktivität.<sup>94</sup> Ein Zinkdefizit wurde schon wiederholt als Ursache für Thymusatrophie, Lymphopenie und Veränderungen verschiedener LS verantwortlich gemacht<sup>43</sup>. Möglicherweise könnten auch die in dieser Arbeit beobachteten peripheren Erniedrigungen, zusammen mit der schon erwähnten Reduktion der NK-Zellen, dadurch begründet sein. Eine parallele Bestimmung der Zinkkonzentration im Blut der Patienten, die diese

Vermutung unterstützen könnte, erfolgte aber nicht. Eine Studie mit oraler Gabe von Zink im Vergleich mit einem Placebo ergab keinen positiven Effekt auf den klinischen Status oder die Lungenfunktion<sup>124</sup>. Eine differenzierte Untersuchung der Veränderungen der peripheren Lymphozyten nach oraler Zinkgabe erfolgte bei der Studie von *Safai-Kutti et al.* aber nicht.

Weitere mögliche Ursachen, die für eine periphere Erniedrigung der IL-2(+)-Zellen verantwortlich sein könnten, werden im Zusammenhang mit den CD4(+)/CD45RO(+)-Zellen besprochen.

#### **4.3.9. Naive- und Memory-T-Zellen (CD4(+)/CD45RA(+)- / (CD4(+)/CD45RO(+)-Zellen)**

Für CD4-positive T-Zellen ist bekannt, dass sie phänotypisch durch die unterschiedlich starke Expression von zwei Isoformen von CD45 in die Untergruppen CD45RA(+) und CD45RO(+) eingeteilt werden können. Beide sind Teil des zellulären immunologischen Gedächtnis. Naive T-Zellen exprimieren die CD45RA-Isoform in hoher Dichte, während CD45RO nur in geringer Dichte vorkommt. Auf der anderen Seite ist für die Memory-T-Zelle eine hohe Dichte an CD45RO und eine geringe Expression von CD45RA typisch. Untersuchungen ergaben, dass sich CD45RO positive Zellen schnell teilen, eine kurze Lebensdauer haben und laut in-vitro Untersuchungen eine schnelle Antigen-Antwort aufweisen<sup>96</sup>.

Auffällig im Ergebnis der vorliegenden Studie war bezüglich der CD45RA/RO-Zellen der deutlich erniedrigte Wert der peripheren CD45RO-positiven Memory-T-Helfer-Zellen, besonders in den Altersgruppen II und IV. Parallel dazu lagen die CD45RA-positiven Zellen jeweils im Normbereich, beziehungsweise waren in der Altersgruppe III erhöht.

Welche pathophysiologischen Vorgänge im einzelnen Auslöser für die CD45RA/CD45RO-Veränderungen bei CF und den rezidivierenden Infekten sind, ist noch unklar. Folgende Erklärungsansätze bieten sich an:

Beide Zelltypen sind an der Gedächtnisreaktion beteiligt. Gedächtniszellen benötigen im Vergleich zu naiven T-Zellen für ihre Aktivierung eine geringere Antigenkonzentration, was eine schnellere effektive immunologische Abwehr zur Folge hat. Eine verringerte Konzentration der CD45RO(+)-Gedächtniszellen im peripheren Blut vor allem der Patienten in den AG III und IV könnte bedeuten, dass bei den Patienten mit CF eine defekte Bildung des immunologischen Gedächtnis vorliegt. Infolgedessen wäre die immunologische Abwehr reduziert. Möglicherweise liegt eine fehlenden Aktivierung oder eine mangelnden Koordination der Abläufe vor, so dass keine Umwandlung der CD45RA(+)-Zellen in die CD45RO(+)-Zellen erfolgen kann.

*Döring et al.* beschrieben eine Abspaltung von Lymphozytenoberflächenmarkern (CD2, CD4, CD8) durch Leukozytenelastase und Cathepsin G. Dies könnte dazu führen, dass die Zellen bei der Färbung mit monoklonalen Antikörpern und einer anschließenden durchflußzytometrischen Bestimmung unentdeckt bleiben, was zu einer scheinbaren Verminderung der absoluten und relativen Anzahl die-

ser LS führen würde. Um den beschriebenen Einfluss der Elastase möglichst gering zu halten, wurden deshalb in der vorliegenden Studie nur Patienten mit stabilen klinischen Parametern (CRP <15mg/l) und fehlenden Anzeichen einer pulmonalen Exazerbation ausgewertet. Weiterhin hatte die von *Döring* et al. durchgeführte Untersuchung eine auf Sputum und Bronchoalveolarflüssigkeit beschränkte Ablösung ergeben, weshalb die Abspaltung der Oberflächenmarker im peripheren Blut als Erklärungsmöglichkeit also vermutlich wegfällt. Die Antigenexpression der Lymphozyten im Blut wies keinen Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen auf. Ergänzend hätte die Abspaltung der CD4-Oberflächenmarker auch zu einer veränderten Anzahl CD4CD45RA-positiven Zellen geführt, die jedoch normal war. Schließlich zeigt die Immunfärbung des Lungengewebes, wo die CD4-Abspaltung in vivo laut *Döring* et al. besonders intensiv hätte sein müssen, eine große Menge an CD4-Zellen.

Als weitere Ursache für die periphere Erniedrigung der CD45RO-Zellen bei Patienten mit CF kommt außerdem eine reduzierte physiologische Umwandlung der CD45RA- in die CD45RO-Form infolge einer kontinuierlichen Antigenbesiedlung in Betracht. Es wird eine Umwandlung der CD45RA-positiven in die CD45RO-positive Form über eine nicht näher definierte Zwischenform diskutiert<sup>79</sup>. Diese Expression der CD45RO-Isoform ist vermutlich reversibel<sup>91</sup>. Die Umwandlung ist laut *Bunce* et al. antigenabhängig, da bei Abwesenheit eines Antigens ein komplette Rückbildung erfolgt, wohingegen persistierender Antigenkontakt die Rückbildung verhindert<sup>14</sup>.

Darüber hinaus kommt für die Abnahme der CD45RA/RO-positiven Zellen und weiterer LS eine pulmonale Ansammlung in Frage. Darauf wird im folgenden weiter eingegangen.

#### 4.4. Immunhistochemische Untersuchung von CF-Lungengewebe

Die pulmonale Immunabwehr setzt sich aus einer Vielzahl einzelner immunologischer Vorgänge zusammen, an denen auch die T-Lymphozyten beteiligt sind. Beispielsweise finden sich vermutlich im Rahmen der Immunüberwachung Ansammlungen aktivierter T-Zellen und Memory-T-Zellen in den Lungen gesunder Nichtraucher<sup>39</sup>. Zellakkumulationen treten aber auch in Bereichen akuter oder chronischer Entzündungen auf<sup>69,97</sup> und tragen zur Pathogenese von Asthma, Sarkoidose und Atemwegsobstruktionen bei Rauchern bei<sup>61,123</sup>. Laut *Gruber* et al. und *Gerblich* et al. geht die Ansammlung von T-Zellen in der Lunge parallel mit einer Abnahme in der Peripherie einher<sup>52,46</sup>.

Verschiedene Studien sprechen außerdem für die Entwicklung eines Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes in der CF-Lunge: Das von *Bienenstock* et al. erstmals an Tieren beschriebene BALT („bronchus-associated-lymphoid-tissue“) ist charakterisiert als Lymphgewebe in der Lunge<sup>8,9</sup>. Es scheint anlog zu sein zum Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe („gut-associated-lymphoid-tissue“, GALT). Obwohl sich in der normalen menschlichen Lunge kein bronchusassoziiertes lymphatisches Gewebe beobachten lässt<sup>150</sup>, haben Studien gezeigt, dass sich BALT durch verschiedene pathologische Mechanismen wie chronische respiratorische Infektionen, selektive Immundefizite und Autoimmunerkrankungen mit intrapulmonaler Zellproliferation ausbilden kann<sup>90,120</sup>. Beschrieben wurde es auch bei Rauchern und Patienten mit chronischer Hypersensitivitätspneumonie<sup>143,118</sup>. BALT

spielt eine wichtige Rolle bezüglich der Antigenaufnahme und der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort in der Lunge<sup>113,154</sup>.

Um die peripheren Veränderungen der LS bei den Patienten mit CF besser im Zusammenhang mit der pulmonalen Entzündungsreaktion beurteilen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung von CF-Lungengewebe durchgeführt. Hierbei erfolgte insbesondere eine gezielte Untersuchung der CD45RA(+)- und CD45RO(+)-T-Zellen. Im Ergebnis zeigte sich im CF-Lungengewebe eine Ansammlung einzelner Lymphozytensubpopulationen. Bei dem Patienten Nummer 1 fand sich eine ausgeprägte interstitielle Ansammlung von CD56(+)-Zellen, sowie vereinzelte CD4(+)-CD45RA(+)-Zellen. Bei den Patienten Nummer 2 bis Nummer 4 ergab sich eine interstitielle Akkumulation von CD4- und CD45RO-positiven Zellen und eine Ansammlung von CD20(+)-B-Zellen und Plasmazellen. Nur bei Patient Nummer 2 fanden sich zusätzlich ausgeprägte CD8(+)-Zellansammlungen.

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass chronische Lungenentzündungen, wie sie bei Mukoviszidose ablaufen, zu einer Ansammlung von Lymphozyten in der Lunge führen. Möglicherweise betrifft die pulmonale Ansammlung und die periphere Abnahme besonders die LS, die wichtig für die pulmonale Infektionsabwehr sind. Den CD4(+)-CD45RO(+)-Zellen kommt dabei scheinbar eine besondere Bedeutung zu, da hier die Akkumulation am deutlichsten zu beobachten war. Außerdem kann dadurch wahrscheinlich auch die Reduktion der IL-2R(+)-Zellen erklärt werden, da die CD4(+)-CD45RO(+) positiven Memory-T-Zellen als aktivierte T-Zellen einen relativ großen Anteil an den peripheren IL-2R positiven T-Zellen haben<sup>144</sup>. Eine periphere Erniedrigung beider Zelltypen könnte so durch eine pulmonale Ansammlung erklärt werden. Eine defekte Umwandlung der CD45RO-Isoform oder eine Apoptose zu stark aktivierter CD45RO-positiver Zellen als Erklärung für die periphere Abnahme dieser Zellen ist somit unwahrscheinlich.

Die festgestellte Abnahme der CD8-positiven Zellen und der NK-Zellen in der Peripherie kann demnach nicht alleine durch eine Ansammlung in der Lunge erklärt werden, da diese Zellen bei unseren Untersuchungen nur vereinzelt im Lungengewebe des Patient 1 (NK-Zellen) und Patient 2 (CD8-positiv Zellen), jedoch nicht bei den Patienten 3 und 4 nachgewiesen werden konnten. Eine ausschließliche Erniedrigung zugunsten der CD4-Zellen, wie oben beschrieben, ist eher unwahrscheinlich.

*Slavin et al.* wiesen auch CD8-positive Zellen und vereinzelte NK-Zellen im Lungengewebe eines Patienten mit bronchopulmonaler Aspergillose und CF nach<sup>132</sup>. Möglicherweise sammeln sich diese Zellen im Lungengewebe von Patienten mit leichteren Entzündungsvorgängen, wie den untersuchten Patienten 1 und 2. Im weiteren Verlauf der Entzündung bleiben sie möglicherweise nicht im Lungengewebe, sondern wandern in das Atemwegslumen, wo sie infolge der Immunabwehr verbraucht werden oder nach Abspaltung von CD8-Oberflächenmarkern unentdeckt bleiben. Ein solcher Vorgang wurde in der Bronchoalveolarflüssigkeit (BALF) von Patienten mit CF und auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen wie der exogen-allergischen Alveolitis beschrieben. In der BALF scheinen



CD8 positive Zellen den Hauptanteil an T-Zellen zu bilden, und laut *Döring* et al. erfasst dort die Abspaltung mehr als 90% der Oberflächenantigene auf diesen T-Zellen<sup>35</sup>.

Weiterhin ist eine Akkumulation von CD45RO-positiven Zellen in parafollikulären Bereichen, Alveolarsepten und der bronchialen Submukosa typisch für BALT und Lymphozyten-Migration im Mukosagebe. Gleiches gilt für ein Überwiegen von CD20 positiven B-Zellen in der follikulären Gegend und subepitheliale Plasmazellinfiltrate<sup>15</sup>. Somit bestätigen die in dieser Studie gemachten Beobachtungen frühere Studien, die festgestellt hatten, dass es auch bei Patienten mit CF vor allem in Anwesenheit von *Pseudomonas aeruginosa* zu einer BALT-Ausbildung kommt<sup>62</sup> und dass dieses eine wichtige Bedeutung für die lokale Immunabwehr hat<sup>6</sup>. Auch bestätigt die in dieser Studie festgestellte Verteilung der Lymphozyten und die große Menge der Plasmazellen im Lungengewebe die These einer T<sub>H</sub>2-Entzündungsantwort bei CF<sup>99</sup>. Diese wurde auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen wie beispielsweise der allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (APBA), Asthma bronchiale und RSV-Bronchiolitis beschrieben<sup>57,74,131</sup>.

Zusammenfassend ließen sich in den Lungen von Patienten mit CF ein Pooling bestimmter Lymphozytensubpopulationen und eine BALT-Bildung beobachten. Diese Vorgänge können wahrscheinlich prinzipiell als physiologisch angesehen werden. Eine so exzessive Aktivierung des BALT ist bei gesunden Personen aber noch nicht beobachtet worden, obwohl das Ausmaß der physiologischen BALT-Aktivierung noch nicht klar definiert wurde. Ebenso ist eine pulmonale Ansammlung von CD4CD45RO-positiven Zellen, welche gleichzeitig zu einer peripheren Abnahme führt, bei Patienten mit CF oder schweren, pulmonalen Erkrankungen unbekannt.

Vermutlich liegen also weitere, noch nicht klar definierte Faktoren vor, die zur pathologischen Persistenz der Entzündungsreaktion und schließlich zu einer kontinuierlichen Destruktion der Lunge führen. Die genaue Festlegung dieser Faktoren steht noch aus. Verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel eine CD4-Zellen dominierte Immunantwort verstärkt durch das *Pseudomonas*-Exoenzym S könnten aber beteiligt sein. Darauf wird im folgenden noch eingegangen.

Ob die beschriebenen Vorgänge und die daran beteiligten LS CF-spezifische Veränderungen zeigen oder ob es sich dabei eher um physiologische Normabweichungen im Zuge einer Entzündungsreaktion handelt, soll der Vergleich mit Patienten mit rezidivierenden Infekten zeigen.

#### **4.5. Vergleich mit der Gruppe der rezidivierenden Infekte (RI)**

Grundsätzlich fanden sich bei der Gruppe mit den rezidivierenden Infekten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe Veränderungen der peripheren LS, die denen der Patienten mit CF weitestgehende entsprechen. Obwohl der Vergleich auf die Altersgruppen I und II begrenzt war, ergaben sich vor allem in der Altersgruppe II folgende in beiden Vergleichsgruppen übereinstimmende Veränderung: Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen und absoluten CD3(+)/CD16(+)/CD56(+)-Zellen, der

HLA-DR(+)-Zellen in CD3 gesamt, der CD8(+)-Zellen, der CD57(+)/CD8(+)-Zellen und der CD45RO(+)-Zellen. Außerdem wiesen beide Gruppen eine Erhöhung der CD4/CD8-Ratio auf.

Diese Beobachtung weist darauf hin, dass es sich bei den bei Patienten mit CF gefundenen Veränderungen der LS nicht um CF-spezifische Veränderungen handelt, sondern um einen physiologischen Prozess, der bei schweren Lungenentzündungen abläuft. Veränderungen der LS bei Patienten mit CF sind also wahrscheinlich nicht, wie oben vermutet, Folge einer spezifischen Hoch- oder Herabregulierung, einer defekten Aktivierung oder eines Reifungsdefektes.

Die Erkrankungsdauer selbst scheint für das Auftreten der peripheren LS-Veränderungen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Lungenerkrankung der Gruppe der rezidivierenden Infekte nur seit Monaten bis wenige Jahre bestand. Dennoch könnte die Chronizität der bei CF in der Lunge ablaufenden Entzündung für die sekundär auftretenden Lungenschäden und damit für den Krankheitsverlauf der Mukoviszidose verantwortlich zu sein.

Auf die Bedeutung der CD4(+)-Zellen an der Persistenz der pulmonalen Entzündungsreaktion bei Patienten mit CF wird unten noch näher eingegangen. Der prozentuale Anteil der CD4(+)-Zellen an den Lymphozyten war in der Altersgruppe II und III der Patienten mit CF erhöht, wobei bei der RI-Gruppe keine Veränderungen festgestellt werden konnte, so dass hier möglicherweise eine CFTR-spezifische Veränderung vorliegt.

#### 4.6. Bedeutung der Beobachtungen für die Pathophysiologie bei CF:

Die Ergebnisse dieser Studie werden nun im Zusammenhang der geltenden pathophysiologischen Konzepte der Mukoviszidose diskutiert. Besonders eingegangen wird auf die Bedeutung der Lymphozytensubpopulationen an diesen Vorgängen.

Eine klonale Proliferation verschiedener T-Zellpopulationen im Verlauf einer Immunantwort ist lange bekannt, aber erst neuere Studien beschäftigten sich speziell mit den Regulationsmechanismen der einzelnen T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Immunreaktion. Untersucht wurde beispielsweise die klonale Expansion der CD8(+)- und CD4(+)-Zellen nach Antigenstimulation und deren weiterer Einfluss auf die Immunantwort. Studien an Patienten mit Grippevirus- und RS-Virusinfektion sprechen dafür, dass die CD4(+)- und CD8(+)-Zellen unterschiedlich auf eine Antigenstimulation reagieren<sup>33,85</sup>. Speziell bei einer akuten Infektion scheinen die CD8(+)-T-Zellen eine schnellere und ausgedehntere Proliferation durchzumachen, wohingegen die CD4(+)-T-Zellen langsamer und nicht so ausgedehnt proliferieren. Ursächlich wird hier zum Beispiel eine erhöhte Apoptoserate und eine uneffiziente Zytokinsteuerung der Proliferation der CD4-Zellen diskutiert. Eine chronische Antigenstimulation über mehrere Jahre hinweg scheint sich aber positiv auf die CD4-Proliferation auszuwirken, da dann die beobachteten Proliferationsunterschiede für CD4- und CD8-Zellen geringer ausfallen und beide Zellpopulationen eine ähnliche Entwicklung durchmachen<sup>83</sup>.

Die Bedeutung von *Pseudomonas aeruginosa* für die in der Lunge ablaufenden Immunvorgänge ist noch nicht eindeutig geklärt. Fast alle Patienten mit CF sind im Alter von 11 Jahren mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert<sup>75</sup>. Die PA-Besiedlung führt zu einer Vielzahl an Komplikationen im CF-Krankheitsverlauf und trägt so entscheidend zur Morbidität und Mortalität bei<sup>110</sup>. Eine definitive Eradikation ist kaum möglich. Welche Faktoren die frühe Erstinfektion begünstigen und welche vor allem für die Persistenz von PA verantwortlich sind, ist noch unklar. Daran beteiligt sind wahrscheinlich verschiedene Einflüsse, wie zum Beispiel das Exoenzym S und die T<sub>H</sub>2-Entzündungsreaktion der Lunge.

So untersuchten neuere Studien den Einfluss des Exoenzym S auf die T-Zellaktivierung und -proliferation<sup>13</sup>. Für das Exoenzym S war früher ein proliferativer Effekt auf die menschlichen T-Zellen beschrieben worden<sup>95</sup>. Klinisch zeigte sich außerdem, dass eine akute Verschlechterung der Lungenfunktion mit einer erhöhten Menge an Exoenzym S einherging. Im Gegensatz dazu ging eine klinische Besserung nach antibiotischer Therapie mit einer verminderten Menge an Exoenzym S einher<sup>50,51</sup>. Der Bakterienload blieb aber unverändert. Zusammenfassend scheint das PA-Exoenzym S also einen entscheidenden Einfluss auf die pulmonalen Entzündungsvorgänge zu haben.

*Bruno et al.* untersuchten den Einfluss des Exoenzym S speziell in Hinblick auf die LS. Sie konnten zeigen, dass es eine Proliferation immunologisch naiver T-Zellen hervorruft, dass das Exoenzym S als T-Zell-Mitogen funktioniert und dass besonders die CD4(+)-T-Zellen angeregt werden. Die mitogene Aktivität scheint spezifisch für T-Zellen zu sein, diese unterstützen aber wiederum die B-Zellaktivität. Die von *Bruno et al.* gemachten Beobachtungen bestätigen frühere Untersuchungen, die die T-

Zellaktivierung als einen wichtigen Bestandteil der pulmonalen Entzündung bei Patienten mit CF beschrieben haben<sup>2,25</sup>.

Als ein weiterer Einfluss auf die *Pseudomonas-aeruginosa*-Persistenz bei CF wird das Vorherrschen einer T<sub>H</sub>2-Entzündungsreaktion bei Mukoviszidose gewertet. Moser et al. untersuchten im Tiermodell den Einfluss einer T<sub>H</sub>1- und einer T<sub>H</sub>2-Entzündungsantwort auf eine chronische PA-Lungeninfektion<sup>98</sup>. Sie stellten fest, dass in den T<sub>H</sub>1-Mäusen im Vergleich zu den T<sub>H</sub>2-Mäusen eine geringere Mortalität vorlag, dass die Lungenentzündung milder ausfiel, eine effektivere PA-Clearance stattfand und mehr INF- $\gamma$  beziehungsweise weniger IL-4 produziert wurde. Somit war der Ablauf der PA-Lungeninfektion bei T<sub>H</sub>1-Mäusen insgesamt weniger schwer.

In der vorliegenden Studie war in den Altersgruppen II und III eine Erhöhung des prozentualen Anteils der CD4(+)-Zellen pro Lymphozyten festgestellt worden. Interessanterweise sind die CD8(+)-Zellen pro Lymphozyten nur in der Altersgruppe II erhöht.

Diese Beobachtungen widersprechen zum Teil den bisherigen Studien. Grundsätzlich ist eine Expansion der CD4(+)- und CD8(+)-Zellen nach Antigenkontakt zu erwarten<sup>83</sup>, diese Expansion würde wie oben beschrieben aber im stärkeren Maße die CD8(+)-Zellen betreffen. Ebenso wäre eine langfristige Proliferation eher bei den CD8(+)-Zellen zu erwarten. Bei einer chronischen Antigenexposition besteht noch die Möglichkeit, dass sich die Proliferationsrate beider LS anpasst, ein Überwiegen der CD4(+)-Zellen ist aber ungewöhnlich. Möglicherweise liegt also bei den Patienten mit CF eine pathologisch persistierende CD4-Zellexpansion vor.

Als Ursache für die ungewöhnliche Persistenz der CD4(+)-Entzündungsreaktion müssen mehrere Faktoren angenommen werden, wie zum Beispiel die kontinuierliche Anwesenheit von *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge von Patienten mit CF oder auch ein CFTR-spezifischer Defekt noch unklarer Art.

Die erhöhte Anzahl der CD4(+)-Zellen pro Lymphozyten in den Altersgruppen II und III könnten beispielsweise durch eine Exoenzym-S-induzierte-Proliferation erklärt werden, da diese wie von Bruno et al. beschrieben, besonders die CD4-T-Zellen betrifft<sup>13</sup>. Als Mitogen würde das Exoenzym S auch zu einer Chronifizierung der Entzündung bei CF führen, das dessen Proliferationsanregung infolge der Unfähigkeit der Lunge, eine effektive Immunabwehr gegen PA aufzubauen, persistiert. An der *Pseudomonas aeruginosa*-Persistenz wiederum könnten mehrere Faktoren beteiligt sein: Zum einen die in der CF-Lunge ablaufende T<sub>H</sub>2-Entzündungsantwort mit ihrem schweren Entzündungsverlauf und zum anderen die in der Lunge stattfindenden Reparaturprozesse, welche sich durch eine ständige Expression des asialo GM1-Membranproteins auszeichnen. Dieser fördert ebenfalls die PA-Adhärenz im Lungengewebe<sup>28</sup>. Möglicherweise wird so eine Art „Circulus vitiosus“, bestehend aus sich gegenseitig beeinflussender PA-Resistenz und gesteigerter Entzündung, hervorgerufen, durch den die CD4-Proliferation immer weiter fortschreitet.

Abgesehen von den genannten Vorgängen muss auch ein CFTR-spezifischer Defekt als Ursache für die CD4-Dominanz diskutiert werden. Neben der Lunge sind noch weitere Organe bei Patienten mit CF entzündlich verändert, es wurde aber noch nicht geklärt, ob auch in diesen Vorgängen eine CD4-Dominanz zu vorliegt. Dies würde für einen CFTR-spezifischen Defekt sprechen, da die *Pseudomonas*-Infektion primär endobronchial lokalisiert ist und praktisch nie zu systemischen oder disseminierten Infektionen führt. Sie würde als alleiniger Triggerfaktor der CD4-Proliferation dort ausscheiden. Möglicherweise führt der Gendefekt über den defekten Chloridkanal in den Zellen selber oder durch einen anderen, noch unbekanntem Mechanismus zur CD4-dominierten Entzündungsreaktion bei CF. Auch ein Einfluss des Gendefektes auf die in die Regulation der Entzündungsreaktion eingreifenden Zytokine, wie  $\text{IFN-}\gamma$  oder IL-10, mit sekundär gesteigerter CD4-Proliferation könnte möglich sein. Dysregulationen und reduzierte Mengen der an der Entzündungsreaktion beteiligten Zytokine ( $\text{IFN-}\gamma \downarrow$ /IL-10 $\uparrow$ ) wurden beschrieben<sup>101,102</sup>.

#### 4.6.1. Auswirkungen der CD4-Dominanz auf die Entzündungsvorgänge in der Lunge

Das Vorherrschen von CD4-positiven Zellen, möglicherweise bedingt durch das *Pseudomonas* Exoenzym S, hätte verschiedene immunologische Mechanismen zur Folge, die die pulmonale Entzündungsreaktion und den Krankheitsverlauf bei CF entscheidend beeinflussen: Die in der Lunge vorhandenen CD4(+)-T-Zellen differenzieren sich aufgrund verschiedener im Einleitungsteil beschriebener Faktoren bei Patienten mit CF vornehmlich zu  $T_H2$ -Helfer-Zellen. So wird die ablaufende  $T_H2$ -Entzündungsreaktion vermutlich über IL-4- und IL-6-Sekretion verstärkt. Dies führt außerdem zu einer klonalen Expansion der B-Zellen und damit zu einer ebenfalls gesteigerten humoralen Immunantwort. Als Folge des Überwiegens der  $T_H2$ -Reaktion wird im Gegenzug die  $T_H1$ -T-Helfer-Reaktion blockiert. Dies führt zu einer reduzierten Sekretion von IL-2 und  $\text{IFN-}\gamma$ , was wiederum durch verminderte Aktivierung von T-Zellen, NK-Zellen und mononukleärer, phagozytischer Zellen einen negativen Einfluss auf die pulmonale Abwehr hat und eventuell auch zur PA-Persistenz beiträgt.

Außerdem erfolgt in der Lunge eine Proliferation und Differenzierung der naiven B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen, da die B-Zellen neben weiteren Signalen die Hilfe von CD4-positiven Zellen des  $T_H2$ -Typs benötigen. Diese sind im Lungengewebe im Übermaß vorhanden, eine verstärkte Differenzierung in Plasmazellen kann erfolgen. So könnte auch die schon beschriebene, zunächst widersprüchliche Beobachtung vieler B-Zellen im Lungengewebe bei gleichzeitig nicht erniedrigter Konzentration der B-Zellen im peripheren Blut erklärt werden. Durch die erhöhte Menge an Plasmazellen wäre auch die bei CF beschriebene gesteigerte Menge an Gammaglobulinen in der BALF erklärbar. Den Einfluss der T-Lymphozyten auf eine gesteigerte Immunglobulinproduktion zeigten *Johansen et al.* mit Hilfe athymischer Ratten, die nach Inokulation von Bakterien im Vergleich zu normalen Ratten eine stark reduzierte IgG-Produktion zeigten<sup>64</sup>.

Die Rekrutierung der CD4(+)-Zellen in der Lunge mit ihrer gesteigerten IL-4-Sekretion kann wiederum speziell die IgE-Produktion in B-Zellen stimulieren. Durch eine IgE-vermittelte Sekretion von Histaminen und Leukotrienen aus Mastzellen würde, ähnlich wie beim Asthma, eine allergische Disposition hervorgerufen. Die Folge sind eine allergische Entzündungsreaktion, lokale Gewebeschäden und das

Anlocken weiterer Entzündungszellen. Auch IL-13 wird bei chronischen pulmonalen Entzündungen durch T<sub>H</sub>2-Zellen produziert. Es stimuliert das Wachstum, die Differenzierung und auch die Rekrutierung weiterer Mastzellen, eosinophiler und basophiler Granulozyten<sup>92</sup>. Alle diese Zellen verstärken den Ablauf der pulmonalen Entzündung und führen weiterhin zu einer erhöhten Menge an freigesetzter DNA in der Lunge. Diese wiederum erhöht ebenfalls die Viskosität des Lungensekretes und trägt damit auch zur Infektionsanfälligkeit der Patienten mit CF bei.

#### 4.7. Zukünftige Forschungsansätze

In der vorliegenden Studie wurde erstmals das Fehlen altersabhängiger Veränderungen bei einem Großteil der untersuchten Subpopulationen beobachtet. Eine Überprüfung dieser These durch weitere Studien mit größeren Populationen wäre wünschenswert.

Außerdem wurde in dieser Studie besonders auf die Bedeutung der CD4(+)-Zellen an der Entzündungsreaktion der Lunge hingewiesen. Weitere Untersuchungen zur Bedeutung der CD4-T-Zellen an pulmonalen Entzündungsreaktionen könnten die gemachten Beobachtungen ergänzen. Eine Untersuchung der CD4-Zellen im Zusammenhang mit weiteren hauptsächlich pulmonalen Erkrankungen wie Asthma oder BOOP könnte die Bedeutung des CFTR-Gendefektes bei den Vorgängen der Patienten mit CF klären. Eine Ausweitung der Erforschung der Entzündungsreaktion auf weitere im Rahmen der Mukoviszidose betroffene Organe, wie Pankreas oder Magen-Darm-Trakt wäre wünschenswert. Hier wäre auch, wie in dieser Studie geschehen, eine spezielle Untersuchung der immunhistochemischen Veränderungen dieser Organe im Vergleich zu Veränderungen der peripheren LS sinnvoll. Interessant wäre es auch, die Bedeutung der PA-Besiedlung bei Mukoviszidose auf die immunologischen Abläufe in weiteren Organen zu untersuchen. Eventuell könnte die Untersuchung auf einen Vergleich des Einflusses der mukoiden und der nichtmukoiden Form von PA auf die LS ausgedehnt werden.

Für einige der Lymphozytensubpopulationen ist die genaue Funktion und ihr Einfluss auf den Krankheitsverlauf chronischer pulmonaler Erkrankungen noch unbekannt. Normwerte, wie die in dieser Arbeit erstellten, bieten eine Hilfestellung. Für eine genauere Interpretation wären aber weitere Untersuchungen hilfreich. Auch die Untersuchung der bisher noch unklaren Regulation der einzelnen an der Immunantwort beteiligten Zellen untereinander könnte das Verständnis der Pathophysiologie erleichtern.

Bezüglich der Therapie zeigen alle diese Beobachtungen, dass die Reduzierung der intrabronchialen mikrobiologischen Belastung und der Antigenexposition bei Patienten mit CF essentiell ist. Die schon früher beschriebene Notwendigkeit einer frühzeitigen Therapie der *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlung kann infolge der hier dargestellten Ergebnisse nur unterstützt werden<sup>44,151</sup>. So könnte eine Verbesserung des interstitiellen Entzündungsprozesses auch durch Blockierung des Triggereffektes von PA-Exoenzym S auf die Proliferation der CD4(+)-Zellen erreicht werden. Hier sind aber noch keine überzeugenden Therapiekonzepte vorhanden. Außerdem sollte die Erforschung neuer, effektiverer

Impfstoffe gegen *Pseudomonas aeruginosa* ausgedehnt werden, um so schon möglichst frühzeitig gegen die Kolonisierung der Patienten mit CF durch das Bakterium vorzubeugen<sup>67</sup>.

Die Komplikationen der interstitiellen Pneumonie werden eine klinische Herausforderung und ein wichtiges Thema der Forschung bleiben. Möglicherweise wurde die Bedeutung der daran beteiligten Lymphozytensubpopulationen bisher unterschätzt. Vielleicht ist die Analyse der peripheren Veränderungen der LS ein brauchbares indirektes Mittel zur Beurteilung dieser noch wenig verstandenen Aspekte der Lungenerkrankung bei CF.

## 5. Zusammenfassung

Die pulmonale Manifestation der Zystischen Fibrose (CF) geht mit intrabronchialen und interstitiellen Entzündungsvorgängen einher, die durch einen übermäßigen Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen charakterisiert sind. Im Vergleich zum intrabronchialen Kompartiment ist bei Patienten mit CF nur wenig über die interstitiellen Entzündungsvorgänge und das lymphozytäre System bekannt. Mit Blick auf den Schweregrad der pulmonalen Entzündung erschienen Veränderungen der peripheren Lymphozyten und ihrer Subpopulationen wahrscheinlich. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie mit Hilfe der Zweifarbandurchflusszytometrie Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen (LS) im peripheren Blut untersucht. Die LS (differenziert durch ihre CD3-, CD19-, CD16-, CD56-, CD4-, CD8-, CD11b-, CD57-, HLA-DR-, CD25-, CD45RA- und CD45RO-Expression) von 83 gesunden Kontrollpersonen wurden mit den LS von 44 Patienten mit CF und von 23 Patienten mit rezidivierenden Luftwegsinfekten verglichen. Es erfolgte eine Auswertung bezüglich altersabhängiger und altersunabhängiger Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Außerdem wurden die altersabhängigen Veränderungen innerhalb der CF-Gruppe und der Kontrollgruppe untersucht. Sowohl beim altersunabhängigen als auch beim altersabhängigen Vergleich der LS ergab sich bei den Patienten mit CF eine deutliche Abnahme der CD8(+)-Zellen, der CD4CD45RO(+)-Memory-Zellen, der IL2-R(+)-Zellen und der CD16(+)/CD56(+)-NK-Zellen. Ähnliche Veränderungen zeigte auch die Gruppe der Patienten mit rezidivierenden Infekten. Zusätzlich zur Durchflußzytometrie erfolgte eine immunhistochemische Färbung von Lungengewebe von vier Patienten mit CF (Alter: 6 Monate, 12, 17 und 20 Jahre). Diese ergab eine Aktivierung von bronchus-assoziiertem lymphatischem Gewebe (BALT) und eine pulmonale Akkumulation von CD4(+)/CD45RO(+)-Zellen.

In dieser Studie konnten bei den Patienten mit CF ausgeprägte Veränderungen der peripheren Lymphozytensubpopulationen gezeigt werden. Diese Veränderungen sind, wie der Vergleich mit der Gruppe mit rezidivierenden Infekten ergab, nicht CF-spezifisch. Weiterhin scheint eine Ansammlung von CD4(+)/CD45RO(+)-Zellen in der Lunge grundsätzlich physiologisch zu sein. Die beobachtete interstitielle Akkumulation dieser Zellen in der CF-Lunge, die mit einer parallelen Erniedrigung im peripheren Blut verläuft, geht aber vermutlich über das physiologische Maß hinaus. Möglicherweise ist die Ansammlung der Memory-T-Zellen an der Pathophysiologie der CF-Lungenerkrankung beteiligt. Eine CD4 dominierte Immunantwort könnte zur Persistenz der Entzündungsreaktion beitragen. Die erarbeiteten Daten sind eine altersgewichtete grundlegende Basis für weiterführende Forschungsaktivitäten, die zum Verständnis der inflammatorischen Komponente der Lungenerkrankung bei CF beitragen können.



## 6. Literaturverzeichnis

1. **Angelico, M., Gandin, C., Canuzzi, P., Bertasi, S., Cantafora, A., De Santis, A., Quattrucci, S., and Antonelli, M.** Gallstones in cystic fibrosis: a critical reappraisal. *Hepatology* 14(5)768-775. **11-1991.**
2. **Azzawi, M., Johnston, P. W., Majumdar, S., Kay, A. B., and Jeffery, P. K.** T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 145(6)1477-1482. **6-1992.**
3. **Baenkler HW (Hrsg.).** Medizinische Immunologie. (Grundlagen der Immunologie)1-169. **1997.**
4. **Bals, R., Weiner, D. J., and Wilson, J. M.** The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J.Clin.Invest.* 103(3)303-307. **2-1999.**
5. **Bedrossian, C. W., Greenberg, S. D., Singer, D. B., Hansen, J. J., and Rosenberg, H. S.** The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Human Pathology* 7(2)195-204. **3-1976 .**
6. **Bellantini, J. A. and Zeligs, B. J.** Current concepts of immune interventions in children with respiratory diseases. *Respiration* 61 Suppl 1:3-7.3-7. **1994.**
7. **Berger, M.** Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas*-infected lung in CF. **1989.**
8. **Bienenstock, J., Johnston, N., and Perey, D. Y.** Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab.Invest.* 28(6)686-692. **6-1973.**
9. **Bienenstock, J., Johnston, N., and Perey, D. Y.** Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics. *Lab.Invest.* 28(6)693-698. **6-1973.**
10. **Birx, D. L., Summers, R., and Berger, M.** Acute deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis illustrating the association of atopy and allergic bronchopulmonary aspergillosis with the underlying disease. *Ann.Allergy* 53(2)124-130. **8-1984.**
11. **Bonfield, T. L., Panuska, J. R., Konstan, M. W., Hilliard, K. A., Hilliard, J. B., Ghnaim, H., and Berger, M.** Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs [published erratum appears in *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Oct;154(4 Pt 1):following 1217]. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 152(6 Pt 1)2111-2118. **12-1995.**
12. **Boucher, R. C., Ross, D. W., Knowles, M. R., Gatzky, J. T., and Parker, J. C.** Cl- permeabilities in red blood cells and peripheral blood lymphocytes from cystic fibrosis and control subjects. *Pediatr.Res.* 18(12)1336-1339. **12-1984.**
13. **Bruno, T. F., Buser, D. E., Syme, R. M., Woods, D. E., and Mody, C. H.** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a mitogen but not a superantigen for human T lymphocytes. *Infect.Immun.* 66(7)3072-3079. **7-1998.**
14. **Bunce, C. and Bell, E. B.** CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J.Exp.Med.* 185(4)767-776. **2-17-1997.**
15. **Butcher, E. C. and Picker, L. J.** Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272(5258)60-66. **4-5-1996.**
16. **Cacalano, G., Kays, M., Saiman, L., and Prince, A.** Production of the *Pseudomonas aeruginosa* neuraminidase is increased under hyperosmolar conditions and is regulated by genes involved in alginate expression. *J.Clin.Invest.* 89(6)1866-1874. **6-1992.**

17. **Chan, R., Lam, J. S., Lam, K., and Costerton, J. W.** Influence of culture conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Clin.Microbiol.* 19(1)8-16. **1-1984.**
18. **Chen, J. H., Schulman, H., and Gardner, P.** A cAMP-regulated chloride channel in lymphocytes that is affected in cystic fibrosis [see comments]. *Science* 243(4891)657-660. **2-3-1989.**
19. **Coffman, R. L., Varkila, K., Scott, P., and Chatelain, R.** Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivo. *Immunol.Rev.* 123:189-207. **10-1991.**
20. **Collins, F. S., Riordan, J. R., and Tsui, L. C.** The cystic fibrosis gene: isolation and significance. *Hosp.Pract.(Off.Ed.)* 25(10)47-57. **10-15-1990.**
21. **Constant, S. L., Lee, K. S., and Bottomly, K.** Site of antigen delivery can influence T cell priming: pulmonary environment promotes preferential Th2-type differentiation. *Eur.J.Immunol.*2000.Mar.;30.(3.):840.-7. 30(3)840-847.
22. **Corrigan, C. J. and Kay, A. B.** T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol.Today* 13(12)501-507. **12-1992.**
23. **Coyle, A. J. and Kopf, M.** Lymphocyte subsets in experimental bronchopulmonary inflammation and hyperresponsiveness. *Res.Immunol.* 148(1)13-18. **1-1997.**
24. **Cystic fibrosis foundation.** Patient registry 1998 Annual Data Report. Cystic fibrosis Foundation . **1999.**
25. **Dagli, E., Warner, J. A., Besley, C. R., and Warner, J. O.** Raised serum soluble interleukin-2 receptor concentrations in cystic fibrosis patients with and without evidence of lung disease. *Arch.Dis.Child* 67(4)479-481. **4-1992.**
26. **Danel, C., Erzurum, S. C., McElvaney, N. G., and Crystal, R. G.** Quantitative assessment of the epithelial and inflammatory cell populations in large airways of normals and individuals with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 153(1)362-368. **1-1996.**
27. **Davis, P. B., Del Rio, S., Muntz, J. A., and Dieckman, L.** Sweat chloride concentration in adults with pulmonary diseases. *Am.Rev.Respir.Dis.* 128(1)34-37. **7-1983.**
28. **de Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M. C., and Puchelle, E.** Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect.Immun.* 64(5)1582-1588. **5-1996.**
29. **de Jong, J. W., van der Belt-Gritter, B., Koeter, G. H., and Postma, D. S.** Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir.Med.* 91(2)67-76. **2-1997.**
30. **DiMango, E., Zar, H. J., Bryan, R., and Prince, A.** Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J.Clin.Invest.* 96(5)2204-2210. **11-1995.**
31. **do, Carmo I., Palma-Carlos, M. L., Melo, A., Jorge, Z., Macedo, A., Nunes, S., Galvao-Teles, A., and Palma-Carlos, A. G.** [Characterization of leukocytes, lymphocytes and lymphocyte subsets in eating disorders]. *Allerg.Immunol.(Paris.)* 29(9)261-268. **11-1997.**
32. **Dockter G., Lindemann H., and Tümmler B.** Mukoviszidose. 3. **2000.**
33. **Doherty, P. C., Topham, D. J., and Tripp, R. A.** Establishment and persistence of virus-specific CD4+ and CD8+ T cell memory. *Immunol.Rev.* 150:23-44. **4-1996.**
34. **Doring, G., Albus, A., and Hoiby, N.** Immunologic aspects of cystic fibrosis. *Chest* 94(2 Suppl)109S-115S. **8-1988.**

35. **Doring, G., Frank, F., Boudier, C., Herbert, S., Fleischer, B., and Bellon, G.** Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J.Immunol.* 154(9)4842-4850. **5-1-1995.**
36. **Doring, G., Obernesser, H. J., Botzenhart, K., Flehmig, B., Hoiby, N., and Hofmann, A.** Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J.Infect.Dis.* 147(4)744-750. **4-1983.**
37. **Dovey, M., Wisseman, C. L., Roggli, V. L., Roomans, G. M., Shelburne, JD, and Spock, A.** Ultrastructural morphology of the lung in cystic fibrosis. *Journal of Submicroscopic Cytology & Pathology* 21(3)521-534. **7-1989.**
38. **Durieu, I., Lepercq, J., Rigot, J. M., and Boggio, D.** [Cystic fibrosis. Fertility and reproduction]. *Rev.Mal.Respir.2000.Aug.;17.(3.Pt.2.):*802.-6. 17(3 Pt 2)802-806.
39. **Ekberg-Jansson, A., Arva, E., Nilsson, O., Lofdahl, C. G., and Andersson, B.** A comparison of the expression of lymphocyte activation markers in blood, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage: evidence for an enrichment of activated T lymphocytes in the bronchoalveolar space. *Respiratory Medicine* 93(8)563-570. **8-1999.**
40. **Fick RB.** Proteins of the cysti fibrosis respiratory tract. Fragmented immunglobulin G opsonic antibody causing defective opsonophagocytosis. **1984.**
41. **Fick, R. B., Naegel, G. P., Matthay, R. A., and Reynolds, H. Y.** Cystic fibrosis pseudomonas opsonins. Inhibitory nature in an in vitro phagocytic assay. *J.Clin.Invest.* 68(4)899-914. **10-1981.**
42. **FitzSimmons, S. C.** The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J.Pediatr.* 1221-9. **1993.**
43. **Fraker, P. J., Gershwin, M. E., Good, R. A., and Prasad, A.** Interrelationships between zinc and immune function. *Fed.Proc.* 45(5)1474-1479. **4-1986.**
44. **Frederiksen, B., Koch, C., and Hoiby, N.** Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr.Pulmonol.* 23(5)330-335. **5-1997.**
45. **Gaskin, K. J., Waters, D. L., Howman-Giles, R., de Silva, M., Earl, J. W., Martin, H. C., Kan, A. E., Brown, J. M., and Dorney, S. F.** Liver disease and common-bile-duct stenosis in cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 318(6)340-346. **2-11-1988.**
46. **Gerblich, A. A., Salik, H., and Schuyler, M. R.** Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am.Rev.Respir.Dis.* 143(3)533-537. **3-1991.**
47. **Ginaldi, L., De Martinis, M., D'Ostilio, A., Marini, L., Loreto, F., Modesti, M., and Quagliano, D.** Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: Quantitative flow cytometric analysis. *Am.J.Hematol.*2001.Jun.;67.(2.):63.-72. 67(2)63-72.
48. **Ginaldi, L., De Martinis, M., Modesti, M., Loreto, F., Corsi, M. P., and Quagliano, D.** Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontology* 2000.Sep.-Oct.;46.(5.):242.-8. 46(5)242-248.
49. **Gosselin, D., Stevenson, M. M., Cowley, E. A., Griesenbach, U., Eidelman, D. H., Boule, M., Tam, M. F., Kent, G., Skamene, E., Tsui, L. C., and Radzioch, D.** Impaired ability of Cfr knockout mice to control lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157(4 Pt 1)1253-1262. **4-1998.**
50. **Grimwood, K., Semple, R. A., Rabin, H. R., Sokol, P. A., and Woods, D. E.** Elevated e-xoenzyme expression by *Pseudomonas aeruginosa* is correlated with exacerbations of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr.Pulmonol.* 15(3)135-139. **3-1993.**

51. **Grimwood, K., To, M., Rabin, H. R., and Woods, D. E.** Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme expression by subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33(1)41-47. **1-1989.**
52. **Gruber, R., Pforte, A., Beer, B., and Riethmuller, G.** Determination of gamma/delta and other T-lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood from patients with sarcoidosis and idiopathic fibrosis of the lung. *APMIS* 104(3)199-205. **3-1996.**
53. **Harper, T. B., Gaumer, H. R., Waring, W., Brannon, R. B., and Salvaggio, J. E.** Cell mediated immunity and suppressor T cell function in children with cystic fibrosis. *Lung* 157(4)219-228. **1980.**
54. **Häusler, M., Meilicke, R., Biesterfeld, S., Kentrup, H., Friedrichs, F., and Kusenbach, G.** Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia: a distinct pulmonary complication in cystic fibrosis [see comments]. *Respiration* 2000.;67.(3.):316-9. 67(3)316-319.
55. **Heeckeren, A., Walenga, R., Konstan, M. W., Bonfield, T., Davis, P. B., and Ferkol, T.** Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Clin.Invest.* 100(11)2810-2815. **12-1-1997 .**
56. **Henry, R. L., Mellis, C. M., and Petrovic, L.** Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr.Pulmonol.* 12(3)158-161. **3-1992.**
57. **Hogg, J. C.** Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 160(5 Pt 2)S26-S28. **11-1999.**
58. **Hoiby N.** Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological specimens from patients with other diseases. **1975.**
59. **Hoiby, N.** Prospects for the prevention and control of pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. *Paediatr.Drugs* 2000.Nov.-Dec.;2.(6.):451.-63. 2(6)451-463.
60. **Hoiby, N. and Mathiesen, L.** *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Distribution of B and T lymphocytes in relation to the humoral immune response. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[B.] Microbiol.Immunol.* 82(4)559-566. **8-1974.**
61. **Hol, B. E., Hintzen, R. Q., Van Lier, R. A., Alberts, C., Out, T. A., and Jansen, H. M.** Soluble and cellular markers of T cell activation in patients with pulmonary sarcoidosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 148(3)643-649. **9-1993.**
62. **Iwata, M. and Sato, A.** Morphological and immunohistochemical studies of the lungs and bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* 59(4)1514-1520. **4-1991.**
63. **Jiang, C., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., McCray, P. B. Jr, and Miller, S. S.** Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262(5132)424-427. **10-15-1993.**
64. **Johansen, H. K., Espersen, F., Pedersen, S. S., Hougen, H. P., Rygaard, J., and Hoiby, N.** Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in normal and athymic rats. *APMIS* 101(3)207-225. **3-1993.**
65. **Kammouni, W., Figarella, C., Marchand, S., and Merten, M.** Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect.Immun.* 65(12)5176-5183. **12-1997.**
66. **Kawakami, K., Kadota, J., Iida, K., Fujii, T., Shirai, R., Matsubara, Y., and Kohno, S.** Phenotypic characterization of T cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of patients with diffuse panbronchiolitis; the importance of cytotoxic T cells. *Clin.Exp.Immunol.* 107(2)410-416. **2-1997.**

67. **Keogan, M. T. and Johansen, H. K.** Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*2000.:(2.):CD001399. (2)CD001399.
68. **Khan, T. Z., Wagener, J. S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F. J., and Riches, D. W.** Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis [see comments]. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 151(4)1075-1082. **4-1995** .
69. **Kingsley, G., Pitzalis, C., Kyriazis, N., and Panayi, G. S.** Abnormal helper-inducer/suppressor-inducer T-cell subset distribution and T-cell activation status are common to all types of chronic synovitis. *Scand.J.Immunol.* 28(2)225-232. **8-1988**.
70. **Knowlton, R. G., Cohen-Haguener, O., Van Cong, N., Frezal, J., Brown, V. A., Barker, D., Braman, J. C., Schumm, J. W., Tsui, L. C., and Buchwald, M.** A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318(6044)380-382. **11-28-1985**.
71. **Knutsen, A. P. and Mueller, K. R.** T cell cytotoxicity in cystic fibrosis: relationship to pulmonary status. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 93(1)54-58. **1990**.
72. **Knutsen, A. P., Slavin, R. G., Roodman, S. T., Mueller, K. R., and Marino, N. L.** Decreased T helper cell function in patients with cystic fibrosis. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 85(2)208-212. **1988**.
73. **Koller, D. Y., Nething, I., Otto, J., Urbanek, R., and Eichler, I.** Cytokine concentrations in sputum from patients with cystic fibrosis and their relation to eosinophil activity. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 155(3)1050-1054. **3-1997**.
74. **Kon, O. M. and Kay, A. B.** T cells and chronic asthma. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 118(2-4)133-135. **2-1999**.
75. **Konstan, M. W. and Berger, M.** Infection and inflammation of the lung in Cystic fibrosis. 219-276. **1993**.
76. **Konstan, M. W. and Berger, M.** Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr.Pulmonol.* 24(2)137-142. **8-1997**.
77. **Kronborg, G., Hansen, M. B., Svenson, M., Fomsgaard, A., Hoiby, N., and Bendtzen, K.** Cytokines in sputum and serum from patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection as markers of destructive inflammation in the lungs [see comments]. *Pediatr.Pulmonol.* 15(5)292-297. **5-1993**.
78. **Lahat, N., Rivlin, J., and Iancu, T. C.** Functional immunoregulatory T-cell abnormalities in cystic fibrosis patients. *J.Clin.Immunol.* 9(4)287-295. **7-1989**.
79. **Lee, W. T., Yin, X. M., and Vitetta, E. S.** Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. *J.Immunol.* 144(9)3288-3295. **5-1-1990**.
80. **Locksley, R. M., Heinzl, F. P., Holaday, B. J., Mutha, S. S., Reiner, S. L., and Sadick, M. D.** Induction of Th1 and Th2 CD4+ subsets during murine *Leishmania major* infection. *Res.Immunol.* 142(1)28-32. **1-1991**.
81. **Looney, R. J., Falsey, A., Campbell, D., Torres, A., Kolassa, J., Brower, C., McCann, R., Menegus, M., McCormick, K., Frampton, M., Hall, W., and Abraham, G. N.** Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin.Immunol.* 90(2)213-219. **2-1999**.
82. **Macone, A. B., Pier, G. B., Pennington, J. E., Matthews, W. J. Jr, and Goldmann, D. A.** Mucoid *Escherichia coli* in cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 304(24)1445-1449. **6-11-1981**.

83. **Maini, M. K., Casorati, G., Dellabona, P., Wack, A., and Beverley, P. C.** T-cell clonality in immune responses. *Immunol.Today* 20(6)262-266. **6-1999.**
84. **Markham, R. B., Pier, G. B., Goellner, J. J., and Mizel, S. B.** In vitro T cell-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. II. The role of macrophages and T cell subsets in T cell killing. *J.Immunol.* 134(6)4112-4117. **6-1985.**
85. **Masuko, K., Kato, T., Ikeda, Y., Okubo, M., Mizushima, Y., Nishioka, K., and Yamamoto, K.** Dynamic changes of accumulated T cell clonotypes during antigenic stimulation in vivo and in vitro. *Int.Immunol.* 6(12)1959-1966. **12-1994.**
86. **Matthews, W. J. Jr, Williams, M., Oliphint, B., Geha, R., and Colten, H. R.** Hypogammaglobulinemia in patients with cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 302(5)245-249. **1-31-1980.**
87. **May, J. R., Herrick, N. C., and Thompson, D.** Bacterial infection in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 47(256)908-913. **12-1972.**
88. **McDonald, T. V., Nghiem, P. T., Gardner, P., and Martens, C. L.** Human lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CF-defective cAMP-regulated chloride current. *J.Biol.Chem.* 267(5)3242-3248. **2-15-1992.**
89. **McNerlan, S. E., Alexander, H. D., and Rea, I. M.** Age-related reference intervals for lymphocyte subsets in whole blood of healthy individuals. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 59(2)89-92. **4-1999.**
90. **Meuwissen, H. J. and Hussain, M.** Bronchus-associated lymphoid tissue in human lung: correlation of hyperplasia with chronic pulmonary disease. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 23(2)548-561. **5-1982.**
91. **Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C., and Beverley, P. C.** Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360(6401)264-265. **11-19-1992.**
92. **Miller, A. L.** The etiologies, pathophysiology, and alternative/complementary treatment of asthma. *Altern.Med.Rev.*2001.Feb.;6.(1.):20.-47. 6(1)20-47.
93. **Mizgerd, J. P., Kobzik, L., Warner, A. E., and Brain, J. D.** Effects of sodium concentration on human neutrophil bactericidal functions. *Am.J.Physiol.* 269(3 Pt 1)L388-L393. **9-1995.**
94. **Mocchegiani, E., Provinciali, M., Di Stefano, G., Nobilini, A., Caramia, G., Santarelli, L., Tibaldi, A., and Fabris, N.** Role of the low zinc bioavailability on cellular immune effectiveness in cystic fibrosis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 75(3)214-224. **6-1995.**
95. **Mody, C. H., Buser, D. E., Syme, R. M., and Woods, D. E.** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces proliferation of human T lymphocytes. *Infect.Immun.* 63(5)1800-1805. **5-1995.**
96. **Morimoto, C., Letvin, N. L., Boyd, A. W., Hagan, M., Brown, H. M., Kornacki, M. M., and Schlossman, S. F.** The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J.Immunol.* 134(6)3762-3769. **6-1985.**
97. **Morimoto, C., Romain, P. L., Fox, D. A., Anderson, P., DiMaggio, M., Levine, H., and Schlossman, S. F.** Abnormalities in CD4+ T-lymphocyte subsets in inflammatory rheumatic diseases. *Am.J.Med.* 84(5)817-825. **5-1988.**
98. **Moser, C., Johansen, H. K., Song, Z., Hougen, H. P., Rygaard, J., and Hoiby, N.** Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS* 105(11)838-842. **11-1997.**
99. **Moser, C., Kjaergaard, S., Pressler, T., Kharazmi, A., Koch, C., and Hoiby, N.** The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS* 2000.May.;108.(5.):329.-35. 108(5)329-335.

100. **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136(7)2348-2357. **4-1-1986.**
101. **Moss, R. B., Bocian, R. C., Hsu, Y. P., Dong, Y. J., Kemna, M., Wei, T., and Gardner, P.** Reduced IL-10 secretion by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Clin.Exp.Immunol.* 106(2)374-388. **11-1996.**
102. **Moss, R. B., Hsu, Y. P., and Olds, L.** Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin.Exp.Immunol.* 2000.Jun.;120(3.):518.-25. 120(3)518-525.
103. **Mukae, H., Kadota, J., Kohno, S., Matsukura, S., and Hara, K.** Increase of activated T-cells in BAL fluid of Japanese patients with bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and chronic eosinophilic pneumonia. *Chest* 108(1)123-128. **7-1995.**
104. **Mukae, H., Kohno, S., Morikawa, T., Kusano, S., Kadota, J., and Hara, K.** Two-color analysis of lymphocyte subsets of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood in Japanese patients with sarcoidosis. *Chest* 105(5)1474-1480. **5-1994.**
105. **Nixon, L. S., Yung, B., Bell, S. C., Elborn, J. S., and Shale, D. J.** Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157(6 Pt 1)1764-1769. **6-1998.**
106. **Noah, T. L., Black, H. R., Cheng, P. W., Wood, R. E., and Leigh, M. W.** Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J.Infect.Dis.* 175(3)638-647. **3-1997.**
107. **Osugi, Y., Hara, J., Kurahashi, H., Sakata, N., Inoue, M., Yumura-Yagi, K., Kawa-Ha, K., Okada, S., and Tawa, A.** Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children. *Clin.Exp.Immunol.* 100(3)543-548. **6-1995.**
108. **Paul K., Ratjen F, and Schuster A.** Pulmonale Manifestation der Zystischen Fibrose. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 149(3)222-238. **2001.**
109. **Pier, G. B., Saunders, J. M., Ames, P., Edwards, M. S., Auerbach, H., Goldfarb, J., Speert, D. P., and Hurwitch, S.** Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older noncolonized patients with cystic fibrosis. *N.Engl.J.Med.* 317(13)793-798. **9-24-1987.**
110. **Pitcher-Wilmott, R. W., Levinsky, R. J., Gordon, I., Turner, M. W., and Matthew, D. J.** *Pseudomonas* infection, allergy, and cystic fibrosis. *Arch.Dis.Child* 57(8)582-586. **8-1982.**
111. **Prince, H. E., Hirji, K., Waldbeser, L. S., Plaeger-Marshall, S., Kleinman, S., and Lanier, L. L.** Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn.Immunol.* 3(1)33-37. **1985.**
112. **Quinton, P. M.** Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301(5899)421-422. **2-3-1983.**
113. **Racz, P., Tenner-Racz, K., Myrvik, Q. N., and Fainter, L. K.** Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. *J.Reticuloendothel.Soc.* 22(1)59-83. **7-1977.**
114. **Raes, M., Peeters, V., Alliet, P., Gillis, P., Kortleven, J., Magerman, K., and Rummens, J. L.** Peripheral blood T and B lymphocyte subpopulations in infants with acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr.Allergy Immunol.* 8(2)97-102. **5-1997.**
115. **Raffael, A.** Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. **1994.**
116. **Reynolds, H. Y., Di Sant'Agnese, P. A., and Zierdt, C. H.** Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. A sign of cystic fibrosis in young adults with chronic pulmonary disease? *JAMA* 236(19)2190-2192. **11-8-1976.**

117. **Richman-Eisenstat, J. B., Jorens, P. G., Hebert, C. A., Ueki, I., and Nadel, J. A.** Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am.J.Physiol.* 264(4 Pt 1)L413-L418. **4-1993.**
118. **Richmond, I., Pritchard, G. E., Ashcroft, T., Avery, A., Corris, P. A., and Walters, E. H.** Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. *Thorax* 48(11)1130-1134. **11-1993.**
119. **Robinson, P.** Cystic fibrosis. *Thorax* 2001.Mar.;56.(3.):237.-241. 56(3)237-241.
120. **Rogers, J., Langston, C., and Guerra, I. C.** Pulmonary follicular lymphoid hyperplasia in a child with HTLV-III-related immunodeficiency. *Pediatr.Pulmonol.* 2(3)175-178. **5-1986.**
121. **Rosaschino, F., Salvini, F., Torre, R., Cisarri, G., and Oleari, F.** [Evaluation of the immune status of children never treated with chemoantibiotics (children 3 to 6 years old)]. *Minerva.Pediatr.* 46(11)481-500. **11-1994.**
122. **Rowbottom, A. W., Garland, R. J., Lepper, M. W., Kaneria, S. S., Goulden, N. J., Oakhill, A., and Steward, C. G.** Functional analysis of the CD8+CD57+ cell population in normal healthy individuals and matched unrelated T-cell-depleted bone marrow transplant recipients. *Br.J.Haematol.*2000.Aug.;110.(2.):315.-21. 110(2)315-321.
123. **Saetta, M., Di Stefano, A., Turato, G., Facchini, F. M., Corbino, L., Mapp, C. E., Maestrelli, P., Ciaccia, A., and Fabbri, L. M.** CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157(3 Pt 1)822-826. **3-1998.**
124. **Safai-Kutti, S., Selin, E., Larsson, S., Jagenburg, R., Denfors, I., Sten, G., and Kjellmer, I.** Zinc therapy in children with cystic fibrosis. *Beitr.Infusionsther.* 27:104-14104-114. **1991.**
125. **Saiman, L. and Prince, A.** Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J.Clin.Invest.* 92(4)1875-1880. **10-1993.**
126. **Schiotz, P. O., Hoiby, N., Juhl, F., Permin, H., Nielsen, H., and Svehag, S. E.** Immune complexes in cystic fibrosis. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[C.]* 85(1)57-64. **2-1977.**
127. **Schiotz, P. O., Hoiby, N., Permin, H., and Wiik, A.** IgA and IgG antibodies against surface antigens of Pseudomonas aeruginosa in sputum and serum from patients with cystic fibrosis. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.[C.]* 87C(3)229-233. **6-1979.**
128. **Scott, P.** Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets. *Curr.Opin.Immunol.* 5(3)391-397. **6-1993.**
129. **Senju, M., Makiyama, K., Hara, K., Hulstaert, F., Lowder, J. N., and Jewell, D. P.** Two-color immunofluorescence and flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in Caucasian and Japanese healthy subjects. *Jpn.J.Med.* 30(6)509-515. **11-1991.**
130. **Shahabuddin, S., Al-Ayed, I., MO, Gad El-Rab, and Qureshi, M. I.** Age-related changes in blood lymphocyte subsets of Saudi Arabian healthy children. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 5(5)632-635. **9-1998.**
131. **Skov, M., Poulsen, L. K., and Koch, C.** Increased antigen-specific Th-2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in patients with cystic fibrosis [see comments]. *Pediatr.Pulmonol.* 27(2)74-79. **2-1999.**
132. **Slavin, R. G., Bedrossian, C. W., Hutcheson, P. S., Pittman, S., Salinas-Madriral, L., Tsai, C. C., and Gleich, G. J.** A pathologic study of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 81(4)718-725. **4-1988 .**
133. **Smith, J. J., Karp, P. H., and Welsh, M. J.** Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia. *J.Clin.Invest.* 93(3)1307-1311. **3-1994.**



134. **Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J.** Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85(2)229-236. **4-19-1996.**
135. **Smith, M. J., Morris, L., Stead, R. J., Hodson, M. E., and Batten, J. C.** Lymphocyte subpopulations and function in cystic fibrosis. *Eur.J.Respir.Dis.* 70(5)300-308. **5-1987.**
136. **Sobonya, R. E. and Taussig, L. M.** Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *American Review of Respiratory Disease* 134(2)290-295. **8-1986.**
137. **Sorensen, R. U., Ruuskanen, O., Miller, K., and Stern, R. C.** B-lymphocyte function in cystic fibrosis. *Eur.J.Respir.Dis.* 64(7)524-533. **10-1983.**
138. **Sorensen, R. U., Stern, R. C., Chase, P., and Polmar, S. H.** Defective cellular immunity to gram-negative bacteria in cystic fibrosis patients. *Infect.Immun.* 23(2)398-402. **2-1979.**
139. **Sorensen, R. U., Stern, R. C., and Polmar, S. H.** Cellular immunity to bacteria: impairment of in vitro lymphocyte responses to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Infect.Immun.* 18(3)735-740. **12-1977.**
140. **Sorensen, R. U., Waller, R. L., and Klinger, J. D.** Cystic fibrosis. Infection and immunity to *Pseudomonas*. *Clin.Rev.Allergy* 9(1-2)47-74. **1991.**
141. **Stirati, G., Antonelli, M., Fofi, C., Fierimonte, S., and Pecci, G.** IgA nephropathy in cystic fibrosis. *J.Nephrol.* 12(1)30-31. **1-1999.**
142. **Sturgess, J. and Imrie, J.** Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am.J.Pathol.* 106(3)303-311. **3-1982.**
143. **Suda, T., Chida, K., Hayakawa, H., Imokawa, S., Iwata, M., Nakamura, H., and Sato, A.** Development of bronchus-associated lymphoid tissue in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 115(2)357-363. **2-1999.**
144. **Taga, K., Kasahara, Y., Yachie, A., Miyawaki, T., and Taniguchi, N.** Preferential expression of IL-2 receptor subunits on memory populations within CD4+ and CD8+ T cells. *Immunology* 72(1)15-19. **1-1991.**
145. **Talamo, R. C., Stiehm, E. R., and Schwartz, R. H.** Immunologic aspects of cystic fibrosis. pp. 195-217. In: Mangos.JA., Talamo.RC., ed.*Cystic.fibrosis.: projections.into.the.future.*New York., Stratton., . **1976.**
146. **Tomashefski, J. F., Thomassen, M. J., Bruce, M. C., Goldberg, H. I., Konstan, M. W., and Stern, R. C.** *Pseudomonas cepacia*-associated pneumonia in cystic fibrosis. Relation of clinical features to histopathologic patterns of pneumonia. *Arch.Pathol.Lab.Med.* 112(2)166-172. **2-1988.**
147. **Tomashefski, J. F. Jr, Bruce, M., Goldberg, H. I., and Dearborn, D. G.** Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis. *American Review of Respiratory Disease* 133(4)535-540. **4-1986.**
148. **Tomashefski, J. F. Jr, Konstan, M. W., Bruce, M. C., and Abramowsky, C. R.** The pathologic characteristics of interstitial pneumonia cystic fibrosis. A retrospective autopsy study. *American Journal of Clinical Pathology* 91(5)522-530. **5-1989.**
149. **Tosi, M. F., Zakem, H., and Berger, M.** Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *Journal of Clinical Investigation* 86(1)300-308. **7-1990 .**
150. **Tschernig, T. and Pabst, R.** Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* 2000.Jan.-Feb.;68.(1.):1-8. **68(1)1-8.**

151. **Valerius, N. H., Koch, C., and Hoiby, N.** Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338(8769)725-726. **9-21-1991.**
152. **Van Geffel, R., Hubert, E., and Urbain, J.** Study of helper and suppressor T-cells in cystic fibrosis. *Immunol.Lett.* 5(3)155-159. **9-1982.**
153. **Wang, E. C., Lehner, P. J., Graham, S., and Borysiewicz, L. K.** CD8<sup>high</sup> (CD57<sup>+</sup>) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *Eur.J.Immunol.* 24(11)2903-2909. **11-1994.**
154. **Watanabe, N., Kato, H., and Mogi, G.** Induction of antigen-specific IgA-forming cells in the upper respiratory mucosa. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 98(7 Pt 1)523-529. **7-1989.**
155. **Weiner, H. L.** Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. [Review] [143 refs]. *Immunology Today* 18(7)335-343. **7-1997.**
156. **Welsh, M. J. and Smith, A. E.** Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73(7)1251-1254. **7-2-1993.**
157. **Wentworth, P., Gough, J., and Wentworth, J. E.** Pulmonary changes and cor pulmonale in mucoviscidosis. *Thorax* 23(6)582-589. **11-1968.**
158. **White, R., Woodward, S., Leppert, M., O'Connell, P., Hoff, M., Herbst, J., Lalouel, J. M., Dean, M., and Vande, Woude G.** A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* 318(6044)382-384. **11-28-1985.**
159. **Wilmott, R. W., Frenzke, M., Kociela, V., and Peng, L.** Plasma interleukin-1 alpha and beta, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide concentrations during pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Pediatr.Pulmonol.* 18(1)21-27. **7-1994.**
160. **Wilson, GB and Shapira, E.** Immunological aspects of cystic fibrosis. CRC Press, Boca Raton . **1984.**
161. **Wulffraat, N. M., de Graeff-Meeder, E. R., Rijkers, G. T., van der Laag, H., and Kuis, W.** Prevalence of circulating immune complexes in patients with cystic fibrosis and arthritis. *J.Pediatr.* 125(3)374-378. **9-1994.**
162. **Yu, H., Hanes, M., Chrisp, C. E., Boucher, J. C., and Deretic, V.** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: pulmonary clearance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and inflammation in a mouse model of repeated respiratory challenge. *Infect.Immun.* 66(1)280-288. **1-1998.**
163. **Zar, H., Saiman, L., Quittell, L., and Prince, A.** Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J.Pediatr.* 126(2)230-233. **2-1995.**
164. **Zeng, B., Qian, Y., Zheng, D., Wu, K., Zhou, M., and Gong, Q.** [Change of T lymphocyte subsets in peripheral blood of children with malnutrition and zinc deficiency]. *Hua.Xi.Yi.Ke.Da.Xue.Xue.Bao.* 22(3)337-339. **9-1991.**

## 7. Danksagung

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. med. G. Heimann für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die stets freundliche Unterstützung und für die Ermutigung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Martin Häusler für die intensive und persönliche Betreuung dieser Arbeit. Seinem unermüdlichen Einsatz ist es zu verdanken, dass die Laborarbeiten und das Schreiben der Arbeit schnell und kontinuierlich vorangingen. Er war zu jeder Zeit ein kompetenter und ehrlicher Ratgeber. Ohne sein Zielbewusstsein und Ideenreichtum wäre die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K. Schweizer und den Mitarbeiterinnen des Institutes für Medizinische Immunologie, besonders Frau H. Ostendorp, für die freundliche Aufnahme in das Team und die geduldige Hilfe bei den Laborarbeiten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. S. Biesterfeld und den Mitarbeiterinnen des Institutes für Pathologie für ihre Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Stefan Kütter für das sorgfältige Lesen und Korrigieren meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinen lieben Eltern Maria Theresia und Wilmund Opladen, die mir während meines Studiums und meiner Promotion stets zur Seite standen. Sie haben mich in allen schwierigen Situationen unterstützt und sind für mich bis heute ein wichtiger Halt in meinem Leben.

Aachen, Frankenberger Viertel im Dezember 2002

## 8. Tabellarischer Lebenslauf

<b><u>Name:</u></b>	Thomas Opladen
<b><u>Geburtsdatum/-ort:</u></b>	08.02.1974, Bergisch Gladbach
<b><u>Familienstand:</u></b>	ledig
<b><u>Konfession:</u></b>	römisch-katholisch
<b><u>Eltern:</u></b>	Maria-Theresia Opladen, geb. Lücke Wilmund Opladen
<b><u>Schulbildung:</u></b>	
1980 – 1984	Katholische Grundschule Bensberg
1984 – 1993	Albertus-Magnus-Gymnasium Bensberg Abitur in den Fächern Biologie, Deutsch, Mathematik, Erdkunde
<b><u>Zivildienst:</u></b>	
7/93 – 10/94	Pflegediensthelfer in der Chirurgie des Marienkrankenhauses Bergisch Gladbach
<b><u>Hochschulbildung:</u></b>	
Seit 10/94	Studium der Humanmedizin an der RWTH-Aachen
8/96	Physikum
8/97	1. Staatsexamen
9/97 – 8/98	Studium an der Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) mit einem ERASMUS-Stipendium der Europäischen Union
3/00	2. Staatsexamen
11/01	3. Staatsexamen
<b><u>Famulaturen:</u></b>	
2 – 3/97	Kinderklinik Seehospiz auf Norderney
8/98	Abteilung für Innere Medizin im Marienkrankenhauses Bergisch Gladbach
9/98	Chirurgische Notaufnahme des Kreiskrankenhauses (Hospital regional) in Puno, Peru
3/99	Kinderklinik der RWTH-Aachen

**Praktisches Jahr:**

8/00 – 11/00	Erstes Tertial: Chirurgische Abteilung des Groote-Schuur-Hospitals der University of Cape Town, Südafrika
12/00 – 3/01	Zweites Tertial: Universitäts-Kinderklinik der RWTH-Aachen
4/01 – 7/01	Drittes Tertial: Innere Medizin im Marienhospital Aachen, Lehrkrankenhaus der RWTH-Aachen

**Jetzt:**

Seit 1/02	Arzt im Praktikum in der Universitäts-Kinderklinik der RWTH-Aachen
-----------	--