

Aus der Universitätskinderklinik  
Experimentelle Pädiatrie und Neonatologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Leiterin: Prof. Dr. Monika C. Brunner-Weinzierl

**Der Einfluss von Alter und Infektionen auf die  
Differenzierung von T-Zellen bei Kindern**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

|               |                           |
|---------------|---------------------------|
| vorgelegt von | Julienne Christine Knolle |
| aus           | Peine                     |
| Magdeburg     | 2021                      |

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung:

Knolle, Julienne Christine:

Der Einfluss von Alter und Infektionen auf die Differenzierung von T-Zellen bei Kindern.  
- 2021. – 15 Abb., 9 Tab., 6 Anl.

## Kurzreferat:

Eine Hypertrophie der Tonsilla pharyngea (Adenoide) kommt bei Kindern häufig vor und prädisponiert zu rezidivierenden Atemwegsinfekten oder Otitis media mit Paukenerguss. Da zwar bekannt ist, dass die Qualität der T-Zell-Antwort sich während der Kindheit unterscheidet, jedoch unklar ist, welche Einflüsse hierfür verantwortlich sind, wurden in dieser Arbeit vorangegangene Infektionen und Alter als mögliche Einflussfaktoren auf die Bildung von T-Zell-Kompartimenten und multifunktionalen T-Zellen in den Adenoiden von 102 Kindern untersucht, welche aufgrund einer Adenoiden Hypertrophie einer Adenotomie unterzogen wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass ähnliche Frequenzen von naiven, T-Effektor- und T-Gedächtniszellen akkumuliert wurden, wohingegen Patienten mit Infekten in ihrer Eigenanamnese weniger multifunktionale T-Zellen aufwiesen. Während Patienten mit alleiniger nasaler Obstruktion ausgewogene  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Kompartimente zeigten, dominierte  $T_H1$  bei Patienten mit einer Vorgeschichte von begleitenden Infektionen. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich Kinder im Alter von drei Jahren oder älter signifikant von Ein- und Zweijährigen unterschieden, was einen kritischen Wechsel in der T-Zell-Differenzierung in diesem Alter impliziert.

Diese Ergebnisse identifizieren somit wichtige Bereiche für die zukünftige Forschung und weisen auf eine Altersperiode in der frühen Kindheit hin, in welcher das kindliche Immunsystem bereits in der Lage zu sein scheint, der Krankheitsexposition in Adenoiden effektiv zu begegnen.

## Schlüsselwörter:

Adenoide Hypertrophie, T-Zell-Differenzierung, multifunktionale T-Zellen, Entwicklung des Immunsystems

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>DOKUMENTATIONSBLATT .....</b>                                 | <b>I</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS .....</b>                   | <b>V</b>  |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Überblick über das Immunsystem .....</b>                  | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Lymphozyten: Agenten des erworbenen Immunsystems.....</b> | <b>3</b>  |
| 1.2.1 Bildung und Aktivierung von T-Lymphozyten.....             | 4         |
| 1.2.2 Recent thymic emigrants/naive T-Zellen.....                | 5         |
| 1.2.3 T-Effektorzellen .....                                     | 5         |
| 1.2.3.1 CD4+T-Helfer-Zellen.....                                 | 6         |
| 1.2.3.2 CD8+ zytotoxische T-Zellen.....                          | 8         |
| 1.2.4 T-Gedächtniszellen .....                                   | 9         |
| 1.2.5 Multifunktionale T-Zellen .....                            | 10        |
| <b>1.3 Adenoide .....</b>  | <b>13</b> |
| 1.3.1 Klinische Symptomatik bei hypertrophierten Adenoiden ..... | 13        |
| 1.3.2 Diagnostik.....  | 14        |
| 1.3.3 Therapie .....   | 15        |
| <b>1.4 Zielsetzung.....</b>                                      | <b>16</b> |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>                             | <b>17</b> |
| <b>2.1 Materialien .....</b>                                     | <b>17</b> |
| 2.1.1 Geräte.....  | 17        |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....                                 | 17        |
| 2.1.3 Puffer und Medien .....                                    | 18        |
| 2.1.4 Chemikalien und Lösungen .....                             | 18        |
| 2.1.5 Antikörper .....   | 19        |
| <b>2.2 Methoden.....</b>   | <b>20</b> |
| 2.2.1 Patientenrekrutierung.....                                 | 20        |
| 2.2.2 Gruppeneinteilung .....                                    | 21        |
| 2.2.3 Einteilung in Altersklassen.....                           | 21        |
| 2.2.4 Herstellung einer Zellsuspension aus Adenoiden .....       | 21        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.2.5      | Einfrier- und Auftauprozess .....  | 22        |
| 2.2.6      | Durchflusszytometrie (FACS).....   | 22        |
| 2.2.6.1    | Oberflächenfärbung.....  | 22        |
| 2.2.6.2    | Intrazelluläre Färbung.....  | 23        |
| 2.2.6.2.1  | Stimulation der Zellen.....  | 23        |
| 2.2.6.2.2  | Fixierung und Färbung .....  | 23        |
| 2.2.6.3    | Durchflusszytometrische-Analyse.....   | 24        |
| 2.2.6.4    | Gating .....   | 25        |
| 2.2.6.5    | Gating Strategie .....   | 26        |
| 2.2.6.5.1  | Phänotypisierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen.....   | 26        |
| 2.2.6.5.2  | Zytokinproduktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen .....   | 27        |
| 2.2.7      | Statistische Analysen.....   | 31        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Betrachtung des Patientenkollektivs .....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1.1      | Einteilung nach klinischer Symptomatik .....   | 32        |
| 3.1.1.1    | Betrachtung der klinischen Symptome.....   | 32        |
| 3.1.1.2    | Befunde der klinischen Untersuchung, Hörtestungen und durchgeführte Operation .....                                    | 35        |
| 3.1.2      | Betrachtung des Alters der Patienten .....   | 39        |
| <b>3.2</b> | <b>Vergleich der T-Zell-Differenzierung innerhalb der klinischen Gruppen .....</b>                                     | <b>42</b> |
| 3.2.1      | Deutlicher Anteil an T-Effektor- und T-Gedächtniszellen in Adenoiden .....   | 42        |
| 3.2.2      | Analyse der Zytokinproduktion als Marker der T-Zell-Differenzierung.....   | 45        |
| 3.2.2.1    | Betrachtung der T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 17-Zellen bzw. T <sub>C</sub> 1 und T <sub>C</sub> 17-Zellen..... | 45        |
| 3.2.2.2    | Weniger Multifunktionale T-Zellen bei Kindern mit Sekundärinfektionen.....   | 45        |
| <b>3.3</b> | <b>Vergleich der T-Zell-Differenzierung entsprechend des Alters .....</b>  | <b>50</b> |
| 3.3.1      | T-Effektor- und T-Gedächtniszellkompartimente zeigen sich ähnlich im Altersvergleich.....                              | 50        |
| 3.3.2      | Analyse der Zytokinproduktion im Altersvergleich .....   | 52        |
| 3.3.2.1    | Betrachtung der T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 17-Zellen bzw. T <sub>C</sub> 1 und T <sub>C</sub> 17-Zellen..... | 54        |
| 3.3.2.2    | Ältere Kinder zeigen einen höheren Anteil an multifunktionalen CD4+ und CD8+ T-Zellen ....                             | 55        |
| <b>3.4</b> | <b>Gegenüberstellung der Einflüsse auf die T-Zell-Funktionalität .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Betrachtung des Patientenkollektivs .....</b>   | <b>61</b> |
| 4.1.1      | Klinische Symptomatik und Gruppeneinteilung.....   | 61        |
| 4.1.2      | Konzeption des Erfassungsbogens zum stationären Verlauf .....  | 63        |

|            |  |               |
|------------|--|---------------|
| 4.1.3      | Alter der Patienten.....   | 64            |
| <b>4.2</b> | <b>Zusammensetzung der T-Zell-Kompartimente.....</b>                   | <b>65</b>     |
| 4.2.1      | Vergleich der T-Zell-Differenzierung nach klinischer Symptomatik ..... | 65            |
| 4.2.2      | Korrelation von T-Zell-Qualität mit Krankheitsprogression.....         | 66            |
| 4.2.3      | T-Zell-Qualität im Altersvergleich.....                                | 69            |
| 4.2.4      | Gegenüberstellung der Einflüsse auf die T-Zell-Funktionalität .....    | 71            |
| <b>4.3</b> | <b>Stärken und Grenzen der Arbeit .....</b>                            | <b>72</b>     |
| <b>5</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG – AUSBLICK UND KLINISCHE RELEVANZ .....</b>         | <b>75</b>     |
|            | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                      | <b>LXXVI</b>  |
|            | <b>DANKSAGUNG .....</b>  | <b>LXXXIV</b> |
|            | <b>EHRENERKLÄRUNG.....</b>   | <b>LXXXV</b>  |

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| $\alpha$ CD3  | Anti-CD3 Antikörper                               |
| $\alpha$ CD28 | Anti-CD28 Antikörper                              |
| Abb.          | Abbildung   |
| Ag            | Antigen   |
| APZ           | Antigenpräsentierende Zelle                       |
| APC           | Allophycocyanin                                   |
| AT            | Adenotomie  |
| BERA          | Engl. <i>Brainstem evoked response audiometry</i> |
| BSA           | Engl. <i>Bovine serum albumine</i>                |
| CD            | Engl. <i>Cluster of differentiation</i>           |
| Cy5           | Cyan dye 5  |
| DMSO          | Dimethylsulfoxid                                  |
| FACS          | Engl. <i>Fluorescence activated cell sorting</i>  |
| FBS           | Engl. Fetal bovine serum                          |
| FITC          | Fluorescein-Isothiocyanat                         |
| FOXP3         | Engl. <i>Forkhead box P3</i>                      |
| FSC           | Engl. <i>Forward scatter</i>                      |
| HLA           | Humanes Leukozyten-Antigen                        |
| IFN $\gamma$  | Interferon- $\gamma$                              |
| Ig            | Immunglobulin                                     |
| IL            | Interleukin                                       |
| MHC           | Engl. <i>Major histocompatibility complex</i>     |
| MOE           | Mittelohrentzündung                               |
| NK            | Natürlich Killerzellen                            |
| PBS           | Engl. <i>Phosphat buffered saline</i>             |
| PD            | Paukendrainage (=Einsatz eines Paukenröhrchens)   |
| PE            | Phycoerythrin                                     |
| PE Cy7        | Tandemfarbstoff aus PE und Cyan 7                 |
| PMA           | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat                     |
| PP            | Paukenpunktion/Parazentese (=Trommelfellschnitt)  |

|                          |   |
|--------------------------|---|
| RTE                      | Recent thymic emigrants                                       |
| SSC                      | Engl. <i>Side Scatter</i>                                     |
| STAT                     | Engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| Tab.                     | Tabelle   |
| TZR                      | T-Zell-Rezeptor   |
| TE                       | Tonsillektomie  |
| TEOAE                    | Transitorisch evozierte otoakustische Emissionen              |
| T <sub>C</sub> -Zellen   | Zytotoxische T-Zellen   |
| T <sub>CM</sub> -Zellen  | Zentrale Gedächtniszellen                                     |
| T <sub>EM</sub> -Zellen  | Effektor-Gedächtniszellen                                     |
| T <sub>H</sub> - Zellen  | T-Helferzellen  |
| T <sub>SCM</sub> -Zellen | Stammzellähnliche Gedächtniszellen                            |
| TNF $\alpha$             | Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$                                |
| TT                       | Tonsillotomie   |
| Tymp.                    | Tympanogramm  |

# 1 Einleitung

Sekundäre Lymphorgane wie Lymphknoten und Milz aber auch schleimhautassoziierte Lymphgewebe, zu welchen auch die Tonsilla pharyngea (Adenoide) gehören, sind wichtige Orte für die Generierung von T-Zell-Reaktionen gegen Pathogene. Sie sind als solche ständig mit Krankheitserregern konfrontiert und fungieren als Plattformen zur Erzeugung adaptiver Immunantworten.<sup>1,2</sup> Eine Hypertrophie der Adenoide, also eine Vergrößerung des lymphoepithelialen Gewebes, kommt bei Kleinkindern häufig vor und prädisponiert zu rezidivierenden Atemwegsinfekten oder Otitis media mit konsekutivem Paukenerguss.<sup>3</sup>

In der vorliegenden Studie wurden Adenoide betrachtet, um die Bildung von Zytokin-koexprimierenden T-Zellen als Ausdruck einer komplexen, adaptiven Immunantwort zu analysieren. Es ist nur wenig darüber bekannt, welche Einflüsse auf die T-Zell-Reaktion und –Differenzierung bei sehr jungen Kindern ausschlaggebend sind. Als mögliche Einflussfaktoren wurden die Konfrontation mit Krankheitsantigenen sowie die allgemeine Entwicklung des Immunsystems mit zunehmendem Alter untersucht und einander gegenübergestellt.

## 1.1 Überblick über das Immunsystem

Als Immunsystem wird das hochdifferenzierte, komplexe und anpassungsfähige Abwehrsystem bezeichnet, dessen physiologische Funktion der Schutz des Organismus vor Infektionen ist.

Das Immunsystem setzt sich aus vier eng miteinander verbundenen Komponenten zusammen. Sowohl die angeborene (unspezifische) als auch die erworbene (spezifische) Komponente beinhalten jeweils einen humoralen und einen zellulären Anteil.

| Komponenten<br>des<br>Immunsystem | zellulär   |  | humoral                                  |  |
|-----------------------------------|--|--|--|--|
|                                   | angeboren  | <b>NK-Zellen</b><br>Makrophagen<br>Neutrophile Granulozyten                    | <b>Komplement</b><br>Zytokine<br>Lysozym |  |
| erworben                          | <b>T-Zellen</b><br>CD4+ T-Helferzellen<br>CD8+ zytotoxische T-<br>Zellen<br>Naive T-Zellen/T-Effektor-/<br>T-Gedächtniszellen<br>Regulatorische T-Zellen | <b>Antikörper</b><br>Produziert von<br>Plasmazellen und B-<br>Gedächtniszellen |  |  |

**Abbildung 1: Überblick über das Immunsystem.** Gezeigt werden die vier miteinander verzahnten und interagierenden Komponenten des Immunsystems, die angeborene (unspezifische) und die erworbene (spezifische) Immunantwort, die jeweils einen zellulären und einen humoralen Teil beinhalten und deren einzelne Bestandteile hier überblickend aufgeführt sind.

Die angeborene Immunantwort ist die erste Abwehrreaktion, welche vor der Aktivierung des erworbenen Immunsystems einsetzt und zumeist bereits sehr effektiv ist. Sie ist jedoch unspezifisch bei der Erkennung von Krankheitserregern. Die Hauptakteure des angeborenen Immunsystems sind Granulozyten, Makrophagen, NK (natürliche Killerzellen) -Zellen und Endothelzellen als zelluläre und das Komplementsystem, einige Zytokine und Enzyme als lösliche (humorale) Faktoren. Dahingegen wird das adaptive oder erworbene Immunsystem erst bei Präsenz eines Pathogens aktiviert und zeigt für dieses eine klare Spezifität. Es erkennt körperfremde und toleriert in der Regel körpereigene Zellen, erkennt und bekämpft jedoch auch körpereigene entartete Tumorzellen. Das erworbene Immunsystem ist darüber hinaus auch in der Lage, zwischen harmlosen und gefährlichen Fremdantigenen zu unterscheiden, so können beispielsweise bestimmte Allergene als fremd aber ungefährlich eingestuft werden. T-Lymphozyten sind die wichtigsten zellulären Agenten der erworbenen Immunabwehr, von Plasmazellen gebildete Antikörper/Immunglobuline die wichtigsten humoralen. Durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen zeichnet sich die erworbene Immunantwort durch eine gesteigerte Effektivität aus. Zu den Geweben des Immunsystems zählen neben den primären Immunorganen Knochenmark und Thymus, in welchen Lymphozyten heranreifen und kompetent

werden, die sekundären Immunorgane wie Lymphknoten, Milz und Adenoide. In ihnen erfolgt die Initiierung der erworbenen Immunantwort durch das Aufeinandertreffen antigenpräsentierender Zellen (APZ) und Lymphozyten sowie ihre Weiterentwicklung und Differenzierung durch B- und T-Zell-Interaktion.<sup>4,5</sup>

Das Immunsystem ist für jedes Lebensalter optimal ausgerichtet. Bereits direkt nach der Geburt besteht die Notwendigkeit der raschen Entwicklung einer neonatalen Immunantwort. Diese ergibt sich durch unmittelbare Exposition mit Umweltantigenen und Pathogenen. Gleichzeitig ist es erforderlich, Entzündungen zu reglementieren, um den Schutz der sich entwickelnden Gewebe gewährleisten zu können. Neben Exposition mit Antigenen, APZs und Lymphozyten wird die Entwicklung der neonatalen Immunität auch durch maternale Antikörper und Zytokine beeinflusst.<sup>6</sup> In den ersten sieben Lebenstagen ändert sich die zelluläre Zusammensetzung des Blutes nach einem gewissen Entwicklungsverlauf, so erfolgt eine Verminderung der Granulozyten, der plasmoiden dendritischen Zellen und der NKs bei gleichzeitiger Zunahme der myeloiden dendritischen Zellen.<sup>7</sup> Gleichzeitig unterlaufen auch die humoralen Bestandteile Veränderungen, so nimmt beispielsweise  $IFN\gamma$  zu,  $IL6$ , welches in der Neonatalzeit als Biomarker für Entzündungen verwendet wird,<sup>8</sup> dahingegen ab. Auch die Entwicklung der Diversität an B-Zellen und Antikörpern, welche bereits pränatal beginnt, findet ihren Abschluss nicht vor Ablauf der ersten Lebensmonate.<sup>9</sup>

## **1.2 Lymphozyten: Agenten des erworbenen Immunsystems**

Lymphozyten sind neben antigenpräsentierenden Zellen entscheidende Agenten der erworbenen Immunantwort, sie können anhand bestimmter Markerproteine (CD-Antigene, *cluster of differentiation*) auf ihrer Zelloberfläche weiter in B- und T-Lymphozyten und deren Subpopulationen sowie NK-Zellen unterteilt werden. Letztere tragen gleichzeitig Merkmale von NK-Zellen und T-Zellen, besitzen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren und spielen eine entscheidende Rolle an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität.<sup>10</sup>

Während T-Zellen an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind, bilden B-Zellen als Träger der humoralen Immunantwort spezifische Antikörper. Als naive Lymphozyten werden T- oder B-Zellen vor Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen bezeichnet. Nach Antigenkontakt erfolgt ihre Differenzierung zu Effektorlymphozyten,

entweder in antikörperproduzierende B-Zellen oder T-Effektorzellen. Ein Teil der Zellen entwickelt sich nach Antigenkontakt weiter zu Gedächtniszellen.<sup>5</sup>

### **1.2.1 Bildung und Aktivierung von T-Lymphozyten**

Die Bildung der Vorläuferzellen von T-Lymphozyten erfolgt im Knochenmark. Nach anschließender Migration in den Thymus erfolgt hier die weitere Entwicklung. Bei der Reifung im Thymus sollen T-Zellen die Fähigkeit erlernen, eigen von fremd zu unterscheiden. Nach Abschluss der Reifung verlassen die T-Zellen den Thymus. Aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich so Lymphozyten, die jeweils einen spezifischen Antigenrezeptor tragen. Die Antigenerkennung reifer T-Zellen erfolgt über sogenannte spezifische T-Zell-Rezeptoren (TZR) über an MHC- (*major histocompatibility complex*) gebundene Peptidfragmente auf APZ.

Durch die Bindung körperfremder Antigene über diese Rezeptoren wird die Aktivierung und Teilung eines reifen naiven Lymphozyten induziert. Auf diese Weise entsteht ein Klon von Lymphozyten, die alle den gleichen antigenspezifischen Rezeptor tragen (klonale Selektion).

Somit sind für die Aktivierung von T-Zellen drei Signale nötig. Das erste ist gegeben durch die Bindung des Antigens, präsentiert durch MHC an den TZR-Komplex. Für eine optimale Aktivierung brauchen T-Zellen ein zweites kostimulatorisches Signal. Dieses wird vermittelt durch die Bindung von CD28 auf T-Zellen an die entsprechenden Liganden CD80/CD86 auf APZ (zumeist dendritischen Zellen). Das Fehlen der kostimulatorischen Signale führt zur unvollständigen Aktivierung der T-Zellen, zur T-Zell-Anergie. Das dritte Signal wird schließlich durch Zytokine vermittelt, die bestimmen, zu welchen unterschiedlichen Effektorpopulationen die T-Zellen differenzieren.<sup>11,12</sup>

Nach neueren Studien scheinen sich T-Zellen von Neonaten und Erwachsenen dahingehend zu unterscheiden, als dass sie sich aus verschiedenen Populationen hämatopoetischer Stammzellen entwickeln, die in unterschiedlichen Stadien und Ausprägungen vorliegen und sequenziell freigegeben werden. Dementsprechend scheint die Entwicklung des Immunsystems vom Fetus zum Erwachsenen kein linearer Prozess zu sein.<sup>13</sup> Naive T-Zellen von Neonaten scheinen von fetalen hämatopoetischen Stammzellen abstammen und kürzere T-Zell-Rezeptoren aufzuweisen. Gegenüber den T-Zellen von Erwachsenen differenzieren sie sich

schneller in T-Effektorzellen, wohingegen nur ein geringerer Anteil in langlebige Gedächtniszellen übergeht.<sup>6</sup>

### **1.2.2 Recent thymic emigrants/naive T-Zellen**

Als naive T-Zellen wurden ursprünglich diejenigen T-Zellen bezeichnet, welche direkt aus dem Thymus in die Peripherie freigegeben werden und noch vor jeglichem Antigenkontakt stehen, um sich weiter in T-Effektor- oder T-Gedächtniszellen zu differenzieren.<sup>14</sup> Jedoch konnte gezeigt werden, dass Kontakt zu MHC II-Molekülen über den TZR für die Aktivierung, die Homöostase und somit das Überleben von den sogenannten naiven T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt.<sup>15,16</sup> Unklar bleibt, welche Antigenpeptide (eigen oder fremd) hierbei eine Rolle spielen und wie genau deren Präsentation erfolgt.<sup>14</sup> Obwohl in der Pubertät eine Involution des Thymus stattfindet und in einer reduzierten Bildung von T-Zellen resultiert, bleibt der T-Zell-Pool in der Peripherie auch über die Pubertät hinaus relativ stabil. Naive T-Zellen müssen sich folglich durch Homöostase selbst erneuern.<sup>15</sup> Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass mindestens zwei Populationen naiver T-Zellen existieren müssen, eine, welche kürzlich aus dem Thymus emigriert ist (RTE, *recent thymic emigrants*) und eine andere, bei welcher eine Proliferation in der Peripherie stattgefunden hat.<sup>17</sup>

RTEs sind die in kindlichem Blut und Geweben vorherrschende Subpopulation und werden bei Erwachsenen deutlich weniger häufig gefunden.<sup>18,19</sup> Da RTEs einen Großteil der T-Zell-Population bei Neugeborenen und Kindern ausmachen, wurde ihre Analyse in dieser Arbeit der Analyse naiver T-Zellen im herkömmlichen Sinne vorgezogen. Als zellulärer Marker wurde das Oberflächenmolekül CD31 verwendet.

### **1.2.3 T-Effektorzellen**

Nach der Aktivierung erfolgt eine weitere Differenzierung in spezifische Effektorzellen sowie Gedächtniszellen. T-Zellen können zu unterschiedlichen, einzigartigen und spezifischen Effektorpopulationen differenzieren, die charakterisiert sind durch das Profil der von ihnen sezernierten Zytokine und die Expression von Oberflächenmolekülen.<sup>1</sup> Gedächtniszellen ermöglichen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine rasche klonale Expansion, d.h. aus den bereits vorliegenden spezifischen Gedächtniszellen entsteht ein Reservoir spezifischer Effektor- und Gedächtniszellen.<sup>20,21</sup>

T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ) exprimieren CD4-Moleküle auf ihrer Oberfläche und erkennen Antigene auf MHC II-Molekülen, wohingegen zytotoxische T-Zellen ( $T_C$ ) CD8-Moleküle tragen und auf die Präsentation von MHC I-Molekülen angewiesen sind.

Grundsätzlich unterscheiden sich  $T_H$ -Zellen und  $T_C$ -Zellen anhand funktioneller Gesichtspunkte.  $T_H$ -Zellen sind neben der Abwehr von Mikroorganismen vor allem für die Initiierung einer Entzündung bei immunologischen Erkrankungen verantwortlich. Darüber hinaus sind B-Zellen für die Produktion hochaffiner Antikörper zur Bekämpfung viraler Erreger auf  $T_H$ -Zellen angewiesen. Zytotoxische T-Zellen haben dahingegen die Aufgabe, Zielzellen antigenabhängig direkt zu töten und dienen somit vor allem der Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern, vor allem Viren.<sup>22,23</sup>

### 1.2.3.1 CD4+T-Helfer-Zellen

$T_H$ -Zellen differenzieren sich mittels Interleukin (IL)-2-induzierter Proliferation weiter zu T-Effektorzellen. Diese müssen zur Ausübung ihrer spezifischen Funktionen nicht mehr über kostimulatorische Moleküle aktiviert werden. Undifferenzierte  $T_H$ -Zellen können sich in Abhängigkeit von dem durch dendritische Zellen produzierten Interleukin-Milieu zu verschiedenen Subpopulationen entwickeln. In Gegenwart von IL12 differenzieren die Zellen zu  $T_H1$ -, in Anwesenheit von IL4 zu  $T_H2$ -Zellen,<sup>24,25</sup> entsprechend andere Faktoren induzieren die Differenzierung zu  $T_H17$ -,  $T_H9$ -,  $T_H22$ -Zellen und  $T_{regs}$  (regulatorischen T-Zellen). Jede Subpopulation sezerniert ganz unterschiedliche Zytokine.<sup>12,23</sup> Obwohl diskutiert wird, dass  $IFN\gamma$ -sekretierende  $T_H1$ -Zellen für die Abwehr intrazellulärer Pathogene essenziell und  $T_H17$ -Zellen bei Kindern entscheidend an der mukokutanen Immunität insbesondere gegen Candida und Staphylokokken beteiligt sind, wird angenommen, dass ein Gleichgewicht von beiden optimal ist.<sup>2,26,27</sup> Die Produktion von Signalzytokinen wie IL17 scheint bei Kindern jedoch nicht so eindeutig zu sein wie bei fetalen und neonatalen T-Zellen, welche verstärkt IL8, IL17 und teilweise auch IL10 exprimieren.<sup>28,29</sup> So konnte in einer Studie an ein- bis fünfjährigen Kindern keine erhöhte Produktion von IL8 oder IL17 in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden.<sup>30</sup>

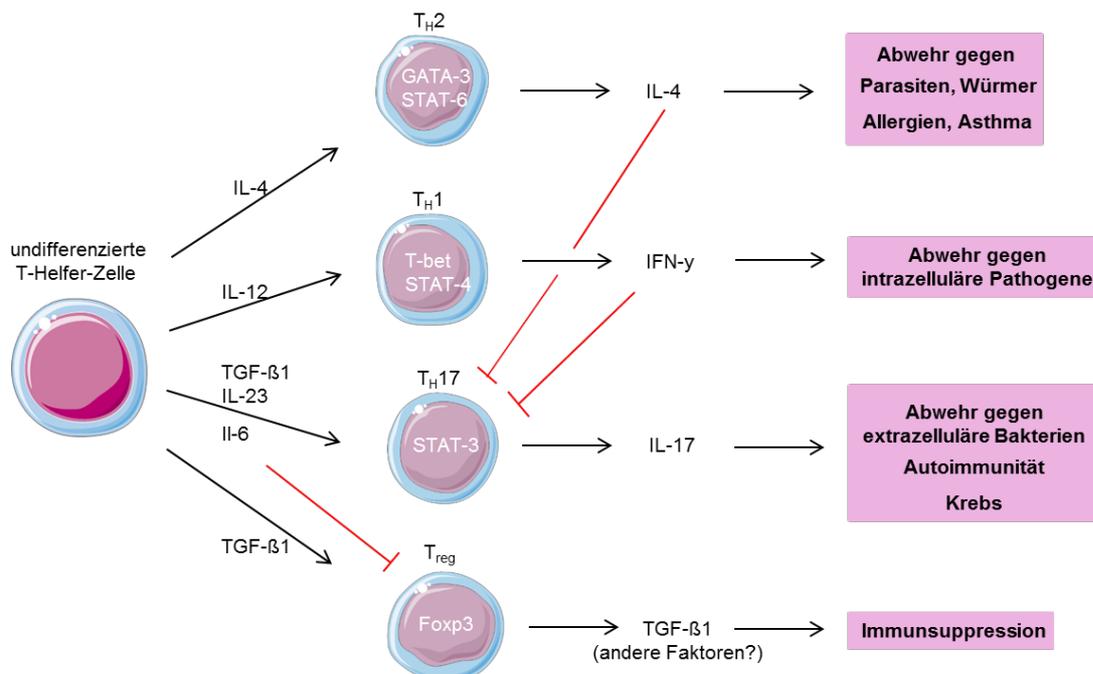
IL4 produzierende  $T_H2$ -Zellen sind wesentlich verantwortlich für die Bekämpfung von Pilzen und Parasiten und spielen eine wichtige Rolle bei Allergien und Asthma.<sup>31</sup> Im Rahmen der Entwicklung von Immunantworten bei Neonaten und Kindern scheint unter gewissen Umständen die Tendenz zu bestehen, Th2-Zytokine wie IL4, IL5 und IL10 zu produzieren, was auf Kosten der Produktion von Th1-Zytokinen wie  $IFN\gamma$ , IL2

und  $TNF\alpha$  geht. Die verminderte Sekretion von  $IFN\gamma$  scheint durch eine vermehrte Transkription und Produktion von IL4 bedingt zu sein.<sup>24,32</sup>

$T_H9$ -Zellen wurden einerseits im Zusammenhang mit inflammatorischen Erkrankungen wie Allergien, Asthma und Neurodermitis gefunden, andererseits sind Mechanismen beschrieben, in denen  $T_H9$ -Differenzierung und  $T_H9$ -Zellen eine Rolle in der Tumor-Immunologie spielen.<sup>33,34</sup>  $T_H22$ -Zellen als terminal differenzierte und sehr spezialisierte T-Helferzellen sekretieren IL22 und dienen der Protektion und Modulation von entzündetem oder geschädigtem Gewebe.<sup>35</sup>  $T_{reg}$ s haben einen wichtigen Anteil an der Entwicklung von Immuntoleranz und Aufrechterhaltung der Homöostase sowie Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen.<sup>36</sup>

Das Gleichgewicht zwischen  $T_H1$ -,  $T_H2$ -,  $T_H17$ - und  $T_{reg}$ -Zellen steht entscheidend unter dem Einfluss von Zytokinen. Dies hat auch Konsequenzen für die Art der Immunantwort, nämlich zellulär oder humoral. Durch die Sekretion von Zytokinen durch  $CD4+$  T-Zellen werden weitere Effektorzellen wie beispielsweise  $CD8+$  T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen aktiviert.<sup>5</sup>

Die genauen Abläufe bei der Differenzierung von T-Helfer-Zellen werden in Abbildung 2 noch einmal ausführlich dargestellt:



**Abbildung 2: Modell zur Differenzierung von  $T_H$ -Zellen** (angelehnt an und verallgemeinert nach „T-helper-cell differentiation“<sup>31</sup>).

Verschiedene, von dendritischen und anderen Zellen produzierte Interleukine initiieren die Differenzierung von T-Helfer-Zellen in Richtung von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen. Undifferenzierte T-Zellen werden in Anwesenheit von IL12 zu T<sub>H</sub>1-Zellen, deren Hauptzytokin IFN $\gamma$  ist und welche vorwiegend der Abwehr intrazellulärer Zytokine dienen. Bei Anwesenheit von IL4 findet eine Differenzierung in Richtung von T<sub>H</sub>2-Zellen statt, die dann mittels eigener Produktion von u.a. IL4 entscheidend für die Abwehr von Parasiten und Würmer sind und somit eine maßgebliche Rolle bei Allergien und Asthma spielen. Entscheidend für die jeweilige Differenzierung ist auch das Vorliegen spezifischer *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Moleküle und Transkriptionsfaktoren (GATA-3, Tbet, Foxp3). Bei Entzündungsreaktionen wird durch TGF $\beta$ -1 und IL6 eine Entwicklung zu T<sub>H</sub>17-Zellen induziert. Diese Entwicklung wird wiederum durch die von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierten Zytokine, IFN $\gamma$  und IL4, inhibiert. TGF $\beta$ -1 allein kann durch die Induktion des Transkriptionsfaktors FOXP3 naive T-Zellen in Richtung von regulatorischen T-Zellen differenzieren, eine Entwicklung, die ihrerseits durch IL6 gehemmt wird. Regulatorische T-Zellen produzieren immunsuppressive Zytokine (TGF $\beta$ -1, IL10) und antagonisieren IL2, sodass eine negative Regulierung von Immunantworten erfolgt.

### 1.2.3.2 CD8+ zytotoxische T-Zellen

Bei Infektionen und Entzündungen ist die Expansion von CD8+ T-Zellen deutlich ausgeprägter als die von CD4+ T-Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass CD8+ T-Effektorzellen durch Perforin- und Granzym B-Sekretion infizierte Zellen abtöten und nicht wie CD4+ T-Zellen ihre Funktion überwiegend durch Zytokinsekretion erfüllen. Auch erfordert die Differenzierung einer naiven CD8 T-Zelle zu einer zytotoxischen CD8+ T-Zelle eine höhere kostimulatorische Aktivität als die einer naiven CD4 T-Zelle. Bei manchen Virusinfektionen ist die Aktivierung reifer dendritischer Zellen, welche eine ausgeprägte intrinsische kostimulatorische Aktivität haben, ausreichend, um CD8+ T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu verhelfen. Aktivierte zytotoxische T-Zellen sezernieren auch Proteine wie IFN $\gamma$ , wodurch in benachbarten Zellen die Expression von MHC-I-Proteinen gefördert wird, sodass vermehrt intrazellulär abgebaute Peptide präsentiert und von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Hierdurch erfolgt eine Verstärkung der Immunantwort.<sup>10,37</sup>

CD8+ T-Zellen sezernieren ebenfalls, wenn auch in geringerem Umfang, Zytokine. Analog zu CD4+ T-Zellen ist das erste Zytokin, welches nach Antigenkontakt produziert wird, IL2. Auch die Produktion von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL6 und IL17 wird beschrieben.<sup>38</sup>

Es wird angenommen, dass CD8+ T-Zell-Antworten erst ab dem Alter von zwei Jahren adäquat generiert werden.<sup>39</sup>

#### 1.2.4 T-Gedächtniszellen

Es wird davon ausgegangen, dass zur Geburt alle T-Zellen in der Peripherie naiv sind. Erst durch die fortlaufende Antigenpräsentation im Laufe der Kindheit kommt es zur zunehmenden Entwicklung von Gedächtniszellen. Die am stärksten ausgeprägte Zunahme findet während der ersten zehn Jahre statt.<sup>40</sup>

Die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses ist das entscheidende Markenzeichen des angeborenen Immunsystems. Die Ausbildung von Gedächtniszellen führt nach einer überstandenen Infektion zum Zustand der Immunität; sekundäre Reaktionen auf ein bekanntes Antigen werden durch Gedächtniszellen induziert. Sie sind maßgeblich für einen nachhaltigen und effektiven Schutz gegen Infektionen mit intrazellulären Pathogenen in peripheren Geweben und bekämpfen Antigene bei erneutem Kontakt in sekundären Lymphorganen.<sup>41,42</sup> Es wird angenommen, dass Gedächtniszellen in der Lage sind, sich bei erneutem Antigenkontakt wiederum zu hochfunktionalen Effektorzellen differenzieren zu können.<sup>10,37</sup> Durch diesen Mechanismus ist es möglich, mit der gezielten Verabreichung von Antigenen im Rahmen einer Impfung ein immunologisches Gedächtnis und somit einen Schutz vor dem krankheitsauslösenden Pathogen zu schaffen.<sup>41,43</sup>

Es werden verschiedene Arten von Gedächtniszellen mit jeweils spezifischen Funktionen beschrieben. Nach einem Modell von Farber<sup>40</sup> wird eine progressive Differenzierung angenommen, indem sich abhängig vom Ausmaß der Antigenpräsentation aktivierte naive T-Zellen nacheinander zu stammzellähnlichen Gedächtniszellen ( $T_{SCM}$ ), zentralen Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ , *central memory*) und Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ , *effector memory*) entwickeln, welche als Vorstufen von T-Effektorzellen dienen. Sogenannte CCR7+, CD62L+ zentrale Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ , *central memory*), welche in sekundären Lymphorganen ansässig sind und nur wenig direkte Effektorfunktionen haben, stehen CCR7-, CD62L- Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ , *effector memory*) gegenüber, welche an den Ort der Entzündung in periphere Gewebe auswandern und unmittelbare Effektorfunktionen aufweisen. Letztere haben wenig proliferative Kapazität, wohingegen  $T_{CM}$  bei Antigenkontakt rasch proliferieren und sich zu hochfunktionalen Effektorzellen differenzieren können.<sup>38,44</sup> Effektor-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ), welche nach

Antigenkontakt umgehend agieren und das eindringende Pathogen bekämpfen können, liegen allen T-Zell-generierten Impfkonzepthen zugrunde.<sup>45</sup>

### **1.2.5 Multifunktionale T-Zellen**

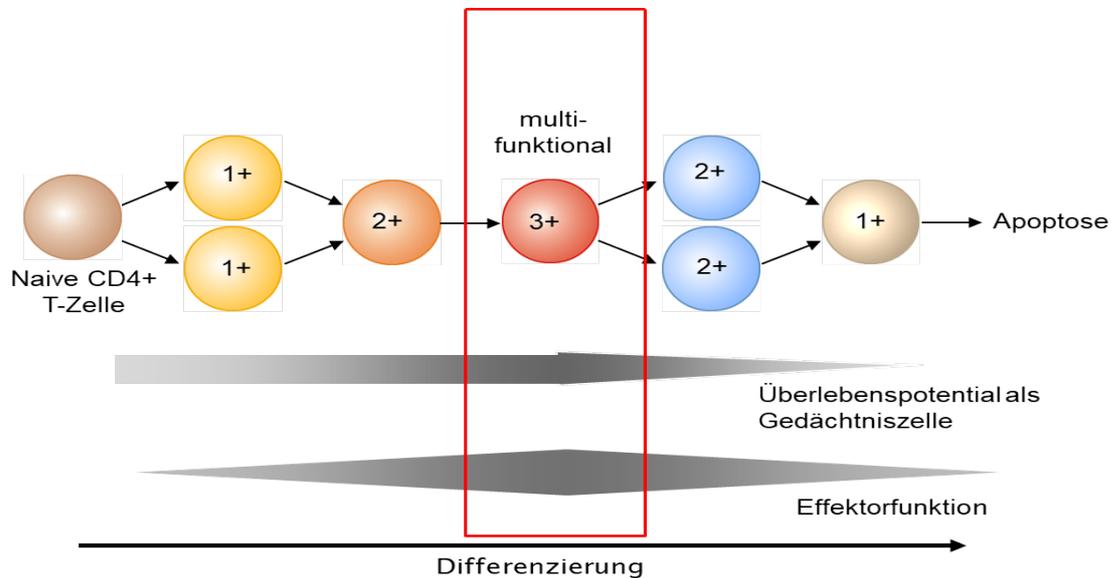
Das Ausmaß der Funktionen von T-Zellen umfasst neben der Fähigkeit zur Proliferation das Anlocken anderer Immunzellen durch die Sezernierung von Chemokinen (chemotaktisch-wirkende Zytokinen) sowie das Abtöten infektiöser Zellen durch Zytolyse über Zytokine.<sup>46</sup> Je nach sezerniertem Zytokinmuster entstehen somit funktionell unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen, welche die Qualität der T-Zell-Antwort bestimmen. Die T-Zell-Qualität wiederum ist maßgeblich für den Ablauf von Infektionen. Es wird angenommen, dass bei einer Immunantwort der beste protektive Schutz gegen Infektionen von sogenannten multifunktionalen T-Zellen ausgeht, d.h. Zellen die gleichzeitig mehrere Zytokine produzieren, welche sich durch eine bestimmte Kombination an Effektorfunktionen auszeichnen und ein größeres Überlebenspotenzial aufweisen.

Nach Seder kann die Differenzierung zu multifunktionalen T-Zellen modellhaft als linearer Prozess dargestellt werden, in welchem die Zellen mit jeder Entwicklungsstufe an Funktionalität dazugewinnen, bis sie das für sich optimale Effektorstadium erreicht haben (Abbildung 3A). Dieses Stadium höchster Funktionalität kann beispielweise für T<sub>H</sub>1-Zellen durch die simultane Sekretion von IFN $\gamma$ , IL2 und TNF $\alpha$  gekennzeichnet sein. Ein Fortbestehen der Stimulation führt zu einem Rückgang der Zytokinproduktion und somit Funktionalität der T-Zelle, diminuiert ihr Überlebenspotential als Gedächtniszelle und resultiert in kurzlebigen, terminal-differenzierten Effektorzellen und schließlich in Apoptose.<sup>46</sup>

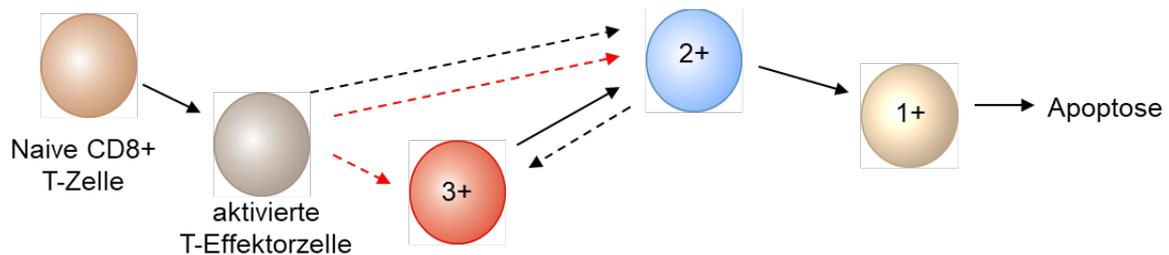
Die Differenzierung zu multifunktionalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen folgt nach Seder einem ähnlichen Modell (Abbildung 3B). Bei Stimulierung durch Antigenpräsentation entwickeln sich naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivierten Effektorzellen, welche sich bei weiter andauernder Stimulierung durch die simultane Sekretion mehrerer Zytokine auszeichnen können, bis sie schließlich zu terminal differenzierte Effektorzellen werden, welche an Funktionalität einbüßen und schließlich in die Apoptose übergehen. Das Ausmaß und die Dauer der Antigenpräsentation sind entscheidend für die Qualität der T-Zell-Antwort und somit für die funktionelle Kapazität der T-Zellen. Als optimaler Stimulus zur Ausbildung langlebiger, hochfunktionaler T-Zellen wird eine hohe

Antigenkonzentration über einen begrenzten Zeitraum angenommen, wie sie sich beispielsweise bei akuten viralen Infektionen findet.<sup>37</sup>

(A)



(B)



Anmerkung: 1+ Einfach-Produzenten, 2+ Doppel-Produzenten, 3+ Tripel-Produzenten oder multifunktionale T-Zellen.

**Abbildung 3: Modell zur Differenzierung multifunktionaler T-Zellen** (angelehnt an und verallgemeinert nach „Models for effector and memory T-cell differentiation“<sup>46</sup>).

(A) CD4+ T-Zell-Differenzierung kann als linearer Prozess verstanden werden, bei welchem die optimale Aktivierung zur progressiven Zunahme an Funktionalität der T-Zellen führt und schließlich in der Ausbildung multifunktionaler T-Zellen (z.B.  $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha/\text{IL2}$ -Produzenten) resultiert, die sich durch eine erhöhte Effektorfunktion und ein gesteigertes Überlebenspotential auszeichnen. Die weitere Stimulation der Zellen bewirkt, begleitet vom Verlust an Funktionen, die terminale Differenzierung mit anschließendem Zelltod.

(B) Zwei Modelle zur Differenzierung von CD8+ T-Zellen werden gezeigt, lineare Differenzierung wird durch schwarz-gestrichelte Pfeile, vordeterminierte Zellabstammung durch rot-gestrichelte Pfeile dargestellt. Stimulation naiver CD8+ T-Zellen führt somit zu deren Differenzierung zu aktivierten T-Effektorzellen, die mehrere Zytokine gleichzeitig produzieren können. Ebenso wie bei CD4+ T-Zellen führt auch bei CD8+ T-Zellen eine fortbestehende Stimulation der Zellen zu terminaler Differenzierung und schließlich zur Apoptose.

Die Differenzierung von T-Zellen in funktionelle Subpopulationen ist maßgeblich für die Qualität der T-Zell-Antwort, welche über den Verlauf von Infektionen entscheidet. Für den protektiven Schutz multifunktionaler CD4+ und CD8+ T-Zellen werden vielfältige Mechanismen angenommen. Auf die einzelne Zelle gesehen produzieren multifunktionale Zellen mehr IFN $\gamma$ . Zudem zeigen T-Zellen, die gleichzeitig IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  sezernieren, ein höheres zytolytisches Potential als die, die lediglich IFN $\gamma$  produzieren.<sup>47,48</sup> Darüber hinaus wird angenommen, dass durch die IL2 Sekretion die autokrine und parakrine Ausbreitung von T-Zellen initiiert wird, was die Gedächtnisfunktion von CD8+ T-Zellen verstärken könnte.<sup>11,49</sup>

## 1.3 Adenoide

### 1.3.1 Klinische Symptomatik bei hypertrophierten Adenoiden

Die Tonsilla pharyngea (Rachenmandel, Adenoide) besteht aus lymphoepithelialeem Gewebe und gehört zu den sekundär lymphatischen Organen. Ihre Lage im Nasopharynx direkt hinter den Choanen der Nase prädisponiert sie zu einer kritischen Position im oberen Respirationstrakt des Menschen, sie hat aufgrund ihrer anatomischen Lokalisation den ersten Kontakt mit den durch die Nase inhalierten Antigenen. Die Aufgabe dieser unpaaren Tonsille besteht in der Infektabwehr. Sie stellt eine Barriere für Krankheitserreger dar, welche vorwiegend über die Nasenschleimhaut in den Rachen gelangen.<sup>50</sup> Im Rahmen des Erwerbs kindlicher Immunkompetenz kann es in den ersten Lebensjahren zu einer Vergrößerung (Hypertrophie) kommen, welche als Adenoide Vegetation bezeichnet wird. Die Vermehrung des lymphatischen Gewebes ist per se noch nicht als pathologisch zu betrachten, sondern spiegelt vielmehr die immunologische Aktivität wider. Eine Erkrankung liegt erst dann vor, wenn die Hypertrophie klinische Symptome nach sich zieht. Hierbei spielt das konstitutionelle Verhältnis zwischen Größe des Nasopharynx und Adenoiden eine wichtige Rolle. Vergrößerte Adenoide können zu einer starken Behinderung der Nasenatmung führen, welches klinisch vor allem den kindlichen Schlaf beeinträchtigen kann.<sup>51</sup>

Bisher wird angenommen, dass die adenoide Hypertrophie auf rezidivierende Infekte und somit das Auseinandersetzen des kindlichen Organismus mit infektiösen Agenten und Allergenen zurückgeht. Die Verlegung des Nasenrachenraums kann darüber hinaus eine erhöhte Anfälligkeit für Infekte der oberen Atemwege nach sich ziehen. Mangelnde Ventilation und Drainage der Nasennebenhöhle sowie aufsteigende bakterielle Entzündungen können bei simultan bestehenden entzündlichen Prozessen des adenoiden Gewebes rezidivierende bzw. chronische Rhinosinuitiden nach sich ziehen. Die ständige Mundatmung kann zu einem Etagenwechsel mit Entstehung von Laryngitis, Tracheitis oder Bronchitis führen.<sup>52</sup>

Außerdem kann die Obstruktion des pharyngealen Ostiums der Tuba auditiva und die daraus resultierende Belüftungsstörung neben einem Paukenerguss auch häufige Mittelohrentzündungen bedingen.<sup>53,54</sup> Für diesen Folgeprozess ist jedoch weniger die Größe der Rachenmandel bedeutend, da es nur selten zu einer direkten mechanischen Blockade durch das Adenoid kommt. Vielmehr scheint die chronisch bestehende Adenoiditis ein pathogenes Keimreservoir darzustellen und dadurch

rezidivierende bzw. chronische Otitiden zu begünstigen und zu induzieren.<sup>55,56</sup> Gleichzeitig kann die mangelnde Tubenventilation zu einer Schalleitungsschwerhörigkeit führen, welche bei längerem Vorliegen besonders in den ersten drei bis vier Lebensjahren ihrerseits Sprachentwicklungsverzögerungen zur Folge haben kann.<sup>57</sup>

### 1.3.2 Diagnostik

Die Diagnose einer adenoiden Hypertrophie kann aufgrund der o.g. charakteristischen Symptomatik zumeist bereits durch die typische Klinik gestellt werden, welche sich durch Mundatmung, nasale Sprache, nächtliches Schnarchen, rezidivierende Infekte sowie Hörminderung und teils Sprachentwicklungsverzögerung darstellt. Die klinische Untersuchung enthält eine Inspektion der Nase und des Rachens, wobei zur Beurteilung von Form und Größe der Adenoide eine posteriore Rhinoskopie bzw. Endoskopie mit einer dünnen Optik nötig wäre. Auf diese wird im klinischen Alltag überwiegend verzichtet, da sie von den zumeist noch sehr kleinen Kindern in der Regel nicht toleriert wird.<sup>58,59</sup>

An apparativen Untersuchungen erfolgt eine ohrmikroskopische Untersuchung der Trommelfelle, welche bereits erste Hinweise auf einen Paukenerguss liefern kann. Zur Funktionsdiagnostik des Schalleitungsapparates wird eine Tympanometrie durchgeführt, welche durch ein abgeflachtes Tympanogramm das Vorliegen eines Paukenergusses nachweist. Dieses Untersuchungsverfahren gehört zur Impedanzaudiometrie und ermöglicht indirekt die Messung der Funktion der Tuba auditiva.<sup>60</sup> Zusätzlich werden transitorisch evozierte otoakustische Emissionen (TEOAEs) abgeleitet, um die Funktion der äußeren Haarzellen in der Hörschnecke zu prüfen. Bei vorliegendem Paukenerguss kann es vorkommen, dass der Schall die Haarzellen nicht erreicht, also keine TEOAEs ableitbar sind. Nach erfolgter Operation mit Paukendrainage sind die Emissionen meistens wieder nachweisbar, was ein Zeichen dafür ist, dass das Kind hört.<sup>61</sup> Bei älteren Kindern ab ungefähr fünf Jahren, die bereits aktiv bei einer Untersuchung mitarbeiten können, wird anstelle des Ableitens otoakustischer Emissionen ein Sprach- oder Reintonaudiogramm durchgeführt. Zur Hörschwellenbestimmung oder bei unkooperativen Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Schwerhörigkeit besteht, gibt es zudem die Möglichkeit, intraoperativ eine Hirnstammaudiometrie (BERA, *brainstem-evoked response audiometry*), durchzuführen.<sup>62</sup>

### 1.3.3 Therapie

Eine etablierte konservative Therapie zur Behandlung Adenoider Hypertrophie existiert nicht. Mit zunehmendem Alter führt die Vergrößerung des Nasen-Rachen-Raums zu einem deutlichen Rückgang der Symptomatik, da es aufgrund des veränderten Größenverhältnisses durch das hypertrophierte Adenoid nicht mehr so schnell zu einer mechanischen Blockade und vor allem weitaus weniger häufig zu den dadurch verursachten Infekten der oberen Atemwege oder des Mittelohres kommt. Somit erscheint ein abwartendes Verhalten bei weniger ausgeprägten Fällen gerechtfertigt.

Eine konservative Behandlung der Sekundärinfektionen ist ebenfalls möglich. Bei Paukenerguss kann ein konservativer Therapieversuch zur Verbesserung der Belüftung des Mittelohrs durch abschwellende Nasentropfen und Manöver mit Druckausgleich wie nasales Aufblasen eines Ballons erfolgen.<sup>50</sup>

Die einzig kausale Therapie bleibt jedoch die operative Entfernung des hypertrophierten Adenoids. Eine Adenotomie wird in Inhalationsnarkose durchgeführt. Mittels eines Beckmannschen Ringmessers wird das komplette Adenoid ausgeschabt. Bei gleichzeitig bestehendem Paukenerguss erfolgt zusätzlich eine Parazentese bzw. die Einlage eines Paukenröhrchens zur Drainage. Die Auswahl der Art der Paukenröhrchen erfolgt je nach intraoperativem Ohrenbefund. Dauerröhrchen aus Titan können bis zu einem Jahr im Trommelfell verbleiben und somit die langfristige Drainage sicherstellen.

Da keine Nachteile der Adenotomie auf die Immunabwehr bei Kindern nachgewiesen sind, der klinische Nutzen bei zum Teil sehr ausgeprägter Symptomatik aber groß ist, wird der Eingriff auch schon bei Kleinkindern durchgeführt. Der Häufigkeitssgipfel liegt zwischen dem zweiten und sechsten Lebensjahr.<sup>63</sup>

## 1.4 Zielsetzung

Eine Hypertrophie der Adenoide wird auf rezidivierende Infektionen und somit wiederholte Antigenpräsentation zurückgeführt, welche eine T-Zell-Antwort auslöst. Die altersentsprechend zugrundeliegenden T-Zell-Antworten sind nur unzureichend bekannt.<sup>64</sup> Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher auf der Untersuchung der T-Zell-Differenzierung und insbesondere dem Nachweis multifunktionaler T-Zellen in Adenoiden von Kindern. Multifunktionale T-Zellen werden mit einem besseren Schutz vor drohenden Krankheitserregern und der schnellen Abwehr von Infektionen assoziiert. Über die Fähigkeit auch junger Kinder, multifunktionale T-Zellen zu bilden, ist bislang wenig bekannt, sodass sich durch das sehr junge Patientenkollektiv dieser Studie ein besseres Verständnis davon erhofft wurde.

Anhand von verschiedenen Färbungen und anschließender durchflusszytometrischer Messungen soll neben einem quantitativen Vergleich von verschiedenen Differenzierungsstufen der T-Zellen vor allem die Koproduktion von IL2, IL17, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in CD4+ und CD8+ T-Zellen untersucht werden. Es soll ferner überprüft werden, welche Unterschiede hierbei je nach führender klinischer Symptomatik bestehen und ob sich eine Alterskorrelation herstellen lässt. Akute und chronische Infektionen als mögliche Einflussfaktoren auf die T-Zell-Differenzierung wurden ebenso betrachtet wie etwaige, durch das steigende Alter induzierte Veränderungen im Rahmen der allgemeinen Entwicklung und Ausbildung des kindlichen Immunsystems.

Ausblickend soll mit verbessertem Verständnis der Qualität der T-Zell-Antwort bei Kleinkindern und Kindern überlegt werden, ob bestimmte funktionelle T-Zellen die Anfälligkeit für Infektionen in der frühen Kindheit beeinflussen können. Darauf aufbauend gilt zu erörtern, ob die Hypertrophie der Adenoide zwangsläufig als pathologisch einzustufen ist oder ob die zugrundeliegenden Mechanismen notwendig für die Entwicklung des Immunsystems bei Kindern sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| Brutschrank                             | Heraeus, Hanau                        |
| Einfriercontainer Cryo 1°C (Mr. Frosty) | Thermo Fisher Scientific, Waltham USA |
| FACS Canto II (3-Laser, 8 Color/4-2-2)  | BD Biosciences, Heidelberg            |
| Mikroskop, CKX41                        | Olympus, Japan                        |
| Pipetten                                | Greiner BioOne, Frickenhausen         |
| Pipettenspitzen                         | Greiner BioOne, Frickenhausen         |
| Rollen-Mischgerät RM5                   | Karl Hecht GmbH, Sondheim             |
| Sicherheitswerkbank, Hera Safe          | Heraeus, Hanau                        |
| Tiefkühler (-80°C), Hera freeze         | Heraeus, Hanau                        |
| Vortexgerät MS3 basic                   | IKA, Staufen                          |
| Vortexer (MS1 Minishaker)               | IKA, Staufen                          |
| Wasserbad                               | Memmert, Schwabach                    |
| Zellzählgerät (Cell Dyn)                | Abbott Diagnostics, Chicago, USA      |
| Zentrifuge, Biofuge fresco              | Heraeus, Hanau                        |
| Zentrifuge, Multifuge 3 S-R             | Heraeus, Hanau                        |

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die angegebenen Materialien stammen, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Cellstar Greiner Bio One, Frickenhausen.

|                                 |                                     |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Einmalhandschuhe Peha-Soft      | Hartmann, Heidenheim                |
| 5 ml FACS-Röhrchen              | VWR International GmbH, Dresden     |
| 20ml Falcon-Röhrchen            | BD Biosciences, San Jose, USA       |
| Kanülen 30 G1/2, 0,3 mm x 13 mm | BD Biosciences, San Jose, USA       |
| Kryokonservierungsröhrchen      |                                     |
| Petrischalen                    |                                     |
| 30 µm Präseparationsfilter      | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| 15 ml Polypropylen-Röhrchen     |                                     |
| 50 ml Polypropylen-Röhrchen     |                                     |

|                                    |                            |
|------------------------------------|----------------------------|
| 0,5 ml Reaktionsgefäße             |                            |
| 1,5 ml Reaktionsgefäße             |                            |
| Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)       | BD Biosciences, Heidelberg |
| Zellkulturplatten, rund, (96-Loch) | STARLAB GmbH, Hamburg      |
| 70 µm Zellsieb                     | Falcon, Austin Texas, USA  |

### 2.1.3 Puffer und Medien

Die Chemikalien und Reagenzien für die verwendeten Puffer und Medien stammen von den unten aufgeführten Firmen.

|                      |   |
|----------------------|---|
| Einfriermedium       | 10% DMSO in FCS   |
| Paraformaldehyd (2%) | 5 ml 4% PFA<br>5 ml PBS/BSA   |
| PBS/BSA              | 0,2% BSA<br>in 500 ml PBS   |
| Saponin (5%)         | 10 g Saponin<br>in 200 ml PBS/BSA   |
| Saponin (0,5%)       | 5 ml 5% Saponin<br>in 45 ml PBS/BSA   |
| Zellkulturmedium     | 10% FCS (hitzeinaktiviert 1h 56°C)<br>100 U/ml Penicillin<br>100 µg/ml Streptomycin<br>in 500 ml X-Vivo-15 Medium |

### 2.1.4 Chemikalien und Lösungen

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| Brefeldin A | Sigma-Aldrich, Steinheim    |
| BSA         | Karl Roth, Karlsruhe        |
| DMSO        | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |

|  |  |
|--|--|
| FCS  | Biochrom GmbH, Berlin                  |
| Ficoll   |  |
| Fixierlösung 2% Paraformaldehyd                | Sigma-Aldrich, Steinheim               |
| Ionomycin                                      | Sigma-Aldrich, Steinheim               |
| Penicillin/Streptomycin                        | Gibco Life technologies, Schwerte      |
| PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)            | Sigma-Aldrich, Steinheim               |
| PBS (W/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Saponin  | Sigma-Aldrich, Steinheim               |
| X-Vivo-15 Medium                               | Lonza, Basel                           |

### 2.1.5 Antikörper

Die folgenden Antikörper gegen humane Epitope unterteilt in die entsprechenden Farbepanel wurden für die Durchflusszytometrie verwendet:

| Antikörper | Fluorochrome         | Klon   | Firma          |
|------------|----------------------|--------|----------------|
| αCD3       | PerCP                | SK7    | BioLegend      |
| αCD45      | APC Cy7              | H130   | BioLegend      |
| αCD4       | Pacific blue         | RPA-T4 | BioLegend      |
| αCD8       | Brilliant Violet 500 | RPA-T8 | BioLegend      |
| αCD127     | Alexa 488            | A019D5 | BioLegend      |
| αCD45RO    | PE                   | UCHL1  | BD Biosciences |
| αCD31      | PE Cy7               | WM59   | BioLegend      |
| αCD25      | APC                  | 2A3    | BD Biosciences |

Tabelle 1: Oberflächenfärbung 1.

| Antikörper | Fluorochrome     | Klon   | Firma          |
|------------|------------------|--------|----------------|
| HLA-DR     | PerCP            | L243   | BD Biosciences |
| αCD45      | APC Cy7          | H130   | BioLegend      |
| αCD4       | Pacific blue     | RPA-T4 | BioLegend      |
| αCD8       | V <sub>500</sub> | RPA-T8 | BioLegend      |
| αCD45RA    | FITC             | L48    | BD Biosciences |
| αCD45RO    | PE               | UCHL1  | BD Biosciences |
| αCD31      | PE Cy7           | WM59   | BioLegend      |
| αCD27      | APC              | O323   | BioLegend      |

Tabelle 2: Oberflächenfärbung 2.

| <b>Antikörper</b> | <b>Fluorochrome</b> | <b>Klon</b> | <b>Firma</b>   |
|-------------------|---------------------|-------------|----------------|
| αCD3              | PerCP               | SK7         | BioLegend      |
| αCD45             | APC Cy7             | H130        | BioLegend      |
| αCD4              | Pacific blue        | RPA-T4      | BioLegend      |
| αCD8              | V <sub>500</sub>    | RPA-T8      | BioLegend      |
| αIL2              | FITC                | MQ1-17H12   | BioLegend      |
| αIL17             | PE                  | eBio64DEC17 | eBioscience    |
| αIFN <sub>γ</sub> | PE Cy7              | 4S.B3       | BD Biosciences |
| αTNF <sub>α</sub> | APC                 | Mab11       | BioLegend      |

**Tabelle 3: Intrazelluläre Färbung.**

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Patientenrekrutierung**

Nach vorausgegangenem positivem Votum der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Anlage 1) erfolgte mittels eines Aufklärungsbogens (Anlage 2) sowie je eines Informationsblatts für Eltern (Anlage 3) und bereits lesefähiger Kinder (Anlage 4) die Rekrutierung der Patienten aus dem Kollektiv der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde von August bis Dezember 2011. In diesem Zeitraum konnten insgesamt 102 Kinder im Alter von ein bis elf Jahren, bei denen vorher die Indikation zur Adenotomie gestellt worden war, für die Teilnahme an der Studie gewonnen werden. Kinder, welche an bekannten Immundefekten oder genetischen Erkrankungen wie beispielsweise dem DiGeorge-Syndrom litten, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Ein für die Studie entwickelter Fragebogen (Anlage 5) wurde präoperativ von den Eltern ausgefüllt, um neben allgemeinen demografischen Daten wie Alter und Geschlecht des Kindes auch spezifische Fragen zu krankheitsbezogenen Symptomen zu beantworten. Die erhobenen klinischen Angaben wurden durch eine fortlaufende Nummerierung anonymisiert.

Eine Einteilung in klinische Gruppen erfolgte anhand dieser anamnestischen Angaben. Darüber hinaus erfolgte die Erfassung von während des stationären Verlaufs erhobenen Daten aus Epikrise und Medico-Systems mithilfe eines standardisierten Erfassungsbogens (Anlage 6).

Die gewonnenen Daten wurden mit MS-Excel 2016 erfasst, verwaltet und bearbeitet. Eine statistische Auswertung wurde mittels GraphPad Prism 6 und SPSS 22 durchgeführt.

### **2.2.2 Gruppeneinteilung**

Je nach vorherrschender klinischer Symptomatik zum Zeitpunkt der Operation wurden die Patienten in drei klinische Gruppen eingeteilt. Der Gruppe 1, in welcher die Kinder lediglich eine nasale Obstruktion durch die hypertrophierte Tonsilla pharyngea aufwiesen, wurden zwei Infektionsgruppen gegenübergestellt. Kinder aus der Gruppe 2 wiesen zusätzlich zur Hypertrophie noch rezidivierende oder chronische Atemwegsinfekte in ihrer Vorgeschichte auf. In der Gruppe 3 lagen dahingegen in der Eigenanamnese rezidivierende oder chronische Mittelohrentzündungen und insbesondere ein Paukenerguss vor, welcher zu einer Hörminderung und teilweise sogar zu einer Verzögerung der Sprachentwicklung geführt hatte.

### **2.2.3 Einteilung in Altersklassen**

Ferner wurden Vergleiche je nach Alter der Kinder zum Zeitpunkt der Operation durchgeführt. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten waren zwischen einem und elf Jahren alt. Da nur ein kleiner Anteil des Patientenkollektivs vier Jahre oder älter waren, wurden die Kinder im Alter von drei Jahren und älter in eine Altersklasse zusammengefasst. Dementsprechend wurden Einjährige, Zweijährige und Kinder im Alter von drei und älter miteinander verglichen.

### **2.2.4 Herstellung einer Zellsuspension aus Adenoiden**

Die Adenoide wurden operativ mittels Beckmannschen Ringmessers ausgeschält und in PBS-BSA-Puffer gegeben. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Zur Generierung einer mononukleären Zellsuspension (MZ) aus dem Adenoiden Gewebe wurde dieses zunächst mit Hilfe des Stempels einer 2ml Spritze durch ein 70µm Zellsieb gerieben, in ein 50ml Polypropylen-Röhrchen überführt und mit 20ml PBS-BSA gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300xg (Multifuge Heraeus S-R) für fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach anschließender Resuspension der Zellen mit PBS-BSA wurden diese zum Entfernen von Zellklumpen durch einen Präseparationsfilter (30µm) gegeben. Die Zellzählung erfolgte mit einem hämatologischen Analysegerät (Cell Dyn).

### **2.2.5 Einfrier- und Auftauprozess**

Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes wurden  $1-5 \times 10^7$  Zellen in 1ml Einfriermedium (10% DMSO in FCS) in 2ml Kryoröhrchen bei  $-80^\circ\text{C}$  kryokonserviert. Die Zellen wurden für bis zu drei Tage in einem Einfriercontainer bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, sodass durch eine Kühlgeschwindigkeit von  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  ein schonender Einfrierprozess gewährleistet werden konnte. Anschließend wurden die Zellen in reguläre Aufbewahrungsboxen überführt. Zur späteren Bearbeitung erfolgte dann das Auftauen der Zellen durch Schwenken im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$ . Die Zellen wurden zweimal mit 10ml X-Vivo-15 Medium gewaschen, zentrifugiert (300xg, Multifuge Heraeus S-R) und im Anschluss erfolgte die Zellzahlbestimmung mit dem hämatologischen Analysegerät (Cell Dyn). Die Zellen wurden auf  $5 \times 10^6/\text{ml}$  mit X-Vivo-15 Medium eingestellt, in 96-Loch-Platten überführt (200 $\mu\text{l}$ /Loch) und bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht ruhen gelassen.

### **2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann gleichzeitig der Phänotyp und die Effektorfunktionen von T-Zellen analysiert werden. Somit können zwischen CD4 und CD8 Effektor- und Gedächtniszellen unterschieden sowie deren Effektorfunktionen, wie die Koproduktion verschiedener Zytokine, analysiert werden. Durch Anwendung des Bool'schen Gatings (siehe unten) können die verschiedenen Zytokinkombinationen, die simultan produziert werden, dargestellt werden.

#### **2.2.6.1 Oberflächenfärbung**

Für die Phänotypisierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden unstimulierte Zellen verwendet. Zur Analyse der Oberflächenexpression verschiedener Antigene wurden die Zellen in PBS-BSA aufgenommen und für fünf Minuten bei 300xg (Multifuge3 S-R, Heraeus) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (siehe Tabelle 1 bzw. 2) in je 60 $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 5ml PBS-BSA-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300xg; Multifuge Heraeus S-R). Zum Messen der Proben am FACS Canto II wurden die Zellen in 200 $\mu\text{l}$  PBS-BSA-Puffer aufgenommen. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der Diva 6- (BD Biosciences, Heidelberg) und FlowJo 7-Software (Treestar).

## **2.2.6.2 Intrazelluläre Färbung**

### **2.2.6.2.1 Stimulation der Zellen**

Die Zytokinproduktion (IL2, IL17, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) in den T-Zellen nach PMA/Ionomycin Stimulation wurde intrazellulär mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die entsprechenden Zellkulturen wurden für sechs Stunden mit 10ng/ml PMA und 1 $\mu$ g/ml Ionomycin in Anwesenheit von 5 $\mu$ g/ml Brefeldin A stimuliert. Durch die Stimulation mit PMA und Ionomycin sollten die Zellen zur Produktion verschiedener intrazellulärer, proinflammatorischer Zytokine angeregt werden. Brefeldin A unterbindet den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, wodurch es zu einer Akkumulation der zu untersuchenden Zytokine in der Zelle kommt.

### **2.2.6.2.2 Fixierung und Färbung**

Für die intrazelluläre Färbung wurden ca. 1x10<sup>6</sup> Zellen pro Ansatz (1 Loch) eingesetzt. Die Färbung erfolgte in einer 96-Loch-Platte. Die Zellen wurden zunächst mit 2% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-BSA und im Anschluss mit einer 0,5%igen Saponin-Lösung (Permeabilisierungslösung) gewaschen und zentrifugiert (Multifuge, sieben Minuten, 400g). Es wurde hierbei ausgenutzt, dass durch Saponin Löcher in der Zellmembran entstehen, welche das Eindringen der Antikörper in die Zelle ermöglichen. Der entsprechende Antikörpercocktail (siehe Tabelle 3) in 50  $\mu$ l 0,5%igen Saponin wurde auf die Zellen pipettiert, für 20 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (400 g, fünf Minuten, Multifuge, Heraeus), mit PBS-BSA gewaschen und erneut zentrifugiert (400 g, fünf Minuten, Multifuge, Heraeus). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 200  $\mu$ l PBS-BSA resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte direkt im Anschluss am FACS-Canto II.

### 2.2.6.3 Durchflusszytometrische-Analyse

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde das FACS-Canto II (Beckton-Dickinson), ausgestattet mit drei Lasern und der Möglichkeit, acht verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig zu messen, verwendet. Die Aufnahme der FSC- und SSC-Signale werden linear, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen, welche zuvor mit Fluorochrom-Antikörperkonjugaten oder mit fluoreszenten Substanzen markiert wurden, auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Die einzeln markierten Zellen passieren nacheinander einen hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom durch drei Laserstrahlen. Die Laser regen hierbei die Fluoreszenzfarbstoffe an, wobei je nach Farbstoff verschiedene spezifische Wellenlängen emittiert werden. Dieser Prozess ist für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifisch. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird von acht verschiedenen Fotodetektoren gemessen, die hinter sogenannten „Band-Pass-Filtern“ installiert sind. Hierdurch ist gewährleistet, dass jeder Detektor nur Licht bestimmter Wellenlängenbereiche misst.<sup>65</sup>

Folgende Wellenlängen und Fluorochrome wurden bei den Messungen mit dem FACS Canto II verwendet:

| Laser (Wellenlänge) | Verwendete Fluorochrome        |
|---------------------|--------------------------------|
| Violett 405 nm      | Pacific blue                   |
| Blau 488 nm         | PerCp, FITC, PE, PE-Cy7        |
| Rot 633 nm          | APC, APC-Cy7, V <sub>500</sub> |

**Tabelle 4: Übersicht über verwendete Laser und Fluorochrome.**

Für die Bestimmung verschiedener Effektorfunktionen der Zellen ist die Messung von acht Parametern gleichzeitig von Vorteil. In unseren Färbungen wurden mindestens vier Parameter (Oberflächenmoleküle) verwendet, um die verschiedenen T-Zellen zu charakterisieren. So konnten über das Molekül CD3 alle T-Lymphozyten markiert und weiter eine Unterscheidung in CD4+ und CD8+ Zellen vorgenommen werden. Mit Hilfe der CD45RA, CD45RO Moleküle u.a. konnte die Unterteilung in naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen nachvollzogen werden. Weitere intrazelluläre Parameter ermöglichten die genauere Charakterisierung der Effektorfunktionen der T-Zellen (z.B.

Zytokinproduktion).<sup>46</sup> Mittels durchflusszytometrischer Messungen konnten auf diese Weise eine Vielzahl von intrazellulären- und Oberflächenmolekülen, welche als Surrogat-Marker dienen, auf der Ebene einer einzelnen Zelle analysiert werden. Durch kein anderes Verfahren kann die Heterogenität der einzelnen Komponenten des Immunsystems so gut dargestellt werden.<sup>66</sup>

#### **2.2.6.4 Gating**

Die aufgenommenen Zellen wurden zunächst im FSC (forward scatter) gegenüber SSC (side scatter) entsprechend ihrer Größe, Oberflächenstruktur und Granularität dargestellt. Zur Betrachtung der jeweils in Frage kommenden Zellen und um Zelltrümmer und tote Zellen auszugrenzen, mussten mittels Gating die entsprechende Zellpopulation markiert und eingegrenzt werden (Gate). Es gibt zwei Möglichkeiten des Gatings, hierarchisches und Bool'sches Gating.

Beim hierarchischen Gating werden zur Betrachtung der jeweiligen Zellpopulationen sogenannte Gates (eine definierte Region) festgelegt: Gates werden um Zellen mit gleichen Eigenschaften gesetzt (Subpopulation), auf diese Weise ist eine weitere Betrachtung und Untersuchung der selektierten Zellen möglich. Gleichzeitig können damit lebende Zellen von Zelltrümmern getrennt werden. Durch Gating wird somit entschieden, welche Zellen weiter analysiert werden und welche nicht. Es werden Eltern- und Tochter-Gates unterschieden. Jedes Eltern-Gate kann jedoch auch mehrere Tochter-Gates enthalten. Gating kann wieder und wieder auf ausgewählte Zellpopulationen angewandt werden, um eine noch genauere Unterscheidung bzw. Charakterisierung der Zellen vorzunehmen.<sup>67,68</sup>

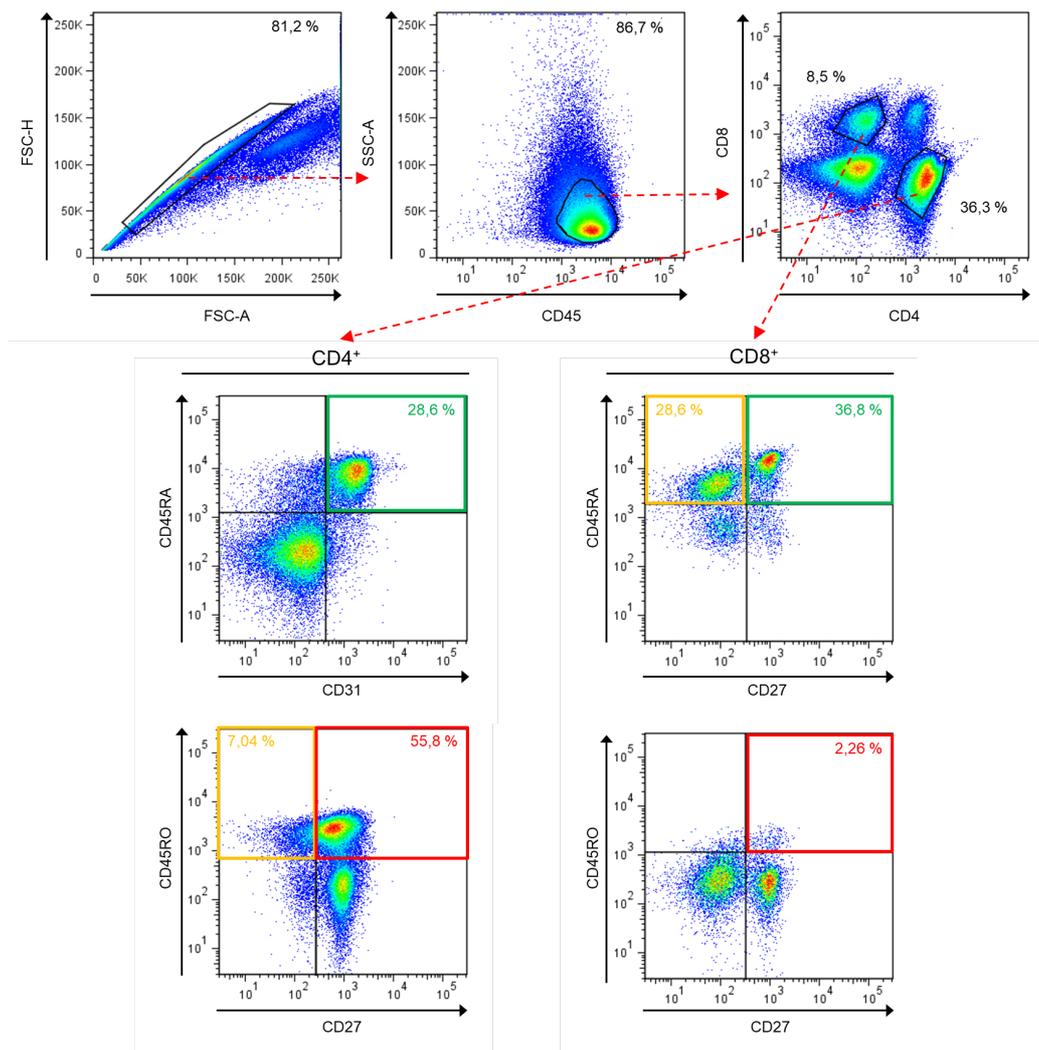
Im Vergleich zum hierarchischen oder sequenziellen Gating gibt es ferner die Möglichkeiten des Bool'schen Gatings. Bool'sches Gating wird auch als logisches Gating bezeichnet. Mit Hilfe der Bool'schen Optionen „and“, „or“ und „not“ können innerhalb der durch hierarchisches Gating erzeugten Tochter-Gates Subpopulationen gezeigt werden, welche zum Beispiel a und b, x oder y aber nicht z exprimieren. In dieser Arbeit wurden somit T-Zell-Subpopulationen analysiert, die ein spezifisches Zytokinmuster aufweisen. Die untersuchten Subpopulationen exprimieren entweder nur ein Zytokin (IL2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL17) oder koexprimieren zwei, drei oder vier dieser Zytokine gleichzeitig.<sup>69</sup>

### 2.2.6.5 Gating Strategie

Für die Analyse der multifunktionalen T-Zellen wurden die durchflusszytometrischen Rohdaten in die FlowJo Software 7.6.5 (Treestar Inc. San Carlos) transferiert und mit Hilfe der hierarchischen Gating-Strategie und dem Boole'schen algebraischen Verfahren ausgewertet.

#### 2.2.6.5.1 Phäotypisierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Wie in Abbildung 4 veranschaulicht, wurden mit Hilfe der FSC-Height (FSC-H) vs. FSC-Area (FSC-A) Darstellung in einem Pseudocolour Dot-Blot die Einzelzellen markiert. CD45 exprimierende Leukozyten wurden dann in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterteilt und weiter analysiert. Innerhalb des CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Kompartiments konnte anhand der Färbung unterschiedlicher Oberflächenproteine (CD45RO oder RA, CD27, CD31) auf unerfahrene RTE, T-Effektor- und T-Gedächtniszellen geschlossen und diese quantifiziert werden.



|              |                  |              |                  |
|--------------|------------------|--------------|------------------|
| RTE          | CD4+CD45RA+CD31+ | RTE          | CD8+CD45RA+CD27+ |
| T-Effektor   | CD4+CD45RO+CD27- | T-Effektor   | CD8+CD45RA+CD27- |
| T-Gedächtnis | CD4+CD45RO+CD27+ | T-Gedächtnis | CD8+CD45RO+CD27+ |

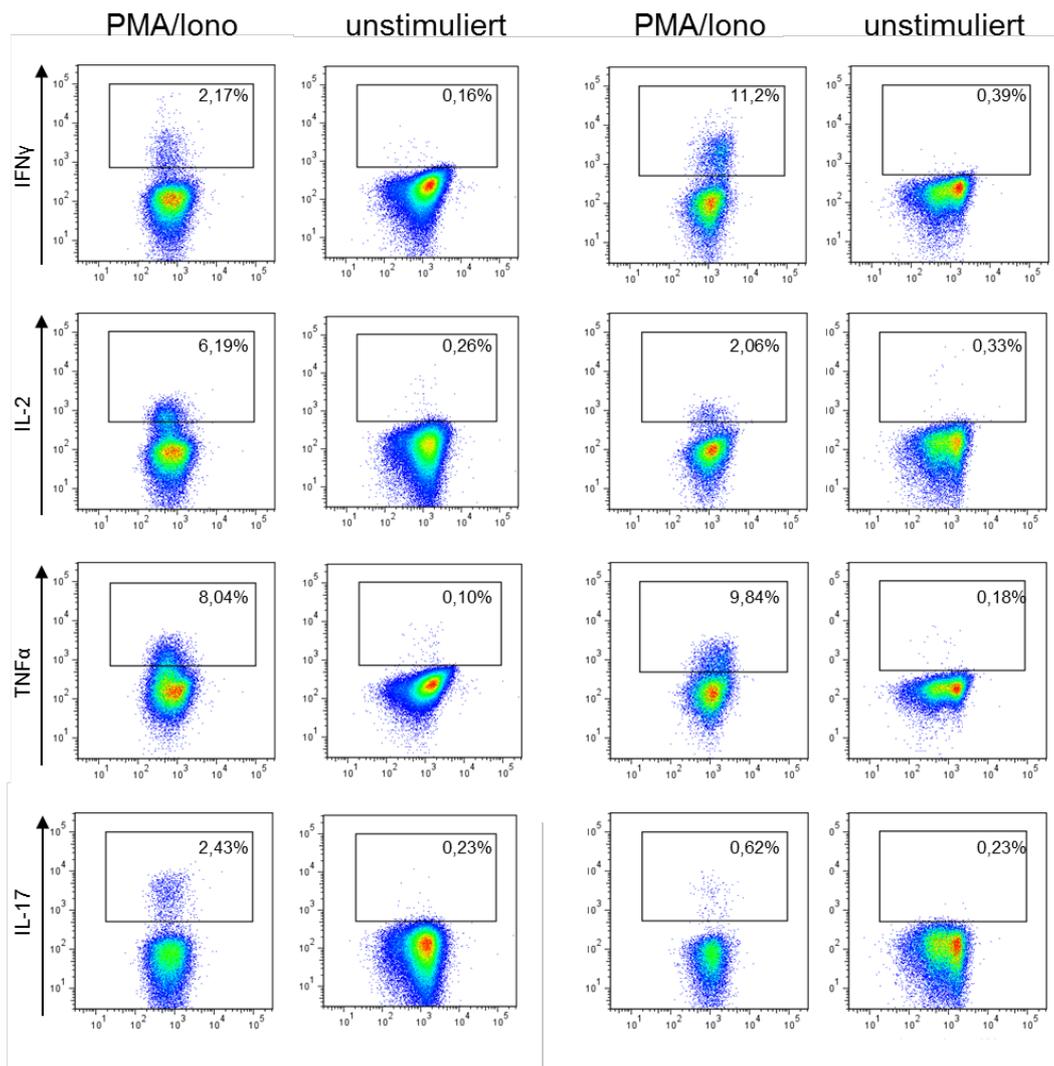
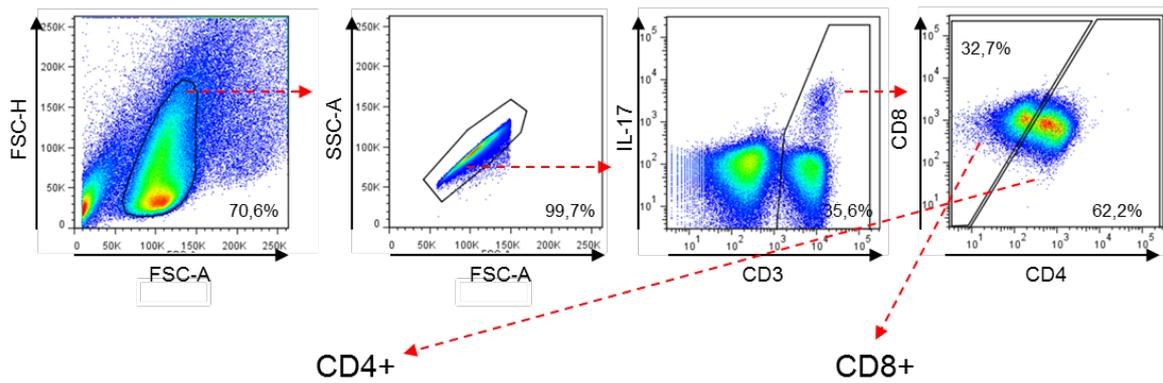
**Abbildung 4: Gating Strategie zur Phänotypisierung der CD4+ und CD8+ T-Zellen.** Kryokonservierte, unstimulierte mononukleäre Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie phänotypisch mit Hilfe des hierarchischen Gatings analysiert. Über die Darstellung des FSC-H vs. FSC-A in einem Pseudocolour Dot-Blot wurden die Zelldupletten (zusammengelagerte Zellen) eliminiert (oben links). Innerhalb der Einzelzellpopulation wurden die SSC-A CD45+ Zellen definiert (oben Mitte) und in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterteilt (oben rechts). CD4+ T-Zellen wurden in RTE (CD45RA+CD31+), T-Effektorzellen (CD45RO+CD27-) und T-Gedächtniszellen (CD45RO+CD27+) unterteilt. CD8+ T-Zellen wurden in (CD45RA+CD27+), T-Effektorzellen (CD45RA+CD27-) und T-Gedächtniszellen (CD45RO+CD27+) unterteilt.

### 2.2.6.5.2 Zytokinproduktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen

Für die Analyse der zytokinproduzierenden T-Zellen wurde zunächst auf die intakten mononukleären Zellen innerhalb eines FSC-A vs. FSC-H Dot-Blots gated. Anschließend wurden die Einzelzellen von den Dupletten getrennt (FSC-H vs. FSC-A). Über die Auswahl der CD3+ Zellen (PerCP) gegen IL17 (PE) erfolgte die Selektion der T-Lymphozyten, autofluoreszierende Zellen wurden damit entfernt. Durch die Darstellung von CD4 (Pacific Blue) gegen CD8 (AmCyan) erfolgte die Einteilung in die CD4+ und CD8+ T-Zell-Kompartiments.

Anschließend wurden die Gates für die intrazelluläre Zytokinproduktion von IFN $\gamma$ , IL2, TNF $\alpha$  und IL17 in PMA/Ionomycin stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen innerhalb der CD4+ und CD8+ T-Zell-Populationen gesetzt.

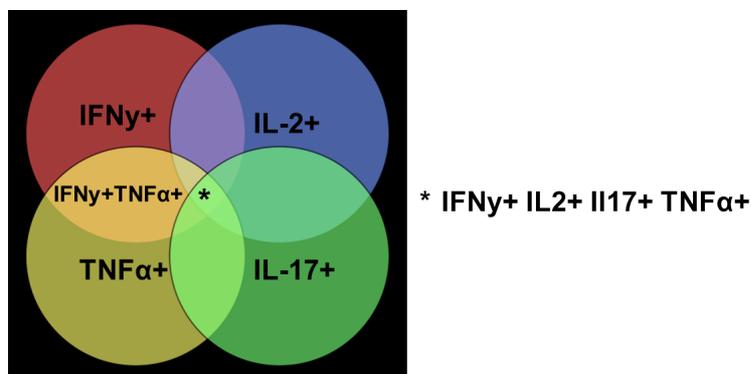
Durch die nachfolgende Verwendung der „and“, „or“ und „not“ Funktionen im Bool'schen Verfahren wurden Einzel- und Mehrfach- sowie Nicht-Zytokinproduzenten automatisch berechnet und angezeigt.



**Abbildung 5: Gating Strategie zur Analyse der Zytokinproduktion.** Beispielhafte Darstellung der Gating Strategie der durchflusszytometrisch gewonnenen Messdaten für die intrazelluläre Färbung. Durch Verwendung von hierarchischem Gating Identifizierung der jeweiligen CD4+ und CD8+ Population basierend auf den spezifischen fluoreszierenden Eigenschaften der Zellen und anderer relevanter Marker wie beispielsweise CD3. Innerhalb der CD4+ und CD8+ Populationen Bestimmung der einzelnen exprimierten Zytokine (IFN $\gamma$ , IL2; TNF $\alpha$ , IL17) nach PMA/Ionomycin Stimulation im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen. Anwendung des Bool'schen Gatings im Anschluss ermöglicht die Identifizierung multifunktionaler CD4+ und CD8+ T-Zellen (siehe unten).

Bool'sches Gating eignet sich somit hervorragend, die in dieser Arbeit schwerpunktmäßig betrachteten multifunktionalen T-Zellen, also Zellen, welche sich durch die Koproduktion von bis zu vier Zytokinen auszeichnen, darzustellen. So konnte durch Verwendung der intrazellulären Färbung (Untersuchung der Expression von  $\text{IFN}\gamma$ , IL2, IL17 und  $\text{TNF}\alpha$ ) eine Koproduktion dieser Zytokine und folglich multifunktionale  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Multiparameteranalyse ist die gleichzeitige Bestimmung des Phänotyps und der Effektorfunktionen bei ein und derselben Zelle möglich.

(A)



(B)

|              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IFN $\gamma$ | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | + | - | + |
| IL-2         | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + |
| IL-17        | - | - | + | - | - | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + |
| TNF $\alpha$ | - | - | - | + | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + |

**Abbildung 6: Exemplarische Veranschaulichung der Eigenschaften multifunktionaler Zellen.**

- (A) Durch Bool'sches Gating ist es durch die Verwendung algebraischer Verfahren wie „and“, „or“ und „not“ möglich, verschiedene Einzelpopulationen zu betrachten. Auf diese Weise können sowohl Zellen dargestellt werden, die nur ein Zytokin produzieren, als auch die Koproduktion von bis zu vier Zytokinen (hier gezeigt durch das Sternchen).
- (B) Innerhalb der  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen werden die Subpopulationen, welche ein bestimmtes Zytokin exprimieren (hier  $\text{IFN}\gamma$ , IL2, IL17 und  $\text{TNF}\alpha$ ) durch Anwendung der Bool'schen Funktionen „and“, „or“ and „not“ miteinander verrechnet und somit alle möglichen 16 Kombinationen an multifunktionalen T-Zellen identifiziert. Diese exprimieren alle vier oder jegliche mögliche Kombination der vier betrachteten Zytokine.

CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden anhand der Koexpression von IFN $\gamma$ , IL2, IL17 und TNF $\alpha$  in 16 verschiedene Untergruppen unterteilt. Basierend auf der Anzahl der synchron produzierten Zytokine wurden die 16 Untergruppen in Einzel-, Doppel-, Tripel- und Quadrupelproduzentengegliedert. Eine mögliche Kombination zeigte sich entsprechend negativ für alle vier untersuchten Zytokine, diese wurde im Folgenden in die Berechnungen nicht mit einbezogen.

|                      |  |
|----------------------|--|
| Quadrupelproduzenten | IFN $\gamma$ + IL2+ IL17+ TNF $\alpha$ + |
| Tripelproduzenten    | IFN $\gamma$ + IL2+ IL17+ TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ + IL2+ IL17- TNF $\alpha$ + |
|                      | IFN $\gamma$ + IL2- IL17+ TNF $\alpha$ + |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2+ IL17+ TNF $\alpha$ + |
| Doppelproduzenten    | IFN $\gamma$ + IL2+ IL17- TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ + IL2- IL17+ TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ + IL2- IL17- TNF $\alpha$ + |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2+ IL17+ TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2+ IL17- TNF $\alpha$ + |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2- IL17+ TNF $\alpha$ + |
| Einzelproduzenten    | IFN $\gamma$ + IL2- IL17- TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2+ IL17- TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2- IL17+ TNF $\alpha$ - |
|                      | IFN $\gamma$ - IL2- IL17- TNF $\alpha$ + |
| Vierfach negativ     | IFN $\gamma$ - IL2- IL17- TNF $\alpha$ - |

**Tabelle 5: Übersicht über die möglichen Subpopulationen anhand der Kombinationsmöglichkeiten der produzierten Zytokine.**

### **2.2.7 Statistische Analysen**

Alle Analysen wurden mit SPSS 22 (IBM) bzw. GraphPad Prism 6 Software durchgeführt. Die Normalverteilung der Variablen wurde mit einem Kolmogorov-Smirnoff-Test überprüft. Für paarweise Vergleiche wurde je nach Gauß'scher Verteilung entweder der Student-T-Test oder der nicht parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Für Mehrfachvergleiche wurde ein One-way-Anova-Test mit einem Bonferroni-Test oder die Kruskal-Wallis-Methode mit einem post-hoc Dunn-Mehrfachvergleich angewendet. Darüber hinaus wurden Two-way-Anova-Mehrfachvergleiche in Verbindung mit einem Tukey-HSD-Test (honest-significance-difference) oder Spearman-Korrelationen durchgeführt.

Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von mindestens  $p=0,05$  und damit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit ( $\alpha$ -Fehler) als signifikant angesehen. Statistische Relevanz wurde festgelegt als \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ , \*\*\*\*  $p<0,0001$ . Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  standard error of mean (SEM) dargestellt.

### **3 Ergebnisse**

Die operativ entfernten Rachenmandeln eines Kollektivs von 102 pädiatrischen Patienten wurden bezüglich des exprimierten T-Zell-Profiles und zur Eruiierung von Einflussfaktoren auf die T-Zell-Differenzierung in lymphatischen Geweben analysiert.

#### **3.1 Betrachtung des Patientenkollektivs**

##### **3.1.1 Einteilung nach klinischer Symptomatik**

102 Kinder, davon 57 Jungen und 45 Mädchen, wurden in die Studie aufgenommen. Die Patienten waren bei Hypertrophie der Rachenmandel von verschiedenen, in der Region tätigen, niedergelassenen HNO-Ärzten für die Operation zugewiesen worden. Gemäß des für die Arbeit eigens konzipierten präoperativen Erfassungsbogens (Anlage 5), welcher sich in seinem Aufbau an der üblichen Anamneseerhebung für das Krankheitsbild der Adenoiden Hypertrophie in der HNO-Klinik der Universitätsklinik Magdeburg orientiert hatte, wurden klinische Symptome aus der Eigenanamnese der Kinder erhoben. Anhand der im Vordergrund stehenden, beschriebenen klinischen Symptome wurden die Patienten in drei klinische Gruppen eingeteilt. Im Einzelnen zeichneten sich die Patienten entweder durch das Vorliegen einer Nasenatmungsbehinderung aus, zeigten in ihrer Eigenanamnese aber keine Hinweise für rezidivierende Infekte (Gruppe 1). Kinder aus Gruppe 2 hatten zudem eine Vorgeschichte von rezidivierenden Atemwegsinfekten, bei Patienten aus Gruppe 3 lag neben Infekten insbesondere des Mittelohrs ein Paukenerguss vor, welcher zu einer möglichen Hörminderung und teilweise auch Sprachentwicklungsverzögerung geführt hatte. Die Gruppen wiesen einen annähernd gleich großen Anteil des Gesamtkollektivs auf, in allen drei Gruppen war der Anteil der Jungen etwas größer als der der Mädchen.

##### **3.1.1.1 Betrachtung der klinischen Symptome**

Mittels des präoperativen Erfassungsbogens wurde zusätzlich erhoben, ob bei den Patienten in der Vergangenheit bereits zu einem anderen Zeitpunkt eine Adenotomie stattgefunden hatte, der aktuelle Eingriff dementsprechend eine Re-Operation darstellte. Darüber hinaus wurde erfragt, ob im Sinne einer positiven Familienanamnese Geschwisterkinder ähnliche Beschwerden aufwiesen.

Tabelle 6 veranschaulicht die Ergebnisse aus dem präoperativen Erfassungsbogen, insbesondere wird näher dargestellt, welche Symptome im Einzelnen erhoben wurden

und wie ausgeprägt sich diese im Gesamtkollektiv bzw. den drei klinischen Gruppen zeigten.

|  | Gruppe 1 |       | Gruppe 2 |        | Gruppe 3 |       | Gesamt  |       |
|--|----------|-------|----------|--------|----------|-------|---------|-------|
|  | n = 30   |       | n = 33   |        | n = 39   |       | n = 102 |       |
| <b>Altersdurchschnitt in Jahren   Spannweite</b> | 4,1      | 1-11  | 2,8      | 1-9    | 2,7      | 1-7   | 3,5     | 1-11  |
| <b>Geschlecht   %</b>                            |          |       |          |        |          |       |         |       |
| männlich   | 19       | 63,3% | 14       | 42,4%  | 24       | 61,5% | 57      | 55,9% |
| weiblich   | 11       | 36,7% | 19       | 57,6%  | 15       | 38,5% | 45      | 44,1% |
| <b>Re-OP   %</b>                                 |          |       |          |        |          |       |         |       |
| ja   | 2        | 6,7%  | 1        | 3,0%   | 2        | 5,1%  | 5       | 4,9%  |
| nein   | 28       | 93,3% | 32       | 97,0%  | 37       | 94,9% | 97      | 95,1% |
| <b>Positive Familienanamnese   %</b>             |          |       |          |        |          |       |         |       |
| ja   | 4        | 13,3% | 7        | 21,2%  | 10       | 25,6% | 21      | 20,6% |
| nein   | 26       | 86,7% | 26       | 78,8%  | 29       | 74,4% | 81      | 79,4% |
| <b>Klinische Symptome   %</b>                    |          |       |          |        |          |       |         |       |
| Nasenatmungsbehinderung                          |          |       |          |        |          |       |         |       |
| Nasale Obstruktion                               | 29       | 96,7% | 25       | 75,8%  | 35       | 89,7% | 89      | 87,3% |
| Rhonchopathie                                    | 25       | 83,3% | 28       | 84,8%  | 27       | 69,2% | 80      | 78,4% |
| Nasale Aussprache                                | 14       | 46,7% | 2        | 6,1%   | 5        | 12,8% | 21      | 20,6% |
| Appetitlosigkeit                                 | 2        | 6,7%  | 1        | 3,0%   | 1        | 2,6%  | 4       | 3,9%  |
| Tagesmüdigkeit                                   | 1        | 3,3%  | 1        | 3,0%   | 0        | 0,0%  | 2       | 2,0%  |
| Konzentrationschwierigkeiten                     | 3        | 10,0% | 1        | 3,0%   | 1        | 2,6%  | 5       | 4,9%  |
| <b>Atemwegsinfekte</b>                           |          |       |          |        |          |       |         |       |
| Rezidivierende Rhinitis/Sinusitis                | 0        | 0,0%  | 33       | 100,0% | 23       | 59,0% | 56      | 54,9% |
| Rezidivierende Bronchitis                        | 0        | 0,0%  | 21       | 63,6%  | 4        | 10,3% | 25      | 24,5% |
| <b>Otitis media/Paukenerguss</b>                 |          |       |          |        |          |       |         |       |
| Rezidivierende Otitis media                      | 0        | 0,0%  | 10       | 30,3%  | 20       | 51,3% | 30      | 29,4% |
| Hörminderung (subjektiv)                         | 6        | 20,0% | 0        | 0,0%   | 36       | 92,3% | 42      | 41,2% |
| Sprachentwicklungsverzögerung (subjektiv)        | 1        | 3,3%  | 3        | 9,1%   | 29       | 74,4% | 33      | 32,4% |

**Tabelle 6: Übersicht über das Patientenkollektiv.** Einteilung der Patienten in drei Gruppen anhand der im präoperativen Erfassungsbogen erfassten führenden klinischen Symptomatik. Gezeigt wird die Verteilung der Patienten auf diese drei Gruppen sowie das Gesamtkollektiv. Es werden die erfassten Angaben zu Alter, Geschlecht, Re-Operation und positiver Familienanamnese sowie die in der Eigenanamnese aufgeführten klinischen Symptome dargestellt. Dabei erfolgt jeweils die Abbildung der absoluten Anzahl sowie des prozentualen Anteils bezogen auf die jeweilige Gruppe bzw. das Gesamtkollektiv.

Nur für einen sehr kleinen Anteil des Patientenkollektivs (5 Kinder entsprechend 4,9%) stellte die Adenotomie einen Re-Eingriff dar. Diese 5 Kinder verteilten sich gleichmäßig auf die drei Gruppen, sodass anhand dieser Daten kein Zusammenhang zwischen klinischer Symptomatik und erhöhter Prävalenz für eine erneute Operation hergestellt werden konnte. Auch wiesen nur 20,6% der Kinder Geschwister auf, die an ähnlichen Symptomen litten, sodass eine familiäre Disposition wenn nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Bezüglich der von den Eltern angegebenen klinischen Symptomatik zeigten nahezu alle Kinder (87,3%) eine nasale Obstruktion als Zeichen einer Nasenatmungsbehinderung. In Gruppe 1 betrug der Anteil 96,7%, in Gruppe 3 89,7% und auch in Gruppe 2 75,8%. Ein ebenfalls hoher Anteil von 78,4% der Kinder wiesen zudem eine Rhonchopathie auf, hier war der Anteil in Gruppe 1 und Gruppe 2 etwa gleich (83,3% gegenüber 84,8%) und überstieg deutlich den in Gruppe 3 mit 69,2%. Während in Gruppe 1 noch knapp die Hälfte (46,7%) der Kinder durch eine nasale Aussprache auffiel, war dieser Anteil in Gruppe 2 und Gruppe 3 deutlich geringer (6,1% in Gruppe 2 und 12,8% in Gruppe 3), insgesamt war nur für 20,6% des Gesamtkollektivs dieses Symptom angegeben worden. Die eher unspezifischen Symptome der Appetitlosigkeit, Tagesmüdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten fanden sich insgesamt bei jeweils weniger als 5% des Gesamtkollektivs, zahlenmäßig am häufigsten davon in Gruppe 1.

Die Symptome, die auf rezidivierende oder chronische Atemwegsinfekte hinwiesen, zeigten sich definitionsgemäß sehr dominant in Gruppe 2. Bei Betrachtung des gesamten Kollektivs stellten sich bei etwas mehr als der Hälfte (54,9%) aller Kinder rezidivierende Rhinitiden dar, bei knapp einem Viertel (24,5%) auch rezidivierende Bronchitiden. In Gruppe 2 wiesen alle Patienten wiederholte Rhinitiden auf, knapp zwei Drittel (63,6%) zudem auch rezidivierende Bronchitiden. In Gruppe 1 fanden sich keine Patienten mit rezidivierenden Rhinitiden, in Gruppe 3 hingegen wurden diese bei 59,0% der Kinder angegeben. Es fanden sich keine (Gruppe 1) bzw. lediglich 10,3% (Gruppe 3) rezidivierende Bronchitiden.

Für knapp ein Drittel (29,4%) des Gesamtkollektivs wurden von den Eltern rezidivierende Otitiden beschrieben, Hörminderungen sogar für 41,2%. Während in

Gruppe 3 jedes zweite Kind (51,3%) im Vorfeld rezidivierenden Otitiden aufgewiesen hatte, wurden sie auch für knapp ein Drittel (30,3%) der Kinder von Gruppe 2 beschrieben und für kein Kind in Gruppe 1. Für Gruppe 3 zeigten sich definitionsgemäß bei nahezu allen Kindern (92,3%) von den Eltern beschriebene Hörstörungen, wohingegen diese in Gruppe 1 für lediglich 20,0% der Patienten angegeben worden waren und für kein Kind in Gruppe 2. Sprachentwicklungsverzögerungen waren für 74,4% der Patienten aus Gruppe 3, nur 3,3% der Patienten aus Gruppe 1 und 9,1% aus Gruppe 2 dokumentiert.

### **3.1.1.2 Befunde der klinischen Untersuchung, Hörtestungen und durchgeführte Operation**

Befunde der klinischen und apparativen präoperativen Untersuchungen wurden mittels des ebenfalls eigens konzipierten Erfassungsbogens zum stationären Verlauf (Anlage 6) erhoben. Hier wurden sowohl klinische Hinweise auf bestehende Infekte wie Veränderungen der Nasenschleimhaut und Sekretbildung notiert, als auch Auffälligkeiten in der ohrmikroskopischen Untersuchung wie Rötung oder Erguss.

Bei allen Kindern wurde neben der klinischen Untersuchung zudem eine objektive Hörtestung durchgeführt.

Im zweiten Teil dieses Erfassungsbogens wurde erhoben, ob neben der operativen Entfernung der Adenoide intraoperativ auch eine ein- oder beidseitige Parazentese, oder der ein- oder beidseitige Einsatz eines Paukenröhrchens erfolgt war.

Tabelle 7 fasst die Ergebnisse der Hörtestung sowie der durchgeführten Operation in den drei klinischen Gruppen zusammen.

|                                       | Gruppe 1 |       | Gruppe 2 |       | Gruppe 3 |       | Gesamt |       |
|---------------------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|--------|-------|
|                                       | n=30     |       | n=33     |       | n=39     |       | n=102  |       |
| <b>Art der Hörprüfung   %</b>         |          |       |          |       |          |       |        |       |
| Tympanogramm                          | 27       | 90,0% | 30       | 90,9% | 37       | 94,9% | 94     | 92,2% |
| TEOAE                                 | 15       | 50,0% | 26       | 78,8% | 27       | 69,2% | 68     | 66,7% |
| Reintonaudiogramm                     | 11       | 36,7% | 4        | 12,1% | 6        | 15,4% | 21     | 20,6% |
| BERA                                  | 0        | 0,0%  | 0        | 0,0%  | 5        | 12,8% | 5      | 4,9%  |
| <b>Tympanogramm   %</b>               |          |       |          |       |          |       |        |       |
| bds. regelrecht                       | 8        | 29,6% | 4        | 13,3% | 2        | 5,4%  | 14     | 14,9% |
| bds. keine Compliance                 | 6        | 22,2% | 12       | 40,0% | 17       | 45,9% | 35     | 37,2% |
| bds. abgeflacht                       | 4        | 14,8% | 8        | 26,7% | 13       | 35,1% | 25     | 26,6% |
| bds. in negativen Bereich verschoben  | 4        | 14,8% | 0        | 0,0%  | 1        | 2,7%  | 5      | 5,3%  |
| eins. regelrecht, eins. abgeflacht    | 0        | 0,0%  | 0        | 0,0%  | 1        | 2,7%  | 1      | 1,1%  |
| eins. regelrecht, eins. verschoben    | 0        | 0,0%  | 0        | 0,0%  | 1        | 2,7%  | 1      | 1,1%  |
| eins. abgeflacht, eins. verschoben    | 4        | 14,8% | 3        | 10,0% | 1        | 2,7%  | 8      | 8,5%  |
| <b>TEOAE   %</b>                      |          |       |          |       |          |       |        |       |
| bds. pass (*)                         | 7        | 46,7% | 10       | 38,5% | 9        | 33,3% | 26     | 38,2% |
| bds. refer (*)                        | 4        | 26,7% | 10       | 38,5% | 14       | 51,9% | 28     | 41,2% |
| eins. pass und eins. refer            | 4        | 26,7% | 6        | 23,1% | 4        | 14,8% | 14     | 20,6% |
| <b>Reintonaudiogramm   %</b>          |          |       |          |       |          |       |        |       |
| Normakusis                            | 10       | 90,9% | 1        | 25,0% | 3        | 50,0% | 14     | 66,7% |
| Schallleitungsschwerhörigkeit         | 1        | 9,1%  | 3        | 75,0% | 3        | 50,0% | 7      | 33,3% |
| <b>BERA   %</b>                       |          |       |          |       |          |       |        |       |
| Normakusis                            | -        | -     | -        | -     | 1        | 20,0% | 1      | 20,0% |
| geringgradige Schwerhörigkeit         | -        | -     | -        | -     | 2        | 40,0% | 2      | 40,0% |
| mittelgradige Schwerhörigkeit         | -        | -     | -        | -     | 2        | 40,0% | 2      | 40,0% |
| <b>Art der OP   %</b>                 |          |       |          |       |          |       |        |       |
| nur Adenotomie                        | 21       | 70,0% | 22       | 66,7% | 9        | 23,1% | 52     | 51,0% |
| Parazentese eins.                     | 0        | 0,0%  | 1        | 3,0%  | 0        | 0,0%  | 1      | 1,0%  |
| Parazentese bds.                      | 3        | 10,0% | 1        | 3,0%  | 3        | 7,7%  | 7      | 6,9%  |
| Parazentese + Paukendrainage je eins. | 1        | 3,3%  | 4        | 12,1% | 6        | 15,4% | 11     | 10,8% |
| Paukendrainageneinsatz eins.          | 1        | 3,3%  | 0        | 0,0%  | 0        | 0,0%  | 1      | 1,0%  |
| Paukendrainageneinsatz bds.           | 4        | 13,3% | 5        | 15,2% | 21       | 53,8% | 30     | 29,4% |

\*Anmerkung: pass – bestanden (positives TEOAE), refer – nicht bestanden (negatives TEOAE).

**Tabelle 7: Übersicht über die Ergebnisse der Hörprüfungen sowie der stattgehabten Operation in den drei klinischen Gruppen.** Gezeigt wird zunächst als Übersicht, welche verschiedenen Hörtestungen erfolgten. Im Anschluss wird ausführlich dargestellt, welche Ergebnisse die einzelnen Hörprüfungen erbrachten. Es werden zuletzt die erfassten Angaben zur Art der durchgeführten

Operation dargestellt. Dabei werden jeweils der Vergleich der drei klinischen Gruppen und das Gesamtkollektiv aufgeführt und dabei die absolute Anzahl sowie der prozentuale Anteil abgebildet.

Obwohl die Durchführung mindestens einer objektiven Höruntersuchung, zumeist eines Tympanogramms und TEOAEs oder statt letzteren eines Reintonaudiogramms, regulär für jeden Patienten im Vorfeld einer Adenotomie erfolgen sollte, wird aus der Tabelle ersichtlich, dass nicht bei jedem Kind des untersuchten Kollektivs auch tatsächlich eine durchgeführt wurde. Dieses lag an der mangelnden Kooperation der teilweise noch sehr jungen Kinder.

Ein Tympanogramm erhielten immerhin 90,0% der Kinder aus Gruppe 1, 90,9% aus Gruppe 2 und 94,9% aus Gruppe 3, insgesamt 94 Kinder des Gesamtkollektivs entsprechend 92,2%. Nur 14 (14,9%) aller Patienten wiesen einen beidseits regelrechten Kurvenverlauf, also ein unauffälliges Tympanogramm auf, acht dieser 14 konnten der Gruppe 1 zugeordnet werden.

Dahingegen hatte die Tympanometrie bei insgesamt über einem Drittel (37,2%) des Gesamtkollektivs keine Compliance gezeigt, war dementsprechend hinweisend auf eine Steifigkeit des Trommelfells und somit zumeist auf einen Paukenerguss. Hinsichtlich der Gruppen traf dieses für fast die Hälfte (45,9%) der Kinder in Gruppe 3, 40,0% der Patienten in Gruppe 2 und auch noch 22,2% der Kinder in Gruppe 1 zu.

Bei etwas über einem Viertel der Patienten (26,6%), welche ein Tympanogramm erhalten hatten, fand sich ein beidseits abgeflachter Kurvenverlauf, ebenfalls hinweisend für einen Paukenerguss. Innerhalb von Gruppe 3 waren dies mit 35,1% die meisten Kinder im Gruppenvergleich, aber auch in Gruppe 2 wiesen 26,7% und in Gruppe 1 immerhin noch 14,8% diese Auffälligkeiten auf.

Einen beidseits in den negativen Bereich verschobenen Kurvenverlauf, durch welchen auf eine Tubenbelüftungsstörung geschlossen werden konnte, zeigten insgesamt nur fünf (5,3%) aller Kinder, vier davon aus Gruppe 1. Jeweils nur ein Kind des Gesamtkollektivs, jeweils aus Gruppe 3, wies einen einseitig regelrechten und einseitig abgeflachten bzw. einen einseitig regelrechten und einseitig in den negativen Bereich verschobenen Kurvenverlauf auf. Für acht Kinder entsprechend 8,5% war ein auf der einen Seite negativer und auf der anderen Seite abgeflachter Kurvenverlauf dokumentiert. Während vier davon der Gruppe 1 und drei der Gruppe 2 zugehörig waren, zeigte nur ein Kind aus Gruppe 3 diese Pathologie.

Neben dem Tympanogramm wurden bei den jüngeren Kindern TEOAEs abgeleitet, bei den älteren, von denen bereits eine aktive Mitarbeit erwartet werden konnte, ein Reintonaudiogramm durchgeführt.

In Gruppe 1 erhielt die Hälfte der Kinder TEOAE, hiervon hatte knapp die Hälfte (46,7%) ein positives, also unauffälliges Ergebnis (bds. pass), ein Viertel (26,7%) wies beidseits und ein weiteres Viertel (26,7%) einseitig einen auffälligen Verlauf (refer) auf. Weitere elf Kinder (36,7%) erhielten ein Reintonaudiogramm, welches bei zehn (90,9%) eine Normakusis und sich nur bei einem Kind (9,1%) hinweisend für eine Schallleitungsschwerhörigkeit zeigte.

Dahingegen wurden in Gruppe 2 bei 78,8% TEOAE abgeleitet, davon waren 38,5% beidseits unauffällig sowie 38,5% beidseits und 23,1% einseitig auffällig. Von den vier in Gruppe 2 durchgeführten Reintonaudiogrammen waren 75% auffällig und 25% unauffällig.

In Gruppe 3 wurden bei 69,2% der Kinder TEOAE durchgeführt. Ein Drittel (33,3%) der Kinder aus dieser Gruppe, bei denen TEOAE abgeleitet wurden, wies einen bds. unauffälligen Befund auf, über die Hälfte (51,9%) einen beidseits und weitere 14,8% einen einseitig auffälligen Befund. Sechs Kinder in Gruppe 3 erhielten statt der TEOAE ein Reintonaudiogramm, welches genau bei der Hälfte (50,0%) eine Normakusis, bei der anderen Hälfte (50,0%) Hinweise für eine Schallleitungsschwerhörigkeit enthielt.

Nur ein sehr geringer Anteil von insgesamt fünf Kindern (4,9%) erhielt eine intraoperative BERA, davon konnten alle fünf der Gruppe 3 zugeordnet werden. Bei allen diesen Kindern bestand klinisch oder durch wiederholte auffällige TEOAE der Verdacht auf eine Schwerhörigkeit. Bei einem dieser fünf Kinder konnte der Verdacht durch die BERA ausgeschlossen werden, bei den übrigen vier bestätigte er sich. Zwei Kinder wiesen eine gering-, zwei eine mittelgradige Schwerhörigkeit auf.

Aus der Tabelle geht neben detaillierten Angaben zu den erfolgten Hörprüfungen zudem hervor, welche Art der Operation die Kinder erhielten, also bei welchen Patienten lediglich die operative Entfernung der Adenoide erfolgte und bei welchen zudem eine ein- oder beidseitige Parazentese oder der ein- oder beidseitige Einsatz einer Paukendrainage durchgeführt wurde.

Insgesamt etwas über die Hälfte (51,0%) des Gesamtkollektivs erhielt nur eine Adenotomie, in Gruppe 1 traf dieses auf 21 der Kinder, also 70,0% dieser Gruppe, zu,

in Gruppe 2 sogar auf 22 und somit 66,7% der Gruppe, in Gruppe 3 dafür nur auf neun (23,1%). In Gruppe 3 erhielten dahingegen die meisten Kinder eine beidseitige Paukendrainage (21 und damit mit 53,8% deutlich über die Hälfte), während dieses in Gruppe 1 und 2 nur bei jeweils etwas über 10% der Kinder (13,3% in Gruppe 1 und 15,2% in Gruppe 2) durchgeführt wurde. Eine einseitige Parazentese erhielten insgesamt nur 6,9% aller Kinder, ohne nennenswerte Unterschiede zwischen den Gruppen. Von den etwas mehr als 10% des Gesamtkollektivs, welche einseitig eine Parazentese und einseitig eine Paukendrainage erhielten, gehörten alle bis auf ein Kind entweder der Gruppe 2 oder der Gruppe 3 an.

### 3.1.2 Betrachtung des Alters der Patienten

Für das untersuchte Kollektiv wurden ferner Vergleiche entsprechend des Alters der Patienten vorgenommen. Die für die Studie betrachteten Kindern waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen einem und elf Jahren alt, das durchschnittliche Alter betrug dreieinhalb Jahre. Das Einschlussalter war zwischen einem und zwölf Jahren festgelegt worden, jedoch fanden sich im untersuchten Kollektiv keine Kinder, die zehn oder zwölf Jahre alt waren. 75% der Kinder in dem untersuchten Kollektiv waren zum Zeitpunkt der Operation drei Jahre oder jünger, wie aus Tabelle 8 hervorgeht.

| Alter    | Geschlecht |    | Gesamt | Gesamt je Altersklasse |
|----------|------------|----|--------|------------------------|
|          | m          | w  |        |                        |
| 1 Jahr   | 17         | 8  | 25     | 25                     |
| 2 Jahre  | 17         | 16 | 33     | 33                     |
| 3 Jahre  | 9          | 8  | 17     | 45                     |
| 4 Jahre  | 5          | 5  | 10     |                        |
| 5 Jahre  | 3          | 4  | 7      |                        |
| 6 Jahre  | 1          | 1  | 2      |                        |
| 7 Jahre  | 1          | 1  | 2      |                        |
| 8 Jahre  | 3          | 0  | 3      |                        |
| 9 Jahre  | 0          | 1  | 1      |                        |
| 10 Jahre | 0          | 0  | 0      |                        |
| 11 Jahre | 1          | 1  | 2      |                        |
| Gesamt   | 57         | 45 | 102    |                        |

**Tabelle 8: Verteilung des Patientenkollektivs entsprechend des Alters bei Operation.** Die in die Studie aufgenommenen Kinder verteilten sich entsprechend ihres Alters wie dargestellt. Ferner gezeigt ist der jeweilige Anteil am Gesamtkollektiv. Die Kinder wurden zudem nach Geschlecht aufgeschlüsselt. Abgebildet ist jeweils die absolute Anzahl. Durch die Gestaltung der Tabelle wird die Aufteilung des Gesamtkollektivs in drei Altersklassen deutlich.

Es zeigten sich im Folgenden schon in der Altersklasse von Kindern im Alter von drei Jahren und älter deutliche Unterschiede zu ein- bzw. zweijährigen Kindern. Entsprechend wurden zur statistischen Betrachtung Kinder von drei Jahren und älter in eine Altersklasse zusammengeschlossen und alle folgenden Vergleiche zwischen diesen drei Altersklassen vorgenommen.

Somit teilte sich das Patientenkollektiv aufgeschlüsselt nach klinischer Symptomatik und in Unterteilung auf drei große Altersklassen wie folgt auf:

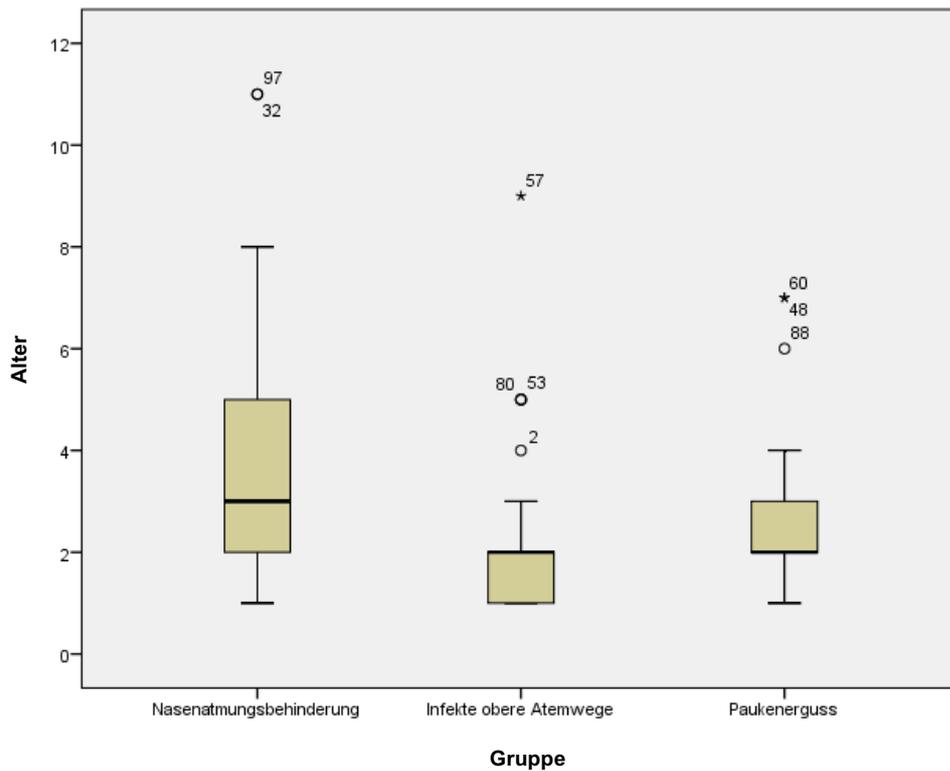
| Alter        | Gruppe 1                                     |       | Gruppe 2 |       | Gruppe 3 |       | Gesamt |       |
|--------------|--|-------|----------|-------|----------|-------|--------|-------|
|              | Altersdurchschnitt in Jahren<br>  Spannweite | 4,1   | 1-11     | 2,8   | 1-9      | 2,7   | 1-7    | 3,5   |
| 1 Jahr  %    | 5  | 16,7% | 12       | 36,4% | 9        | 23,1% | 26     | 25,5% |
| 2 Jahre  %   | 3  | 10,0% | 14       | 42,4% | 14       | 35,9% | 31     | 30,4% |
| ≥ 3 Jahre  % | 22   | 73,3% | 7        | 21,2% | 16       | 41,0% | 45     | 44,1% |
| Gesamt       | 30   | 29,4% | 33       | 32,4% | 39       | 38,2% | 102    | 100%  |

**Tabelle 9: Übersicht über die Alterszusammensetzung der jeweiligen klinischen Gruppen.** Darstellung der Patienten des betrachteten Kollektivs in Aufteilung auf die drei klinischen Gruppen und deren jeweilige Alterszusammensetzung bei Zusammenfassung in drei Altersklassen. Gezeigt wird zunächst der Altersdurchschnitt der jeweiligen Gruppen sowie die Altersspannweite. Darunter Abbildung der drei Altersklassen und innerhalb dieser die jeweilige absolute Anzahl der Patienten sowie deren entsprechender prozentualer Anteil.

Bei näherer Betrachtung der Altersverteilung der drei klinischen Gruppen zeigte sich für Gruppe 1 ein mit 4,1 Jahren höheres Durchschnittsalter als in Gruppe 2 (2,8 Jahre) und Gruppe 3 (2,7 Jahre). Auch das Höchstalter in Gruppe 1 war im Vergleich größer, so konnten die beiden elfjährigen und somit ältesten Kinder des Patientenkollektivs anhand ihrer klinischen Symptomatik der Gruppe 1 zugeordnet werden, imponierten demnach lediglich durch eine Nasenatmungsbehinderung ohne Begleitsymptomatik. Das älteste Kind in Gruppe 2 war neun, in Gruppe 3 sogar nur sieben Jahre alt. Während in Gruppe 1 nur 16,7% der Kinder ein Jahr und 10,0% 2 Jahre alt waren, waren 73,3% drei Jahre oder älter. Auch in Gruppe 3 war mit 41,0% der größte Anteil mindestens drei Jahre, jedoch waren hier 23,1% ein Jahr und 35,9% zwei Jahre alt. In

Gruppe 2 waren mit 36,4% und 42,4% ähnlich viele Kinder ein bzw. 2 Jahre alt, dafür nur 21,2% drei Jahre oder älter.

Eine grafische Darstellung der Altersverteilung in den drei klinischen Gruppen mit Mittelwert und SEM erfolgt durch Abbildung 7.



**Abbildung 7: Übersicht über die Alterszusammensetzung der jeweiligen klinischen Gruppen.** Analyse der Daten mittels paarweisen Vergleiches durch non-parametrischem Kruskal-Wallis-Test. Gezeigt wird die Verteilung mit Mittelwert und  $\pm$  standard error of mean (SEM) sowie einzelne ältere Kinder als Ausreißer (° bzw. \*).

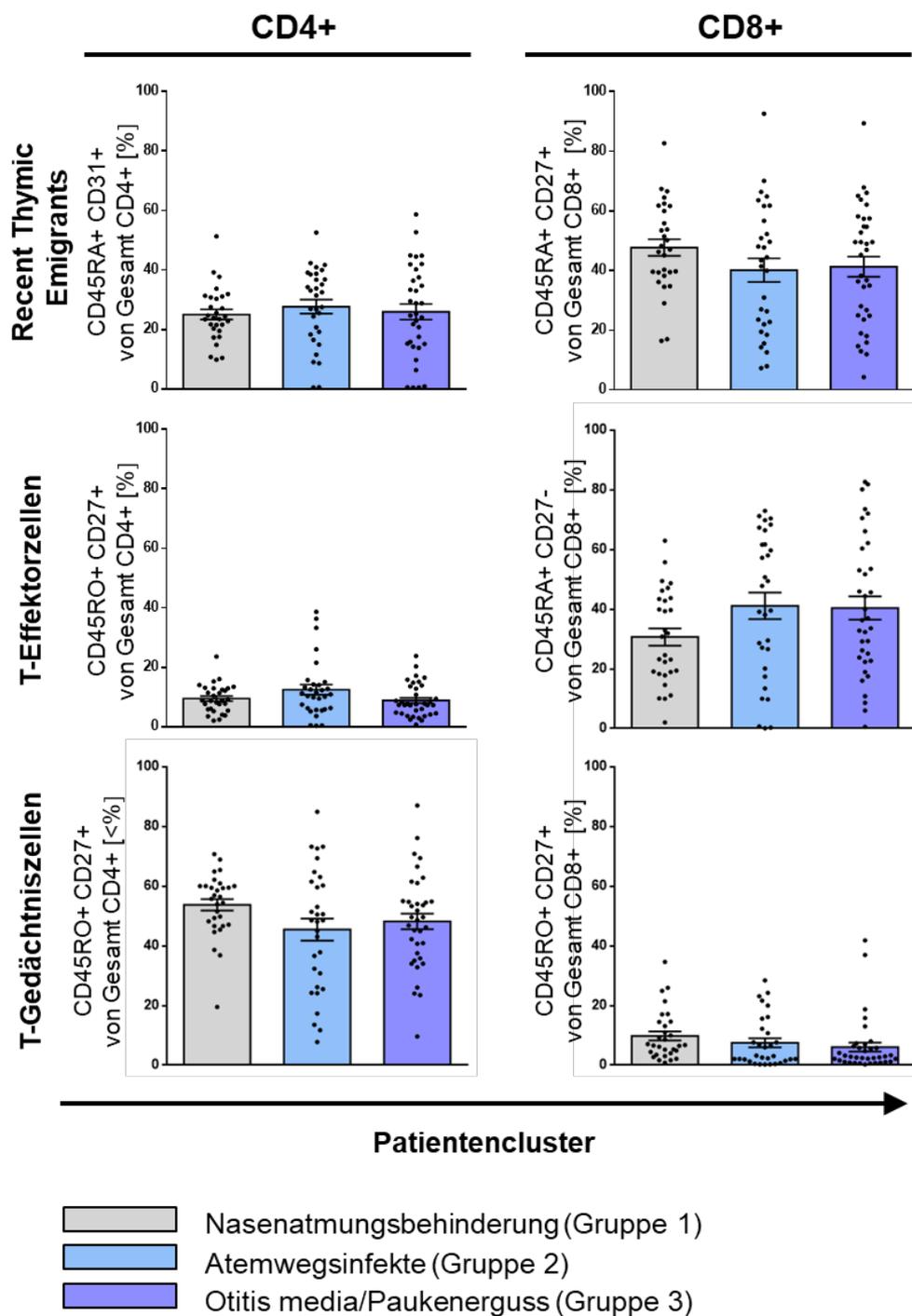
Anhand dieser Abbildung werden neben den Unterschieden im durchschnittlichen Alter der drei Gruppen und der Spannweite des Alters auch die Maximalwerte gezeigt, welche sich in dieser Grafik als Ausreißer präsentieren.

Nach ausführlicher Darstellung des untersuchten Patientenkollektivs werden im Folgenden die Einflüsse von Infektionsgeschehen und Alter auf die T-Zell-Funktionalität näher untersucht, es werden also Vergleiche zwischen den drei klinischen Gruppen sowie den drei Altersklassen vorgenommen.

## **3.2 Vergleich der T-Zell-Differenzierung innerhalb der klinischen Gruppen**

### **3.2.1 Deutlicher Anteil an T-Effektor- und T-Gedächtniszellen in Adenoiden**

Wie bereits ausführlich im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurden die aus den Adenoiden gewonnenen mononukleären Zellen mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A stimuliert, mit monoklonalen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Populationen wurden anhand der Oberflächenexpression verschiedener CD-Moleküle bestimmt. Dabei unterschieden wir innerhalb der CD4<sup>+</sup> Population die Subpopulationen der RTEs (CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>), der Effektor- (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>) und der Gedächtniszellen (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>). Innerhalb der CD8<sup>+</sup> Population wurde die gleiche Unterscheidung vorgenommen, die RTEs zeichneten sich durch die Oberflächenexpression von CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> aus, Effektor-T-Zellen durch CD8<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>, und Gedächtnis-T-Zellen durch CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>.



**Abbildung 8: Phänotyp der CD4+ und CD8+ T-Zellen innerhalb der klinischen Gruppen.** Die aus den Adenoiden gewonnenen mononukleären Zellen wurden zur Phänotypisierung unstimuliert gelassen, die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie gezeigt. Vergleiche wurden zwischen Kindern den klinischen Gruppen vorgenommen.

Die Häufigkeit der RTE, T-Effektor- und T-Gedächtniszellen wurde sowohl für die CD4+ (links) als auch die CD8+ Population (rechts) gezeigt. Hellgraue Balken repräsentieren Kinder mit Nasenventilationsstörung (Gruppe 1), während hellblaue Balken für die Kinder mit zusätzlich begleitenden Infekten der oberen Atemwege (Gruppe 2) stehen und blauviolette Balken die Kinder zeigen, welche sich durch zusätzliche Paukenergüsse und Otitis media (Gruppe 3) auszeichneten. Jeder Kreis repräsentiert einen einzelnen Patienten der n=102 in der Studie analysierten Kinder mit 30-

39 Kindern pro klinische Gruppe. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$  (*one-way Anova*, Tukey HSD Mehrfachvergleiche).

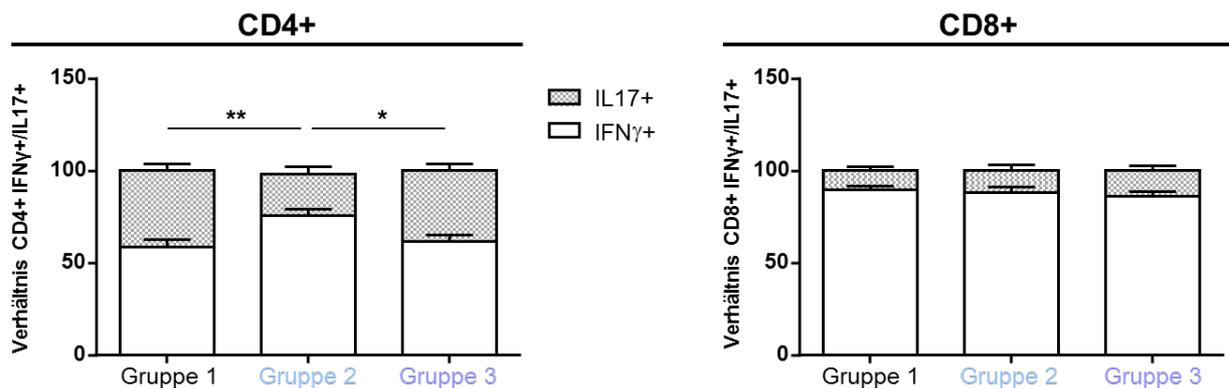
Bei den untersuchten Proben zeigte sich der Anteil der RTEs (CD4+CD45RA+CD31+ und CD8+CD45RA+CD27+) nahezu gleich in den drei klinischen Gruppen (für CD4+ T-Zellen 25,01% in Gruppe 1, 27,69% in Gruppe 2 und 25,91% in Gruppe 3,  $p = 0,717$ , und für CD8+ T-Zellen 47,73% in Gruppe 1, 40,16% in Gruppe 2 und 41,33% in Gruppe 3,  $p = 0,062$ ), sodass dieses als unabhängig von vorangegangenen Infektionen angesehen wurde (Abbildung 8, oben). Bei der Betrachtung der T-Zellen mit vorangegangenem Antigenkontakt, also T-Effektor- (CD4+CD45RO+CD27- bzw. CD8+CD45RA+CD27-) und T-Gedächtniszellen (CD4+CD45RO+CD27- bzw. CD8+CD45RO+CD27+), zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der klinischen Gruppen, sodass auch hier ein Einfluss von vorher durchlaufenen Infektionen nicht angenommen werden konnte. Überraschenderweise zeigten sich sogar in Gruppe 1, derjenigen Gruppe, in welcher die Patienten in ihrer Krankheitsvorgeschichte keine Infektionen aufwiesen hatten, ähnliche Anteile an Gedächtniszellen (für CD4+ T-Zellen 53,70% und für CD8+ T-Zellen 9,81%) wie in den beiden anderen Gruppen (für CD4+ 45,43% in Gruppe 2 und 48,16% in Gruppe 3,  $p = 0,132$ , und für CD8+ 7,51% in Gruppe 2 und 6,08% in Gruppe 3,  $p = 0,684$ ) (Abbildung 8 unten).

Weiterhin fiel auf, dass die Kompartimente der naiven CD8+ T-Zellen sowie der CD8+ T-Effektorzellen fast doppelt bzw. sogar dreifach so groß waren wie die der CD4+ T-Effektorzellen, dafür zeigte sich der Anteil der CD4+ T-Gedächtniszellen vier bis fast fünf Mal so groß wie der der CD8+ T-Gedächtniszellen.

## 3.2.2 Analyse der Zytokinproduktion als Marker der T-Zell-Differenzierung

### 3.2.2.1 Betrachtung der $T_H1$ - und $T_H17$ -Zellen bzw. $T_C1$ und $T_C17$ -Zellen

Aufbauend auf dem Ergebnis, dass sich die Größe des Kompartiments der  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Effektor- und T-Gedächtniszellen unabhängig von infektiösen Ereignissen zeigt, wurde als zusätzlicher Marker zur Untersuchung der Vorgänge bei T-Zell-Differenzierung die Zytokinproduktion betrachtet (Abbildung 9, 10).

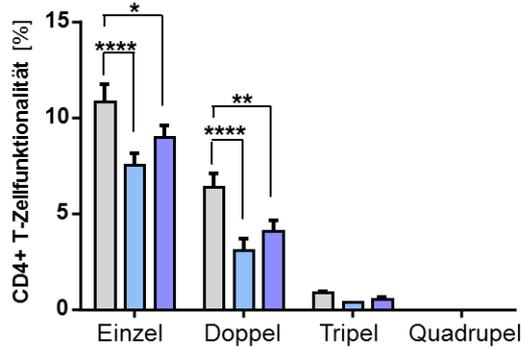
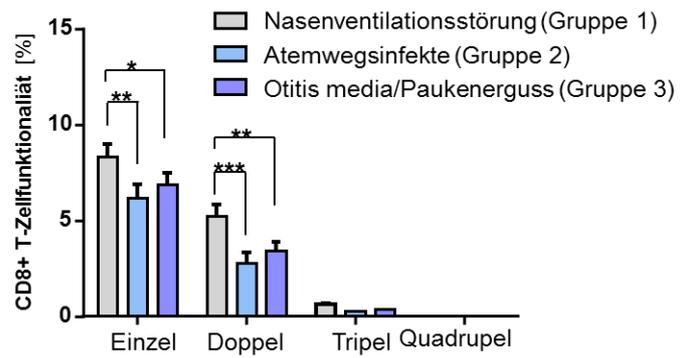
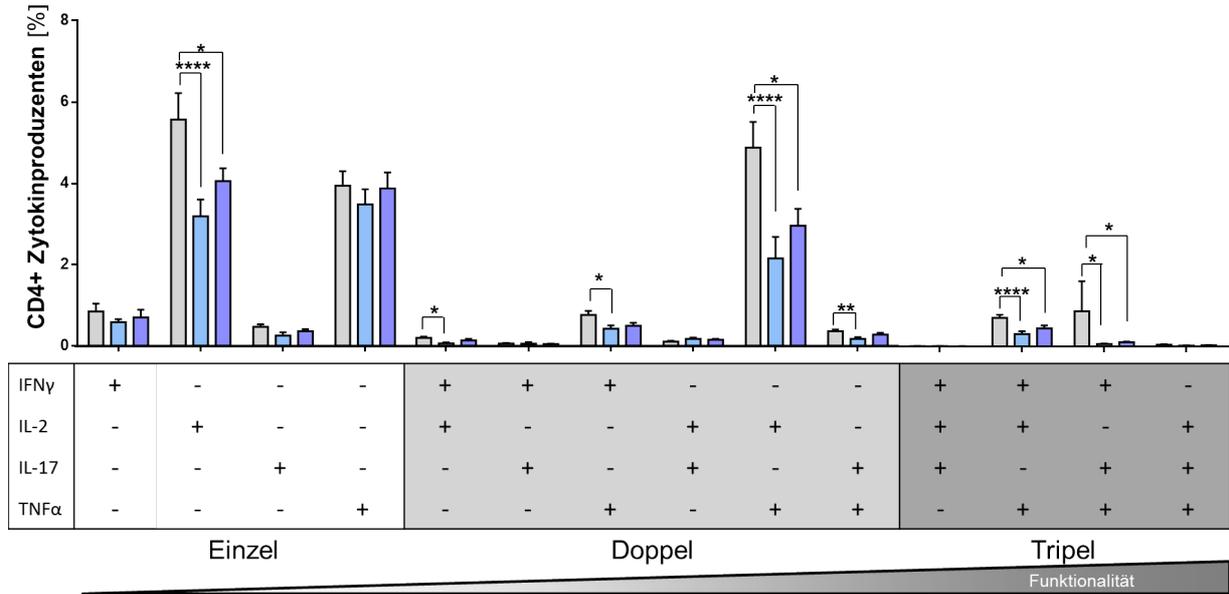
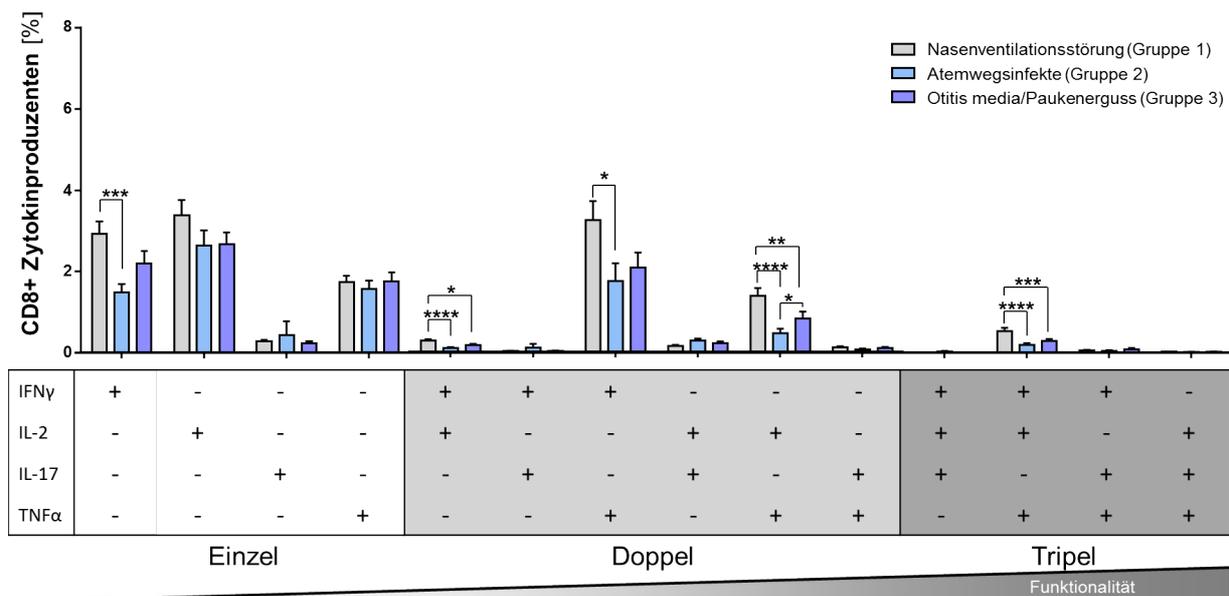


**Abbildung 9: Gegenüberstellung der  $IFN\gamma$  und  $IL17$  Produktion der  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Zellen innerhalb der Gruppen.** Die aus den Adenoiden gewonnenen Zellen wurden zur Analyse der Zytokinproduktion mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A für 6 Stunden stimuliert, die Zytokinproduktion mit Hilfe von Durchflusszytometrie gezeigt. Die prozentualen Anteile der Gesamt  $IFN\gamma+$  (weiß) und  $IL17+$  (graueliert) Produzenten wurden bestimmt, auf hundert Prozent hochgerechnet und miteinander verglichen, wobei die Vergleiche zwischen den Gruppen analog zu Abbildung 8 erfolgten. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Kolmogorov-Smirnoff Test sowie Kruskal-Wallis mit *post-hoc* Dunn Mehrfachvergleich).

Obwohl sich im  $CD4+$  T-Zell-Kompartiment wie erwartet zur effektiven Bekämpfung von Infektionen sowohl die Produktion von  $IFN\gamma$  als auch  $IL17$  zeigen ließ, so nahm die Frequenz der  $T_H17$ -Zellen in Gruppe 2, der Gruppe, in der die Kinder zusätzlich Atemwegsinfektionen in der Vorgeschichte aufweisen, um die Hälfte ab (24,30% in Gruppe 2 gegenüber 41,45% in Gruppe 1,  $p < 0,01$ , und gegenüber 38,28% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 9, links). Im  $CD8+$  T-Zell-Kompartiment dominierten in allen drei Gruppen dahingegen eindeutig die  $T_C1$  Zellen unabhängig davon, ob Infektionen aus der Eigenanamnese bekannt waren oder nicht (Abbildung 9, rechts).

### 3.2.2.2 Weniger Multifunktionale T-Zellen bei Kindern mit Sekundärinfektionen

Für eine genauere Charakterisierung der T-Zell-Funktionalität wurden dann Einzel-, Doppel- und Tripelproduzenten innerhalb des  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Zell-Kompartiments in den drei klinischen Gruppen betrachtet (Abbildung 10).

**(A)****(B)****(C)****(D)**

**Abbildung 10: Vergleich multifunktionaler CD4+ und CD8+ T-Zellen nach klinischer Symptomatik.** Gemäß der oben bereits angeführten Gruppeneinteilung erfolgte auch der Vergleich der multifunktionalen T-Zellen. Die aus den Adenoiden gewonnenen Zellen wurden stimuliert wie in Abbildung 9 beschrieben und mittels Durchflusszytometrie und Anwendung von Bool'schem Gating analysiert. Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile der einzelnen Zytokinproduzenten (Einzel-, Doppel-, Tripel- und Quadrupel) in den drei klinischen Gruppen in den CD4+ (**A**) und CD8+ (**B**) Populationen. (**C**, **D**) Prozentuale Anteile der individuellen, funktionellen Subpopulationen, (+) symbolisiert das exprimierte Zytokin innerhalb der CD4+ (**C**) und CD8+ Population (**D**). Hellgraue Balken repräsentieren die Kinder aus Gruppe 1, hellblaue Balken die aus Gruppe 2 und blauviolette Balken die aus Gruppe 3. Durch das Dreieck wird veranschaulicht, dass mit der Anzahl an simultan exprimierten Zytokinen auch die Funktionalität zunimmt. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (*two-way Anova*, Tukey HSD Mehrfachvergleiche).

Innerhalb der CD4+ Population wiesen Kinder in Gruppe 1, welche lediglich an Nasenventilationsstörungen gelitten hatten, signifikant mehr Einzel- und Doppelproduzenten im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen auf (für Einzelproduzenten 10,85% in Gruppe 1 gegenüber 7,53% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 9,01% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ , und für Doppelproduzenten 6,41% in Gruppe 1 gegenüber 3,08% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 4,10% in Gruppe 3,  $p < 0,01$ ). Ähnlich verhielt sich auch die Verteilung in der CD8+ Population (für Einzelproduzenten 8,33% in Gruppe 1 gegenüber 6,14% in Gruppe 2,  $p < 0,01$ , und gegenüber 6,87% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ , und für Doppelproduzenten 5,21% in Gruppe 1 gegenüber 2,77% in Gruppe 2,  $p < 0,001$ , und gegenüber 3,43% in Gruppe 3,  $p < 0,01$ ). Quadrupelproduzenten, also T-Zellen, die synchron  $TNF\alpha+$   $IL2+$   $IFN\gamma+$   $IL17$  produzieren, konnten kaum nachgewiesen werden.

Als nächstes folgte eine Betrachtung aller möglichen Kombinationen an Einzel-, Doppel- und Tripelproduzenten als individuelle und funktionelle Subpopulationen. Da  $TNF\alpha+$   $IL2+$   $IFN\gamma+$  Tripelproduzenten bekanntermaßen eine wichtige Rolle in der Pathogen-Bekämpfung spielen<sup>46</sup>, untersuchten wir diese zuerst (Abbildung 10C, D). Patienten mit ausschließlicher nasaler Obstruktion in der Vorgeschichte (Gruppe 1) wiesen etwa doppelt so viele der  $T_H1$ - und  $T_C1$ -ähnlichen Tripelproduzenten auf wie Kinder in den beiden Gruppen mit zusätzlichen sekundären Infektionen in der Eigenanamnese. Im Einzelnen zeigten sich für die  $T_H1$ -Tripelproduzenten in Gruppe 1 0,70% gegenüber 0,30% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 0,44% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ . Für die  $T_C1$ -Tripelproduzenten zeigten sich in Gruppe 1 0,53% gegenüber 0,19% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 0,29% in Gruppe 3,  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 10C und D). Da auch  $T_H17$ - und  $T_C17$ -Zellen häufig die Fähigkeit erwerben, das  $T_H1$ -Zytokin  $IFN\gamma$  zu koexprimieren,<sup>70</sup> wurden auch  $IL17$  produzierende

Tripelproduzenten analysiert. Übereinstimmend mit den zuvor aufgeführten Tripelproduzenten zeigte sich die Population der gleichzeitig  $\text{IFN}\gamma/\text{IL17}$ -produzierenden Zellen innerhalb der  $\text{CD4}^+$  Population zusätzlich positiv für  $\text{TNF}\alpha$  und dominierte in der Gruppe ohne infektiöse Vorgeschichte (0,87% in Gruppe 1 gegenüber 0,06% in Gruppe 2,  $p < 0,05$ , und gegenüber 0,10% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 10C).

Der höchste Anteil der  $\text{CD4}^+$  Doppelproduzenten entfiel auf Zellen, die sich gleichzeitig positiv für  $\text{IL2}$  sowie  $\text{TNF}\alpha$  zeigten (4,89% in Gruppe 1, gegenüber 2,16% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$  und 2,97% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ ). Signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 fanden sich zudem für  $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$  (0,77% in Gruppe 1 gegenüber 0,43% in Gruppe 2,  $p < 0,05$ ),  $\text{IFN}\gamma + \text{IL2}$  (0,21% in Gruppe 1 gegenüber 0,07% in Gruppe 2,  $p < 0,05$ ) und  $\text{IL17} + \text{TNF}\alpha$  koproduzierende Zellen (0,36% in Gruppe 1 gegenüber 0,18% in Gruppe 2,  $p < 0,01$ ) (Abbildung 10C). Innerhalb der  $\text{CD8}^+$  Doppelproduzenten zeigten sich ebenfalls für mehrere der Subpopulationen signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 sowie zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3. Die anteilmäßig deutlich dominierende Subpopulation der  $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$  koproduzierenden Zellen zeigte 3,25% in Gruppe 1 gegenüber 1,75% in Gruppe 2,  $p < 0,05$ , und gegenüber 2,08% in Gruppe 3,  $p = 0,063$ , gefolgt von  $\text{IL2} + \text{TNF}\alpha$  (1,39% in Gruppe 1 gegenüber 0,47% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 0,83% in Gruppe 3,  $p < 0,01$ ) und  $\text{IFN}\gamma + \text{IL2}$  (0,28% in Gruppe 1 gegenüber 0,10% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$  und gegenüber 0,17% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 10D).

Die Mehrzahl der  $\text{CD4}^+$  Einzelproduzenten produzierten zu fast gleichen Anteilen  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL2}$ . Während sich bei den  $\text{TNF}\alpha$  Einzelproduzenten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen fanden, sich die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion somit unabhängig von den dominierenden klinischen Symptomen zeigte, wurden  $\text{IL2}$  Einzelproduzenten in Gruppe 1 signifikant am stärksten gebildet (5,57% in Gruppe 1 gegenüber 3,19% in Gruppe 2,  $p < 0,0001$  und gegenüber 4,06% in Gruppe 3,  $p < 0,05$ ). (Abbildung 10C). Wie auch bei den  $\text{CD8}^+$  Einzelproduzenten entfiel nur ein sehr kleiner Anteil auf  $\text{IL17}^+$  Zellen. Dahingegen fanden sich bei den  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zu ungefähr gleichen Anteilen  $\text{IFN}\gamma^+$ ,  $\text{IL2}^+$  sowie etwas weniger  $\text{TNF}\alpha^+$  Einzelproduzenten. Es zeigten sich insgesamt wenig Unterschiede innerhalb der klinischen Gruppen, lediglich bei den  $\text{IFN}\gamma^+$  Zellen wiesen Kinder mit Atemwegsinfekten (Gruppe 2) einen signifikant geringeren Anteil auf als Kinder in

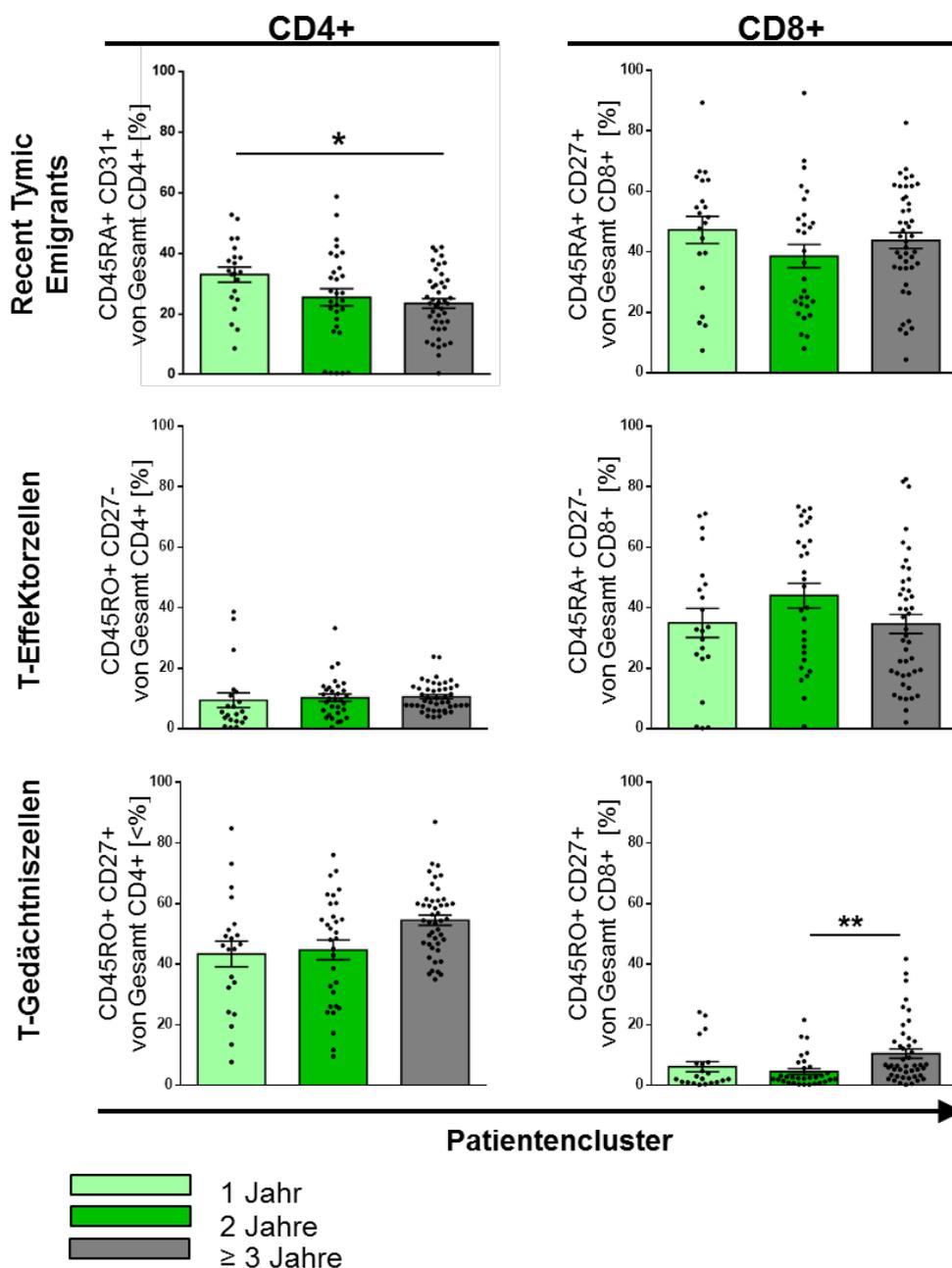
Gruppe 1 (2,92% in Gruppe 1 gegenüber 1,49% in Gruppe 2,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 10D).

Während in Zusammenschau somit bei allen Kindern Einzelproduzenten dominierten, zeigten im Vergleich Kinder ohne begleitende Infekte (Gruppe 1) größere Anteile höherfunktionaler Zellen wie Tripel- oder Doppelproduzenten, bei Kindern mit sekundären Infekten (Gruppe 2 und Gruppe 3) lagen deutlich mehr Einzelproduzenten vor. Dies zeigte sich sowohl für das CD4+ (Abbildung 10A und C) als auch das CD8+ Kompartiment (Abbildung 10B und D).

### 3.3 Vergleich der T-Zell-Differenzierung entsprechend des Alters

#### 3.3.1 T-Effektor- und T-Gedächtniszellkompartimente zeigen sich ähnlich im Altersvergleich

Da vorangegangene Infektionen nicht zu einer vermehrten T-Zell-Differenzierung geführt hatten (Abbildung 10), wurden für das untersuchte Kollektiv ferner Vergleiche entsprechend des Alters der Patienten vorgenommen, um einen möglichen Einfluss hierdurch zu prüfen. Für den Altersvergleich der CD4+ und CD8+ Population wurden die gleichen Subpopulationen wie im Gruppenvergleich betrachtet.



**Abbildung 11: Phänotyp der CD4+ und CD8+ T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter.** Die aus den Adenoiden gewonnenen mononukleären Zellen wurden zur Phänotypisierung wie auch in Abbildung 8 unstimuliert gelassen, die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie dargestellt. Vergleiche wurden zwischen den Kindern im Alter von einem Jahr, zwei Jahren oder drei Jahren und älter vorgenommen. Die Häufigkeit der RTE, T-Effektor- und T-Gedächtniszellen wurde sowohl für die CD4+ (links) als auch die CD8+ Population (rechts) gezeigt. Hellgrüne Balken repräsentieren einjährige Kinder, während dunkelgrüne Balken zweijährige und dunkelgraue Balken mindestens dreijährige Kinder abbilden. Jeder Kreis repräsentiert einen einzelnen Patienten der n=102 in der Studie analysierten Kinder. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (*one-way Anova*, Tukey HSD Mehrfachvergleiche).

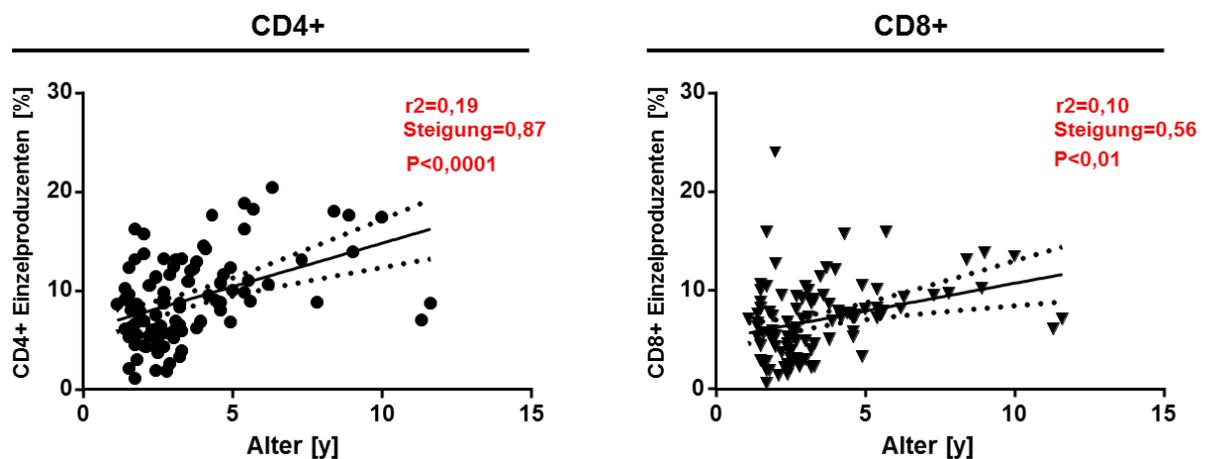
Im CD4+ Kompartiment war nur für die Häufigkeit der RTE, aber weder der T-Effektor- noch der T-Gedächtniszellen signifikante Veränderungen mit dem Alter zu verzeichnen. Es war eine kontinuierliche Abnahme des Anteils der RTE mit zunehmendem Alter zu beobachten (Einjährige 32,93%, Zweijährige 25,45%, Dreijährige und ältere Kinder 23,48%), einjährige Kinder zeigten signifikant mehr RTEs als Kinder im Alter von drei und älter ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 11, oben). Zudem stellte sich heraus, dass bereits einjährige Kinder eine erhebliche Menge an CD4+ T-Gedächtniszellen produzieren können (Abbildung 11, unten).

Dahingegen fanden sich im CD8+ Kompartiment weder bei den RTE noch bei den T-Effektorzellen signifikante Unterschiede in Zusammenhang mit dem Alter. Vergleich man jedoch Kinder von drei Jahren und älter mit Zweijährigen, so konnte gezeigt werden, dass erstere etwa doppelt so viele CD8+ T-Gedächtniszellen aufweisen, wenn auch in sehr niedrigen Frequenzen (10,52% gegenüber 4,59%,  $p < 0,01$ ) (Abbildung 11, unten rechts). Insgesamt wies das CD8+ Kompartiment einen jeweils großen Anteil an naiven T-Zellen wie auch T-Effektorzellen auf, dahingegen jedoch nur wenige T-Gedächtniszellen.

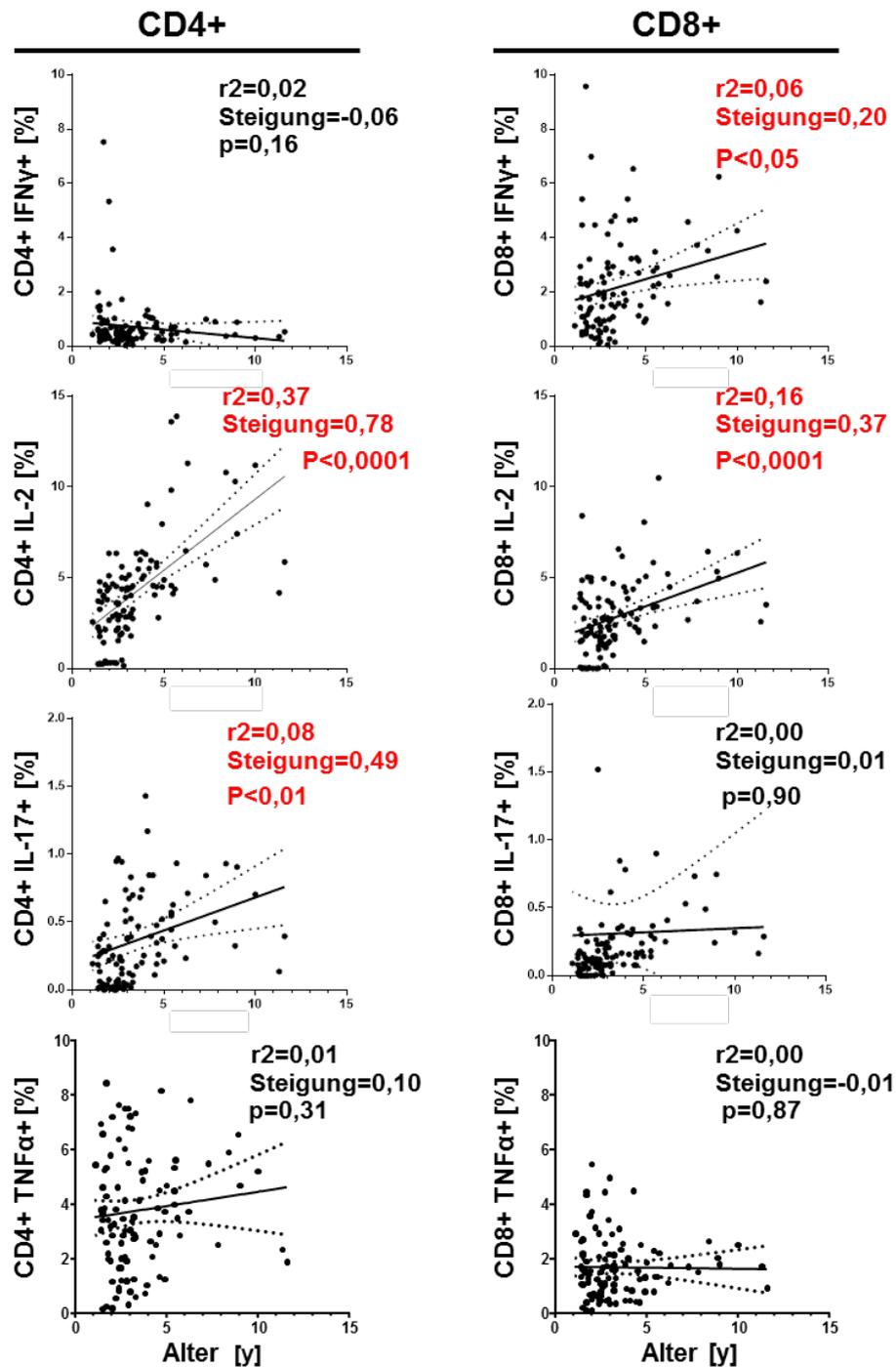
### 3.3.2 Analyse der Zytokinproduktion im Altersvergleich

Als nächstes wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den Einzelproduzenten und dem Alter hergestellt werden konnte. Unter allen CD4+ und CD8+ T-Zellen nahmen die Einzelproduzenten stetig und signifikant mit dem Alter zu (Abbildung 12A). Zurückführen ließ sich dieser Anstieg im CD4+ Kompartiment vor allem auf IL2+ und IL17+, im CD8+ Kompartiment auf IFN $\gamma$ + und IL2+ Einzelproduzenten (Abbildung 12B). Unabhängig vom Alter wurden innerhalb der CD4+ Population INF $\gamma$ + und TNF $\alpha$ + sowie innerhalb der CD8+ Population IL17+ und TNF $\alpha$ + Einzelproduzenten generiert.

(A)



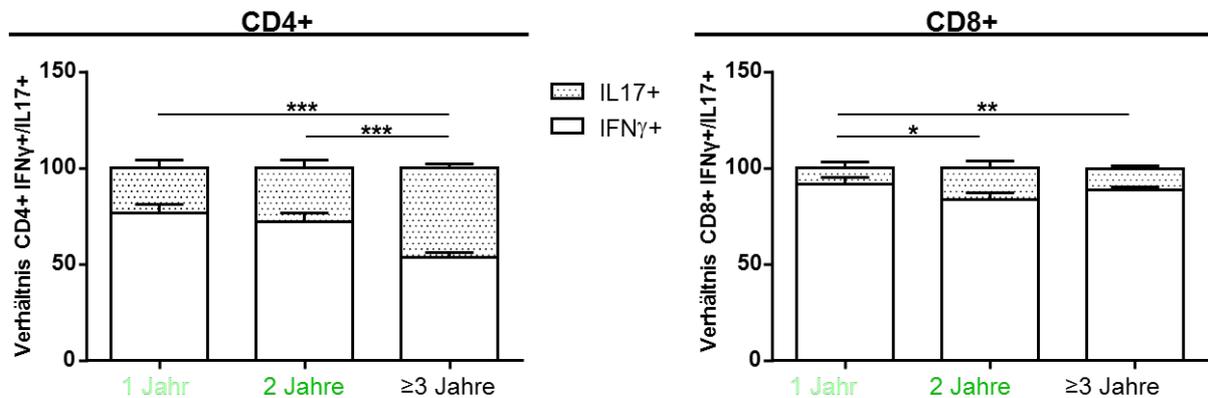
(B)



**Abbildung 12: Darstellung der Korrelation von Einzelproduzenten und Alter.** Die aus den Adenoiden gewonnenen Zellen wurden zur Analyse der Zytokinproduktion analog zu Abbildung 9 mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A für 6 Stunden stimuliert, die Zytokinproduktion mit Hilfe von Durchflusszytometrie gezeigt. Die Korrelationsgrafiken zeigen lineare Regression mit einem Konfidenzintervall von 95% innerhalb der CD4+ (links) und CD8+ Population (rechts). Gezeigt werden alle Einzelproduzenten (A) sowie die Aufschlüsselung in die funktionellen Subpopulationen der individuellen Einzelproduzenten (IFN $\gamma$ , IL2, IL17 und TNF $\alpha$ ) (B) mit zunehmendem Alter (1-11 Jahre). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (Spearman r Korrelation).

### 3.3.2.1 Betrachtung der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen bzw. T<sub>C</sub>1 und T<sub>C</sub>17-Zellen

Da IL17 in fetalen und neonatalen T-Zellen eine große Bedeutung zugesprochen wird,<sup>71</sup> wurden im folgenden T<sub>H</sub>17- und T<sub>C</sub>17-Zellen altersabhängig analysiert.

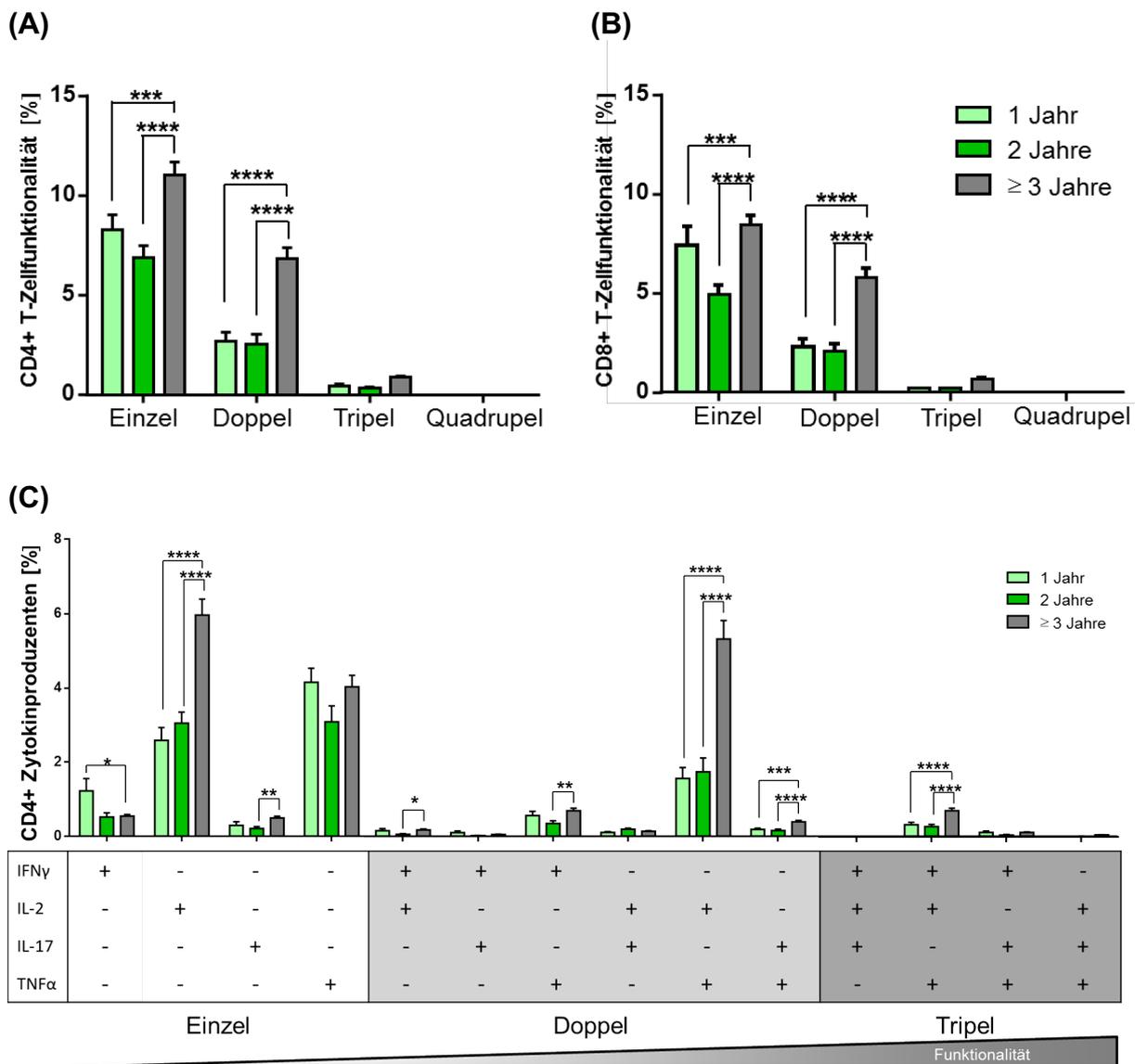


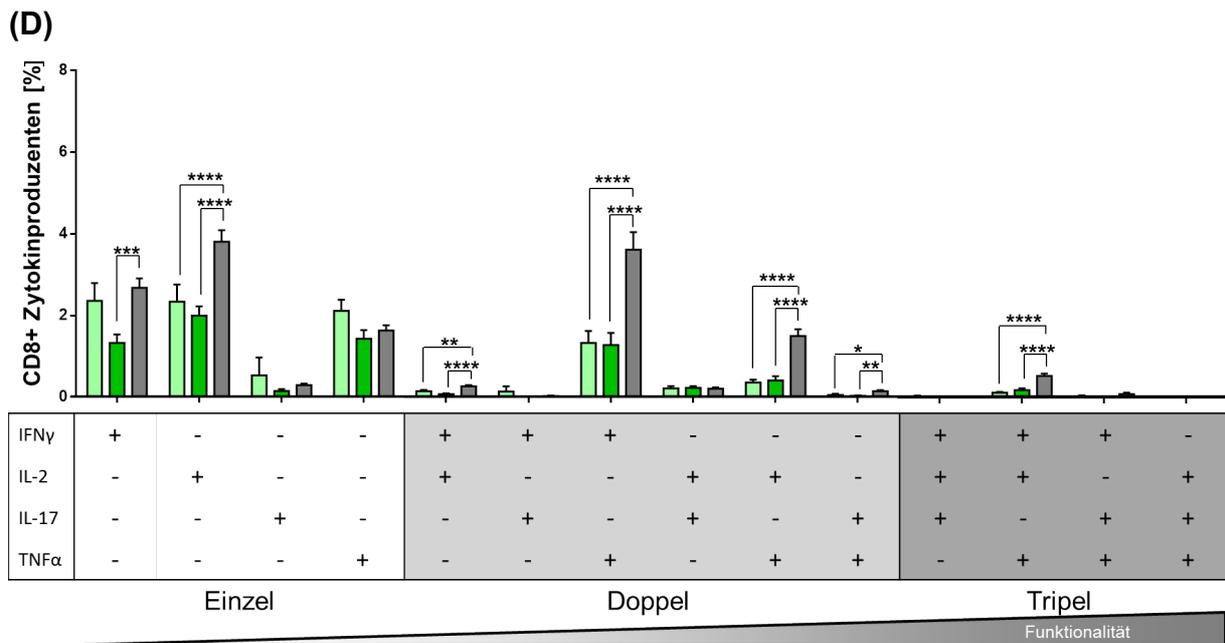
**Abbildung 13: Gegenüberstellung der IFN $\gamma$  und IL17 Produktion der CD4+ und CD8+ T-Zellen innerhalb der Altersklassen.** Die Stimulation und Analyse der aus den Adenoiden gewonnenen mononukleären Zellen erfolgte wie in Abbildung 9 beschrieben. Die prozentualen Anteile der Gesamt IFN $\gamma$ + (weiß) und IL17+ Population (graueliert) innerhalb des CD4+ (links) und CD8+ Kompartiments (rechts) wurden bestimmt, aufgerechnet auf hundert Prozent und innerhalb der Altersstufen miteinander verglichen. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Kolmogorov-Smirnoff sowie Kruskal-Wallis Test mit *post-hoc* Mehrfachvergleichen).

Anders als angenommen zeigte sich, dass bei jüngeren Kindern (Ein- und Zweijährigen) T<sub>H</sub>1-ähnliche Zellen häufiger nachzuweisen waren als T<sub>H</sub>17-ähnliche Zellen. Jedoch war eine Zunahme der T<sub>H</sub>17-Zellen mit zunehmendem Alter zu verzeichnen, Kinder im Alter von 3 und älter wiesen ca. 50% mehr IL17-produzierende CD4+ T-Zellen als sowohl ein- als auch zweijährige Kinder auf (46,26% bei Kindern von drei und älter gegenüber 23,36% bei Einjährigen,  $p < 0,001$ , und gegenüber 27,56% bei Zweijährigen,  $p < 0,001$ ). Dementsprechend bestand im CD4+ Kompartiment in der Gruppe der älteren Kinder ein T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>17-Gleichgewicht (Abbildung 13, links). Dahingegen fanden sich im CD8+ Kompartiment in allen Altersklassen überwiegend T<sub>C</sub>1-Zellen und nur ein geringer Anteil an T<sub>C</sub>17-Zellen vor, mit einer signifikanten Zunahme von letzteren bei Kindern ab zwei Jahren, wenn auch bei insgesamt sehr niedrigen Frequenzen (16,40% bei Zweijährigen und damit doppelt so viele wie bei Einjährigen mit 8,08%,  $p < 0,05$  und gegenüber 11,15%,  $p < 0,01$  bei mindestens dreijährigen Kindern) (Abbildung 13, rechts).

### 3.3.2.2 Ältere Kinder zeigen einen höheren Anteil an multifunktionalen CD4+ und CD8+ T-Zellen

Um auch bezüglich einer möglichen Altersabhängigkeit der Funktionalität von CD4+ und CD8+ T-Zellen in Adenoiden eine Aussage treffen zu können, wurden als nächstes multifunktionale T-Zellen, im Einzelnen Einfach-, Doppel-, Tripel- und Quadrupelproduzenten, im Vergleich zwischen Einjährigen, Zweijährigen sowie Dreijährigen und älteren Kindern analysiert (Abbildung 14).





**Abbildung 14: Vergleich multifunktionaler CD4+ (A und C) und CD8+ T-Zellen (B und D) nach Alter.** Für diesen Vergleich wurden die aus den Adenoiden gewonnenen Zellen von Einjährigen, Zweijährigen und Kindern von drei Jahren und älter stimuliert wie beschrieben in Abbildung 9 und analysiert wie gezeigt in Abbildung 10. CD4+ und CD8+ Subpopulationen, welche sich durch die Expression von einem (Einfach) oder simultan zwei (Doppel), drei (Tripel) oder vier (Quadrupel) verschiedenen Zytokinen auszeichneten, wurden gezeigt für das CD4+ (A) und CD8+ Kompartiment (B). (C, D) Die prozentualen Anteile der individuellen, funktionellen Subpopulationen (+) symbolisiert das exprimierte Zytokin innerhalb der CD4+ (C) und CD8+ Population (D). Hellgrüne Balken repräsentieren einjährige Kinder, dunkelgrüne Balken stehen für zweijährige- und dunkelgraue Balken für Kinder von 3 Jahren und älter. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (two-way Anova, Tukey HSD Mehrfachvergleiche).

Hierbei war in der Altersklasse der Kinder von drei Jahren und älter gegenüber den ein- oder zweijährigen Kindern in beiden T-Zell-Kompartimenten eine signifikante Zunahme der Einfach- und Doppelproduzenten zu vermerken. In der CD4+ Population zeigten sich für die Einfachproduzenten bei Dreijährigen und älteren Kindern 11,05% gegenüber Einjährigen mit 8,28%,  $p < 0,001$ , und gegenüber Zweijährigen mit 6,89%,  $p < 0,0001$ . Für Doppelproduzenten waren bei Dreijährigen und älteren Kindern 6,82% nachweisbar gegenüber Einjährigen mit 2,71%,  $p < 0,0001$ , und gegenüber Zweijährigen mit 2,55%,  $p < 0,0001$  (Abbildung 14A). In der CD8+ Population betragen Einfachproduzenten bei Dreijährigen und älteren Kindern 8,43% gegenüber 4,92% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ . Für Doppelproduzenten zeigten sich bei Dreijährigen und älteren Kindern 5,78% gegenüber Einjährigen mit 2,26%,  $p < 0,0001$ , und gegenüber Zweijährigen mit 2,06%,  $p < 0,0001$  (Abbildung 14B). Signifikante Unterschiede zwischen Ein- und Zweijährigen ließen sich lediglich bei den Einfachproduzenten in der CD8+ Population finden, hier wiesen Einjährige 7,35% gegenüber Zweijährigen

mit 4,92%,  $p < 0,001$ , auf. (Abbildung 14B). Bezüglich der Funktionalität der T-Zellen, welche durch die Koexpression verschiedener Zytokine gekennzeichnet ist, konnten somit deutliche Unterschiede während und nach dem Erreichen des 3. Lebensjahres aufgezeigt werden (Abbildung 14A bis D).

Es folgte wiederum eine Betrachtung der einzelnen Subpopulationen.

Die für die Pathogen-Bekämpfung sowohl im CD4+ als auch im CD8+ Kompartiment wichtigen  $IFN\gamma+IL2+TNF\alpha+$  koexprimierenden T-Zellen wiesen einen signifikant höheren Anteil bei Kindern ab drei Jahren auf im Vergleich zu Kindern im Alter von ein und zwei Jahren. In der CD4+ Population zeigten Dreijährige und ältere Kinder 0,71% gegenüber 0,32% bei Einjährigen,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 0,27% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$  (Abbildung 14C). In der CD8+ Population betrug diese für Dreijährige und ältere Kinder 0,54% gegenüber 0,13% bei Einjährigen,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 0,19% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$  (Abbildung 14D).

Bei der Betrachtung der CD4+ Doppelproduzenten machten  $IL2+TNF\alpha+$  Koproduzenten die größte Subpopulation aus, wobei Kinder von mindestens 3 Jahren 70% mehr ( $p < 0,0001$ ) dieser Koproduzenten aufwiesen als Ein- oder Zweijährige. Unterschiede zwischen Kindern im Alter von drei Jahren und älter und Zweijährigen konnten darüber hinaus im CD4+ T-Zell-Kompartiment auch für  $IFN\gamma+IL2+$ ,  $IFN\gamma+TNF\alpha+$  und  $IL17+TNF\alpha+$  Koproduzenten offenbart werden. Bei  $IFN\gamma+IL2+$  Doppelproduzenten zeigten Dreijährige und ältere Kinder 0,18% gegenüber 0,06% bei Zweijährigen,  $p < 0,05$ . Bei  $IFN\gamma+TNF\alpha+$  Doppelproduzenten wiesen Dreijährige und ältere Kinder 0,70% gegenüber 0,36% bei Zweijährigen,  $p < 0,01$ , auf. Für die letztangeführte Subpopulation der  $IL17+TNF\alpha+$  Doppelproduzenten wurden auch Unterschiede der drei- mit den einjährigen Kindern deutlich, hier zeigten Dreijährige und ältere Kinder 0,40% gegenüber 0,19% bei Einjährigen,  $p < 0,001$ , und gegenüber 0,16% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 14C). Auch bei den CD8+ Doppelproduzenten waren in allen Altersklassen überwiegend  $IFN\gamma+TNF\alpha+$  und  $IL2+TNF\alpha+$  Koproduzenten nachweisbar, wobei im Gegensatz zum CD4+ Kompartiment hier die  $IFN\gamma+TNF\alpha+$  Zellen dominierten. Dreijährige und ältere Kinder zeigten hier 3,61% gegenüber 1,33% bei Einjährigen,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 1,28% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ . Darüber hinaus konnte erwiesen werden, dass Kinder von drei und älter signifikant mehr  $IL2+TNF\alpha+$  Koproduzenten hatten als einjährige und zweijährige Kinder. Im Einzelnen betrug diese für Dreijährige und

ältere Kinder 1,50% gegenüber 0,36% bei Einjährigen,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 0,41% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ .  $IFN\gamma + IL2+$  und  $IL17 + TNF\alpha+$  Zellen machten einen deutlich kleineren Anteil innerhalb der Doppelproduzenten aus, aber auch hier gab es signifikante Unterschiede zwischen den mindestens dreijährigen Kindern und den jüngeren beiden Altersklassen.  $IFN\gamma + IL2+$  Doppelproduzenten beliefen sich auf 0,27% für Dreijährige und ältere Kinder gegenüber 0,15% bei Einjährigen,  $p < 0,01$ , und gegenüber 0,08% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ . Für  $IL17 + TNF\alpha+$  Doppelproduzenten zeigten sich für Dreijährige und ältere Kinder 0,15% gegenüber 0,06% bei Einjährigen,  $p < 0,05$ , und gegenüber 0,04% bei Zweijährigen,  $p < 0,01$  (Abbildung 14D).

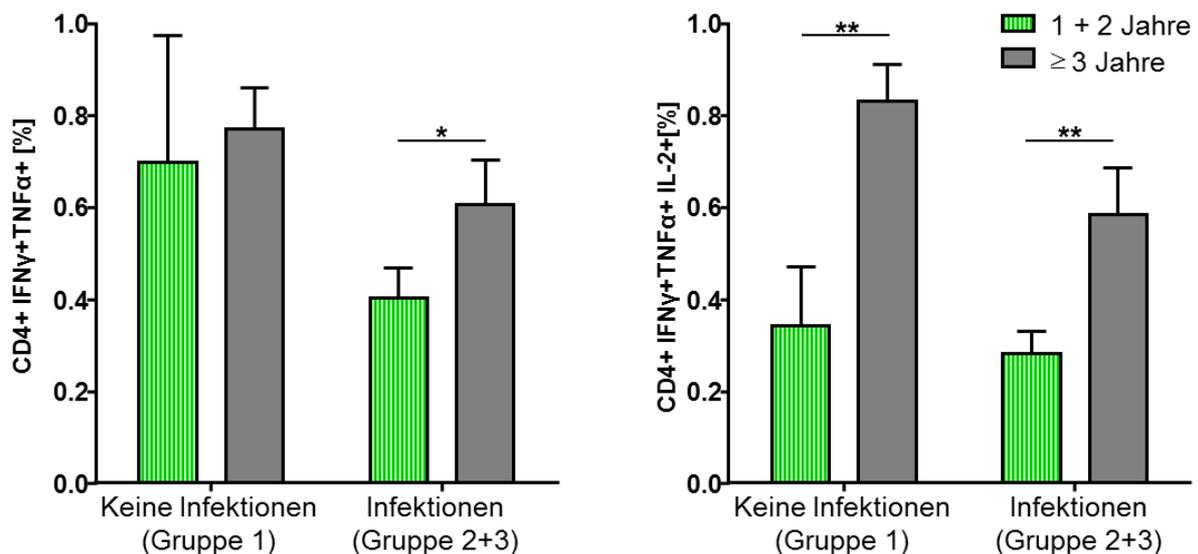
Bei der Analyse der  $CD4+$  Einzelproduzenten konnte deutlich gemacht werden, dass mehrheitlich  $IL2+$  sowie  $TNF\alpha+$  Zellen vorlagen, wobei Kinder von drei Jahren und älter etwa doppelt so viele  $IL2+$  Zellen aufwiesen im Vergleich zu sowohl ein- als auch zweijährigen Kindern. Im Einzelnen zeigten sich für Dreijährige und ältere Kinder 5,96% gegenüber 2,59% bei Einjährigen,  $p < 0,0001$ , und gegenüber 3,05% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ . Es waren keine signifikanten Unterschiede der  $TNF\alpha+$  Zellen im Vergleich der Altersklassen erkennbar. Mit zunehmendem Alter konnte eine Abnahme von  $IFN\gamma+$  Zellen verzeichnet werden, mit einem nachweislichen Unterschied zwischen Dreijährigen und älteren Kindern mit 0,55% gegenüber 1,23% bei Einjährigen,  $p < 0,05$ . Obwohl insgesamt nur sehr wenig  $IL17+$  Zellen nachgewiesen werden konnten, hatten Dreijährige und ältere Kinder etwa doppelt so viele  $IL17+$  Zellen wie Zweijährige (0,50% gegenüber 0,22%,  $p < 0,01$ ) (Abbildung 14C). Innerhalb der  $CD8+$  Einzelproduzenten konnte beschrieben werden, dass Kinder im Alter von 3 Jahren und älter überwiegend  $IL2+$  Zellen aufwiesen, anteilmäßig gefolgt von  $IFN\gamma+$ ,  $TNF\alpha+$  und nur sehr wenig  $IL17+$  Zellen.  $IL2+$  Einzelproduzenten betragen für Dreijährige und ältere Kinder 3,81% gegenüber 2,34% bei Einjährigen,  $p < 0,0001$  und 2,00% bei Zweijährigen,  $p < 0,0001$ . Bei  $IFN\gamma+$  Einzelproduzenten waren zudem für Dreijährige und ältere Kinder 2,68% gegenüber 1,33% bei Zweijährigen,  $p < 0,001$  nachweisbar (Abbildung 14D).

Kinder im Alter von drei Jahren und älter zeichnen sich somit durch einen signifikant höheren Anteil an Doppel- und Tripelproduzenten und somit höherfunktionalen Zellen aus. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Kinder mit zunehmendem Alter höherfunktionale  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Zellen wie Doppel- oder Tripelproduzenten akkumulieren.

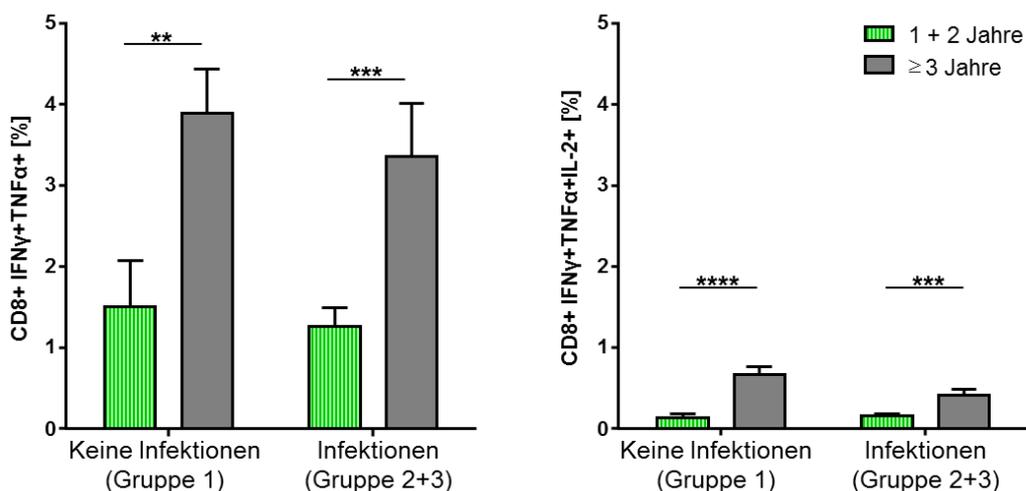
### 3.4 Gegenüberstellung der Einflüsse auf die T-Zell-Funktionalität

Zunächst wurde angenommen, dass die Fähigkeit der simultanen Expression mehrerer Zytokine ausschließlich auf die Entwicklung im Rahmen der T-Zell-Differenzierung und nicht auf äußere Einflüsse wie Infektionen zurückzuführen war. Um eine getrennte Betrachtung von T-Zell-Differenzierung und möglichen anderen Einflüssen vornehmen zu können, wurde im Folgenden untersucht, ob in Kenntnis der Krankheitsvorgeschichte auch eine Abhängigkeit vom Alter vorlag. Im Unterschied zu den vorangegangenen Analysen wurden die Kinder aus Gruppe 1 exemplarisch als die Gruppe der Kinder ohne, diejenigen aus Gruppe 2 und 3 wurden zusammengefasst und als die Gruppe der Kinder mit begleitenden Infektionen in der Vorgeschichte angesehen und dementsprechend definiert (Abbildung 15).

(A)



(B)



**Abbildung 15: Vergleich von CD4+ und CD8+ Doppel- und Tripelproduzenten im Gruppen- und Altersvergleich.** Die aus den Adenoiden gewonnenen Zellen wurden wie in Abbildung 9 stimuliert und

analysiert. Häufigkeiten von CD4+ (A) und CD8+ (B) IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + Doppelproduzenten bei Kindern von eins und zwei oder drei Jahren und älter entweder mit (zusammengeschlossene Gruppe 2 und 3) oder ohne (Gruppe 1) begleitende Infektionen sind links gezeigt, wohingegen die Häufigkeiten von CD4+ (A) und CD8+ (B) IFN $\gamma$ + IL2+ TNF $\alpha$  Tripelproduzenten rechts aufgeführt sind. Grüngestreifte Balken repräsentieren ein- und zweijährige Kinder, dunkelgraue Balken stehen für Kinder von 3 Jahren und älter. Horizontale Linien zeigen den Durchschnittswert  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (*two-way Anova*, Tukey HSD Mehrfachvergleiche).

In der Gruppe der Kinder, bei denen keine Sekundärinfektionen vorgelegen hatten, zeigte sich im Vergleich der Altersklassen ein ähnlicher Anteil an CD4+ IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + Doppelproduzenten (bei Dreijährigen und älteren Kindern 0,77% gegenüber 0,70% bei Ein- und Zweijährigen,  $p = 0,75$ ) (Abbildung 15A, ganz links). Demgegenüber ließen sich deutlich weniger dieser Doppelproduzenten bei den Ein- und Zweijährigen nachweisen, welche sich klinisch durch das Vorliegen von Infektionen ausgezeichnet hatten (bei Dreijährigen und älteren Kindern 0,61% gegenüber 0,40% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,05$ ).

Bei der Betrachtung von CD4+ IFN $\gamma$ +IL2+TNF $\alpha$ + Tripelproduzenten zeigte sich unabhängig von der Infektionsgeschichte ein drastischer Anstieg der Tripelproduzenten mit zunehmendem Alter (in der Gruppe ohne vorangegangene Infektionen bei Dreijährigen und älteren Kindern 0,83% gegenüber 0,34% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,01$ , sowie in der Gruppe mit vorangegangenen Infektionen bei Dreijährigen und älteren Kindern 0,58% gegenüber 0,28% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,01$ ) (Abbildung 15A, rechts).

Für die CD8+ T-Zellen wurde deutlich, dass sowohl die CD8+ IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + Doppelproduzenten als auch die CD8+ IFN $\gamma$ +IL2+TNF $\alpha$ + Tripelproduzenten ab dem Alter von 3 Jahren signifikant anstiegen. Im Einzelnen zeigten sich für die CD8+ IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + Doppelproduzenten in der Gruppe ohne Infektionen bei Dreijährigen und älteren Kindern 3,89% gegenüber 1,50% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,01$ , und in der Gruppe mit vorangegangenen Infektionen bei Dreijährigen und älteren Kindern 3,35% gegenüber 1,26% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,001$ .

Für die CD8+ IFN $\gamma$ +IL2+TNF $\alpha$ + Tripelproduzenten zeigten sich in der Gruppe ohne vorangegangene Infektionen bei Dreijährigen und älteren Kindern 0,67% gegenüber 0,31% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,0001$ , und in der Gruppe mit vorangegangenen Infektionen bei Dreijährigen und älteren Kindern 0,41% gegenüber 0,16% bei Ein- und Zweijährigen,  $p < 0,001$ . Dieser Anstieg zeigte sich unabhängig von etwaigen akuten oder chronischen vorangegangenen Infektionen (Abbildung 15B).

## **4 Diskussion**

Eine Hypertrophie der Adenoide ist die häufigste Ursache von Nasenventilationsstörungen im Kindesalter. Bei einem großen Anteil des Patientenkollektivs kommt es durch konsekutive Belüftungsstörung des Mittelohrs zu der Entwicklung eines Paukenergusses. Einige Kinder leiden zudem an rezidivierenden Infekten der oberen Luftwege bez. an rezidivierenden Mittelohrentzündungen. Es können somit vereinfachend drei Hauptindikationen für die operative Entfernung hypertrophierter Adenoide gestellt werden, anhand dieser in der vorliegenden Arbeit eine Einteilung in drei klinische Gruppe erfolgte. Da es sich nur bei zwei dieser drei Indikationen schwerpunktmäßig um Infektionen bzw. infektiöse Komplikationen handelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass zwischen diesen Gruppen Unterschiede in der T-Zell-vermittelten Immunantwort bestehen. Weiterhin ist die Betrachtung möglicher Altersunterschiede in der T-Zell-Differenzierung interessant. In dieser Arbeit wurde die T-Zell-Funktionalität in Abhängigkeit vom Alter bei 102 Kindern untersucht, bei welchen eine Hypertrophie der Adenoide mit oder ohne vorangegangene rezidivierende oder chronische Infektionen vorlag.

### **4.1 Betrachtung des Patientenkollektivs**

#### **4.1.1 Klinische Symptomatik und Gruppeneinteilung**

Bei der Gruppeneinteilung nach klinischer Symptomatik ergaben sich folgende Herausforderungen: während Gruppe 1 durch die Abwesenheit von infektiösen Vorerkrankungen charakterisiert und dadurch genau definiert war, so ließ sich eine Unterteilung in die Gruppen 2 und 3 nicht immer so eindeutig treffen, da einige der Patienten Symptome aus beiden Gruppen aufwiesen. So zeigten auch in Gruppe 3 59,0% der Kinder rezidivierende Rhinitiden und demgegenüber 30,3% der Kinder aus Gruppe 2 neben Atemwegsinfekten auch Infekte des Mittelohrs. Letzteres wurde dadurch begründet, dass Entzündungen der Atemwege durch die anatomische Nähe häufig auch Entzündungen des Mittelohrs mitbedingen können. Entscheidend für die Zuordnung zu Gruppe 3 wurde das Vorliegen einer von den Eltern empfundenen Hörminderung festgelegt. Alle Kinder, welche neben einer Hörminderung zusätzlich noch eine Vorgeschichte von Infekten des Mittelohrs aber auch der Atemwege aufwiesen, wurden der Gruppe 3 zugeteilt.

Bei Betrachtung der klinischen Symptomatik zeigte sich wie erwartet, dass auch ein deutlicher Anteil der Kinder in Gruppe 1 neben der Nasenatmungsbehinderung eine Rhonchopathie aufwies. Tatsächlich war der Anteil der Kinder, welche durch Schnarchen auffielen, in Gruppe 2 sogar noch höher. Erklärt werden könnte dieses jedoch gut durch das schwerpunktmäßige Vorliegen rezidivierender Atemwegsinfekte in dieser Gruppe, welche in der akuten Phase ebenfalls häufig zu Schnarchen und einer nasal empfundenen Aussprache führen können.<sup>53</sup> Auch in Gruppe 3 zeigte sich ein recht großer Anteil an Kindern, für welche eine nasale Aussprache beschrieben worden war. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Paukenerguss und somit eine veränderte Hörwahrnehmung auch eine Veränderung der Aussprache zur Folge haben könnte.

Zu den Symptomen, die laut präoperativem Erfassungsbogen zu Gruppe 1 gezählt wurden, gehörten zudem Appetitlosigkeit, Tagesmüdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten. Diese Symptome wurden kaum genannt, zeigten sich aber bei Kindern aller drei Gruppen. Tatsächlich sind diese Symptome als sehr unspezifisch anzusehen und in ihrer Genese multifaktoriell, sodass retrospektiv offensichtlich erscheint, dass sie sich nicht eindeutig einer der drei definierten Gruppen zuordnen ließen. Darüber hinaus ist zu beachten, dass auch hier wieder lediglich subjektive Wahrnehmungen der Eltern vorlagen und nicht etwa beispielsweise eine Konzentrationsdiagnostik vorausgesetzt wurde. Ebenfalls berücksichtigt werden muss, dass einige der Kinder neben der Adenotomie und eventueller Parazentese oder Paukendrainage auch beispielsweise eine Tonsillotomie oder Tonsillektomie erhielten, die hier zugrunde liegende Erkrankung kann weitaus eher auch zu dem Symptom der Appetitlosigkeit geführt haben.

Die Auswertung der apparativen Hörprüfungen sowie die Betrachtung, ob neben der Adenotomie zusätzlich auch noch ein operativer Eingriff am Trommelfell erfolgte, machten deutlich, dass ein Unterschied darin bestand, wie viele Kinder subjektiv an einer Hörminderung litten und bei wie vielen sich in der objektiven Höruntersuchung oder intraoperativ dann auch tatsächlich Auffälligkeiten im Mittelohr zeigten, die die Durchführung einer Parazentese oder sogar den Einsatz von Paukenröhrchen erforderlich machten. So erhielten beispielsweise in Gruppe 2 ein Drittel der Kinder auch eine Operation an den Ohren, obwohl für diese Gruppe bei keinem Kind von den

Eltern eine Hörminderung beschrieben worden war. Demgegenüber war in Gruppe 3 für 92,3% der Kinder eine Hörminderung angegeben worden, jedoch wurde nur bei 76,9% dann auch tatsächlich ein Eingriff am Trommelfell vorgenommen.

In Gruppe 1 war bei sechs Kindern (20,0%) eine Hörminderung angegeben worden, es wurde dann jedoch sogar bei neun Kindern (30,0%) intraoperativ ein Paukenerguss gesehen, welcher mittels Parazentese oder Paukendrainage behandelt wurde. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass die entsprechenden Kinder allesamt schon älter waren und die Hörminderung eventuell gut zu kompensieren gelernt hatten, sodass sie den Eltern im Vorfeld nicht aufgefallen war.

Die beschriebene Diskrepanz zwischen den Kindern, bei denen eine von den Eltern beschriebene Hörminderung vorlag, und denen, die auch eine auffällige Hörtestung aufwiesen und intraoperativ eine Parazentese oder sogar Paukendrainage erhielten, lässt diskutieren, ob eine Gruppeneinteilung statt auf subjektiven auch auf besser objektivierbaren und damit eher nachvollziehbareren Daten sinnvoller gewesen wäre.

#### **4.1.2 Konzeption des Erfassungsbogens zum stationären Verlauf**

Bezüglich der Auswertung des Erfassungsbogens zum stationären Verlauf wurde dessen erster Teil bei genauerer Betrachtung als wenig relevant eingeordnet, sodass diese Daten dementsprechend im Ergebnisteil auch nicht aufgeführt wurden.

Der Fragebogen orientierte sich in seiner Konzeption an der präoperativen klinischen Untersuchung im Rahmen der Aufnahme zur Operation, wie sie in der Klinik für HNO der Universität Magdeburg routinemäßig durchgeführt wird. Diese Angaben zur klinischen Untersuchung erwiesen sich für die Gruppeneinteilung jedoch als wenig hilfreich. Da für jede Operation aufgrund des Narkoserisikos theoretisch Infektfreiheit vorliegen muss, um von der Anästhesie eine entsprechende Operationsfreigabe zu erhalten, konnten die hier aufgeführten klinischen Auffälligkeiten nur bedingt als exemplarisch für das zurückliegende Vorliegen oder die Abwesenheit von rezidivierenden Infekten oder Mittelohrentzündungen verwendet werden. Die Ergebnisse zur ohrmikroskopischen Untersuchung konnten zwar bereits Hinweise auf das Vorliegen eines Paukenergusses erbringen, lieferten durch die zusätzlich durchgeführten apparativen Höruntersuchungen letztlich jedoch maximal ein redundantes Ergebnis.

### 4.1.3 Alter der Patienten

Die Analyse der Alterszusammensetzung des untersuchten Kollektivs zeigte ein Durchschnittsalter von 3,5 Jahren. Dieses erwies sich im Vergleich mit anderen Studien als vergleichsweise jung, so ließen sich in der Literatur für die Durchführung von Adenotomien bei Kindern eher ein Durchschnittsalter von ca. 6 Jahren finden.<sup>57,59,63</sup> Lediglich eine Studie, welche die Einflüsse der Adenotomie auf verschiedene Komponenten der humoralen und zellulären Immunität kurz nach der Operation analysierte, betrachtete hierfür ein noch jüngeres Kollektiv mit einem Durchschnittsalter von 2,4 Jahren. Einschränkend ist zu bemerken, dass in dieser Studie nur Kinder im Alter bis zu 3 Jahren untersucht wurden.<sup>72</sup>

Das junge Alter dieses Kollektivs wurde als besonders interessant für die geplanten immunologischen Untersuchungen angesehen.

Bezüglich der Alterszusammensetzung der jeweiligen Gruppen werden, wie aus Tabelle 9 und Abbildung 7 ersichtlich, leichte Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich. Die Patienten in Gruppe 1 waren im Durchschnitt älter als jene in Gruppe 2 und Gruppe 3, auch die Maximalwerte zeigten sich in dieser Gruppe am höchsten. Hierdurch lässt sich die Frage stellen, ob der Effekt, dass Gruppe 1 sich von den anderen beiden klinischen Gruppen unterscheidet, dadurch verzerrt wird, dass diese Gruppe auch mehr ältere Kinder enthielt, welche wie später gezeigt Unterschiede in der T-Zell-Differenzierung gegenüber jüngeren Kindern aufweisen. Um auszuschließen, dass es sich hierbei letztlich um den gleichen Effekt handelt, wurden, wie in Abbildung 15 ersichtlich wird, die Einflüsse von vorangegangenen Infektionen und Alter einander gegenübergestellt und somit eine gegenseitige Beeinflussung ausgeschlossen.

## **4.2 Zusammensetzung der T-Zell-Kompartimente**

Beim Vergleich der T-Zell-Differenzierung zwischen den klinischen Gruppen sowie in Bezug auf das Alter konnte gezeigt werden, dass in einem sekundär lymphatischen Organ, der Tonsilla pharyngea, eine gleichbleibende Verteilung von naiven, T-Effektor und T-Gedächtniszellen besteht, ohne dass diese durch Infektionsgeschichte oder Alter der Patienten beeinflusst wird (Abbildungen 8 und 11). Während bei Untersuchungen an Blut ein stetiger Anstieg der zirkulierenden T-Gedächtniszellen und eine Abnahme der naiven T-Zellen diskutiert wird,<sup>73-75</sup> lässt die konsistente Größe der einzelnen T-Zell-Kompartimente in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Bedeutung vermuten. Eine derartige funktionelle Bedeutung von T-Zell-Kompartimenten konnte so auch bei Untersuchungen in der Neonatalperiode angenommen werden, in denen eine Kompartimentalisierung dazu beizutragen scheint, im Rahmen der Immunregulation auf die sich rasch ändernden Umwelteinflüsse und Exposition mit verschiedensten Antigenen direkt nach der Geburt einzugehen.<sup>76</sup>

### **4.2.1 Vergleich der T-Zell-Differenzierung nach klinischer Symptomatik**

Im Einzelnen zeigten sich in dieser Arbeit bei Kindern ab dem Alter von einem Jahr CD4+ T-Gedächtniszellen als die vorherrschende Population und ein ebenfalls recht großer Anteil an RTEs, letztere machten innerhalb der CD8+ T-Zellen sogar den größten Anteil aus. Bei der Analyse anderer lymphatischer Gewebe und Blut von Kindern bis zum Alter von zwei Jahren wird in der Literatur beschrieben, dass in diesen dahingegen überwiegend naive T-Zellen vorliegen, während T-Gedächtniszellen vor allem im lymphatischen Gewebe von Erwachsenen gefunden werden.<sup>30,77</sup> RTEs hingegen konnten bei Erwachsenen deutlich weniger häufig nachgewiesen werden.<sup>18</sup> Das hohe Vorkommen von CD4+ T-Gedächtniszellen insbesondere in den Adenoiden von sehr jungen Kindern scheint auf die Notwendigkeit zurückzugehen, gerade zu diesem Zeitpunkt rasch und unmittelbar auf die wiederkehrende Exposition mit Krankheitserregern reagieren und diese abzuwehren zu können.

Demgegenüber fanden sich bei der Analyse der CD8+ Population nur eine geringe Häufigkeit von T-Gedächtniszellen und dafür ein höherer Anteil an naiven T-Zellen sowie T-Effektorzellen. Dieses deckt sich mit früheren Analysen, in welchen berichtet wurde, dass CD8+ T-Zellen nicht ohne weiteres in der Lage sind, T-Gedächtniszellen

zu generieren,<sup>13</sup> nach vorliegenden Ergebnissen auch nicht in einem sehr jungen, pädiatrischen Kollektiv.

Der vergleichsweise hohe Anteil an CD8+ T-Effektorzellen in Adenoiden könnte darauf zurückzuführen sein, dass einhergehend mit einem Schutz vor von außen eindringenden Pathogenen eine direkte Abtötung infizierter Zellen notwendig wird, wie sie durch T-Effektorzellen erfolgt. Die raschere Reaktionsfähigkeit der T-Effektorzellen im Vergleich zu T-Gedächtniszellen<sup>78</sup> erscheint hier vorteilhaft. Dabei lässt sich annehmen, dass die bevorzugte Differenzierung in T-Effektor- anstatt in T-Gedächtniszellen auf die Lokalisation der Adenoide im Nasen-Rachen-Raum und die damit einhergehende ständige Exposition mit Krankheitserregern zurückzuführen ist, wobei möglicherweise auch zellintrinsische Mechanismen beteiligt sein könnten. Inwieweit der große Anteil an CD8+ T-Effektorzellen auch auf die Hypothese zurückgeführt werden kann, dass die T-Zell-Differenzierung aus bereits vorliegenden Vorläuferzellen erfolgt<sup>13</sup>, muss an anderer Stelle genauer untersucht werden.

Obwohl sich in Adenoiden die Häufigkeit des Vorliegens von T-Effektor- und T-Gedächtniszellen mit dem Alter nur wenig ändert, ist davon auszugehen, dass sich das Repertoire an T-Zell-Rezeptoren kontinuierlich verändert bzw. anpasst. Durch die Kolonisierung der Mukosa innerhalb der ersten drei Lebensjahre erhöht sich deren Diversität und phylogenetische Zusammensetzung und nähert sich immer mehr der eines Erwachsenen an.<sup>30,79</sup>

#### **4.2.2 Korrelation von T-Zell-Qualität mit Krankheitsprogression**

Multifunktionale T-Zellen zeichnen sich durch die Koproduktion mehrerer Zytokine aus (z.B. IFN $\gamma$ /IL2/IL17/TNF $\alpha$ ) und gewinnen mit zunehmender Differenzierung an Funktionalität, wodurch sie ein hohes Ausmaß an Immunprotektion erreichen.<sup>40</sup> Dementsprechend kann durch die Betrachtung multifunktionaler Zellen eine Aussage über die Qualität der T-Zell-Antwort gegeben werden. Während auf quantitativer Ebene, wie oben aufgeführt, sowohl innerhalb der CD4+ als auch der CD8+ Gesamtpopulation bei der Betrachtung der jeweiligen naiven T-Zellen, T-Effektor- bzw. T-Gedächtniszellen innerhalb der klinischen Gruppen keine und im Altersvergleich nur wenige signifikanten Unterschiede zu finden waren, zeigten sich auf qualitativer Ebene signifikante Unterschiede sowohl im Gruppen- als auch im Altersvergleich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Qualität der T-Zell-Antwort mit dem klinischen Krankheitsstadium korreliert. Dieses steht im Einklang mit vielen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass multifunktionale T-Zellen funktionell überlegen sind und eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen spielen.<sup>80–85</sup>

Bislang wurden multifunktionale T-Zellen vor allem an HIV-Patienten oder Patienten mit anderen Virusinfektionen untersucht und gemäß der Qualität der T-Zell-Antwort versucht, eine Aussage zum klinischen Verlauf zu treffen. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten, welche entweder eine antiretrovirale Therapie erhielten oder ein niedriges Virämie-Level hatten, mehr höherfunktionale Zellen aufwiesen im Vergleich zu Patienten mit stärkerem Krankheitsprogress. Demgegenüber zeigten sich bei Patienten mit ausgeprägter Krankheitsprogression eher niedrigfunktionale Zellen, welche lediglich ein Zytokin sezernierten.<sup>80,81,85</sup> Bei Untersuchungen mit Influenza-, Epstein-Barr-, Varizella-Zoster- und Zytomegalie-Virus war auffällig, dass multifunktionale T-Helferzellen vor allem nach bereits durchgemachter Infektion persistierten. Auch hier zeigte sich eine höhere Anzahl an multifunktionalen Zellen bei den Patienten, welche eine bessere Krankheitskontrolle und dementsprechend eher niedrigfunktionale Zellen bei ausgeprägter Krankheitsprogression aufwiesen.<sup>82–84</sup> Zu klären blieb hierbei die Frage, ob die Prädominanz multifunktionaler T-Zellen Ursache oder Wirkung der Infektionskontrolle ist.<sup>46</sup> Dass multifunktionale T-Helferzellen einen protektiven Effekt im Entzündungsgeschehen zeigen, konnte darüber hinaus in einem Mausmodell nachgewiesen werden, bei dem die Frequenz dieser Zellen nach Infektion mit oder Impfung gegen *Leishmania major* korrelierte.<sup>86</sup>

Weiterhin konnte anhand von Impfstudien belegt werden, dass durch Impfstoffe generierte multifunktionale CD4+ und CD8+ T-Zellen einen besseren Schutz vor Virusinfektionen gewährleisten.<sup>22,46,87,88</sup> Eine derartige Zunahme multifunktionaler T-Zellen konnte in einer aktuellen Studie nach der jährlichen Anwendung einer Gripeschutzimpfung gezeigt werden.<sup>88</sup> Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Impfstoffe gegen Humane Papillomaviren durch die Aktivierung multifunktionaler CD8+ T-Zellen auch einen besseren Schutz gegen von Humanen Papillomaviren induzierte Tumoren bieten.<sup>89</sup> Insgesamt scheint für die Entwicklung von Impfstoffen eine genaue Kenntnis und Phänotypisierung der T-Zell-Immunität und –Genetik bedeutend zu sein.<sup>90</sup>

Durch die hier vorliegende Studie konnte gezeigt werden, dass auch in einem pädiatrischen Patientenkollektiv durch multifunktionale T-Zellen eine bessere Erreger- und somit Infektionskontrolle besteht.

Sowohl für CD4+ T-Zellen als auch für CD8+ T-Zellen wiesen Kinder, welche klinisch lediglich durch eine Nasenventilationsstörung imponierten, bei denen jedoch im Vorfeld keine infektiösen Sekundärkomplikationen aufgetreten waren, eine größere Anzahl an höherfunktionalen Zellen auf. Dahingegen zeigte sich entsprechend in den anderen beiden Gruppen (Gruppe 2 und 3), in welchen die Kinder zusätzlich zu der adenoiden Hypertrophie auch rezidivierende Infekte der oberen Atemwege bez. des Mittelohrs in ihrer Vorgeschichte aufwiesen, ein vergleichsweise höherer Anteil an einfach positiven Zellen, welche durch rasches Übergehen in die Apoptose ein weiteres Voranschreiten der Infektion ermöglichten. Ein Verlust höherfunktionaler Zellen scheint dementsprechend mit der Entwicklung sekundärer Komplikationen hypertrophierter Adenoide einherzugehen (Abbildung 10).

Die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse dahingehend, dass T-Zell-Qualität und somit -Funktionalität mit zunehmender Krankheitsprogression abnehmen, geht davon aus, dass es sich bei rezidivierenden Infektionen der oberen Atemwege bzw. des Mittelohrs um Sekundärkomplikationen handelt, welche durch das Vorliegen der Adenoiden Hypertrophie begünstigt oder sogar bedingt werden. Gestützt werden kann diese Annahme dadurch, dass tatsächlich bei allen 102 Probanden, für die eine eindeutige Gruppeneinteilung vorgenommen werden konnte, eine Adenoide Hypertrophie vorlag, jedoch nur bei 72 gleichzeitig auch von vorangegangenen rezidivierenden Infektionen berichtet wurde. Zwar wird auch in der Literatur eine Abnahme der wiederkehrenden Infektionen bei Kindern nach Adenotomie beschrieben,<sup>58</sup> eine eindeutige Kausalitätszuordnung wäre jedoch nur möglich gewesen, wenn die untersuchten Probanden über einen längeren Zeitraum auch nach der Operation untersucht worden wären.

Weiterhin konnte bei der Betrachtung der T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen gezeigt werden, dass bei Patienten, bei denen zusätzlich Infekte der oberen Atemwege bestanden, eine Dominanz an T<sub>H</sub>1-Zellen vorherrschte, wohingegen innerhalb der Gruppe der Patienten mit alleiniger nasaler Obstruktion ein optimales, ausgewogenes T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17-Verhältnis bestand (Abbildung 9, links). Dieses deckt sich mit der Beschreibung, dass

in Adenoiden ein Gleichgewicht von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>17-Zellen vorteilhaft ist.<sup>26</sup> Auch Patienten mit Infektionen des Mittelohrs bzw. vorliegendem Seromukotympanon (Gruppe 3) zeigten jedoch ein ausgewogenes T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17-Verhältnis, was zu der Spekulation führen könnte, dass dieses auch der Chronifizierung von Infektionen entgegenwirkt. Die Patienten unseres Kollektivs, welche insgesamt mindestens ein Jahr alt sind, zeigen dementsprechend jedoch nicht die Dominanz an T<sub>H</sub>17-Zellen, wie sie von fetalen oder neonatalen Kollektiven bekannt ist.<sup>2,91</sup> Das weitgehende Verschwinden dieser T<sub>H</sub>17-Zellen im frühen Kindesalter könnte auf einer Umwandlung von T<sub>H</sub>17- in T<sub>H</sub>1-Zellen beruhen<sup>70</sup> oder aber auf eine direkte Differenzierung neonataler Vorläuferzellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen.<sup>13</sup>

#### **4.2.3 T-Zell-Qualität im Altersvergleich**

Studien, welche sich mit der Veränderung der T-Zell-Ausprägung in Korrelation zum Alter beschäftigen, konzentrieren sich bisher fast ausschließlich auf die Veränderungen, die mit dem eigentlichen Altern einhergehen. Das Alter und die Veränderungen des Immunsystems in der Kindheit scheinen jedoch das Ausmaß und die Qualität der T-Zell-Antwort maßgeblich zu beeinflussen. Bislang gibt es über den Einfluss des Alters auf die Multifunktionalität von T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen nur wenig Untersuchungen, meines Wissens existieren dazu bisher keine anderen *ex-vivo* Experimente welche ein Kollektiv, das ähnlich jung ist wie das hier gezeigte, untersucht haben.

In einer kleinen Arbeit zu zirkulierenden T-Zellen wurden im Vergleich älterer Kinder (6-17 Jahre) mit Erwachsenen (20-65 Jahre) die Auswirkungen des Alters auf die T-Zell-Multifunktionalität untersucht.<sup>92</sup> Es konnte nach Stimulation durch ein Staphylokokken-Enterotoxin eine Korrelation zwischen Alter und Zunahme multifunktionaler CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Effektor-Zellen hergestellt und somit Unterschiede in den zwei Altersklassen gezeigt werden. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie zeigte ein infektiologisches Geschehen somit einen Einfluss auf die Ausbildung multifunktionaler T-Zellen, wobei in der erwachsenen Vergleichsgruppe dieser Einfluss sistierte. Im Vergleich drei verschiedener Altersgruppen, die jedoch alle dem Erwachsenenalter zuzuordnen waren (<40 Jahren, 41 bis 59 Jahren und >60 Jahren), zeigte sich anhand einer anderen Studie kein Einfluss auf die Ausbildung multifunktionaler T-Zellen.<sup>93</sup>

In der vorliegenden Arbeit lässt sich feststellen, dass Kinder, welche drei Jahre oder älter waren, ein differentes T-Zell-Profil gegenüber jüngeren Kindern aufwiesen. Bei der Betrachtung multifunktionaler T-Zellen konnte gezeigt werden, dass höherfunktionale Zellen bei Kindern von drei Jahren oder älter einen signifikant höheren Anteil ausmachten, wohingegen bei jüngeren Kindern signifikant mehr Einfachproduzenten nachweisbar waren. Ein höheres Ausmaß der T-Zell-Differenzierung scheint somit erst mit drei Jahren oder älter erreicht zu werden, sodass dieses Alter einen Wendepunkt in Bezug auf die T-Zell-Qualität darzustellen scheint. Bei älteren Kindern dominierte das alleinige Vorliegen einer Nasenventilationsstörung ohne gleichzeitiges Vorliegen rezidivierender Infekte der oberen Atemwege oder des Mittelohrs, sie wurden dementsprechend überwiegend der Gruppe 1 zugeordnet. Die durch die Hypertrophie ausgelösten Symptome der Nasenatmungsbehinderung zeigten klinisch mit zunehmendem Alter weniger Relevanz, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sich die anatomischen Proportionen im Nasen-Rachen-Raum bei älteren Kindern zum Vorteil vergrößern.<sup>55</sup> Das weitaus geringere gleichzeitige Vorliegen von konsekutiven Entzündungen der oberen Atemwege oder des Mittelohrs bei älteren Kindern scheint auf die mit zunehmendem Alter erworbene Immunkompetenz zurückgeführt werden zu können.

Dieses deckt sich gut mit der Hypothese, dass ein höherer Anteil multifunktionaler T-Zellen mit Krankheitsstillstand bzw. Infektionskontrolle einhergeht.<sup>46,81–83</sup>

Ausblickend scheint die Pubertät zumindest anhand des vorliegenden, in dieser Altersklasse limitierten, Kollektivs keine Unterschiede in der T-Zell-Differenzierung zu machen.

Auch im CD8+ Kompartiment konnte ein hochsignifikanter Einfluss des Alters auf die Ausbildung multifunktionaler T-Zellen gezeigt werden, so war ein deutlicher Anstieg ab einem Alter von drei Jahren erkennbar. Ein gleichzeitiger Einfluss durch vorliegende Infektionen konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 15).

Einschränkend ist zu überlegen, ob ein frühzeitiger Wechsel von sowohl niedrigfunktionalen CD8+ T-Zellen als auch von CD8+ T-Gedächtniszellen auch darauf hinweisen könnte, dass in sekundären lymphatischen Organen Mechanismen zur Favorisierung von Differenzierung fehlen.<sup>39,93</sup>

Tatsächlich beginnen auch andere Lymphozyten-Subpopulationen wie reife B-Zellen oder Marginalzellen, welche für ihre Formierung auf sekundäre lymphoide Strukturen

angewiesen sind, sich vermehrt erst im Alter von zwei Jahre zu bilden.<sup>13,94</sup> Die Analyse der T-Zell-Funktionalität in Adenoiden zeigt, dass die Entwicklung des Immunsystems einem festgelegten Pfad folgt.<sup>7</sup> Dementsprechend könnte auch der Einfluss von Alter und Entwicklung auf verschiedene immunologische Prozesse weitaus größer sein, als auf den ersten Blick ersichtlich.<sup>95,96</sup>

#### **4.2.4 Gegenüberstellung der Einflüsse auf die T-Zell-Funktionalität**

Bei der Gegenüberstellung der Einflüsse auf die T-Zell-Funktionalität konnte gezeigt werden, dass Alter und Krankheitsvorgeschichte die Bildung von Zytokin-Koproduzenten im CD4+ und CD8+ Kompartiment unterschiedlich beeinflussen (Abbildung 15).

Beim Vergleich der Gruppen mit und ohne gleichzeitig vorliegende Infektionen bestanden kaum Unterschiede zwischen den CD4+ IFN $\gamma$ +IL2+TNF $\alpha$ + - und auch den CD8+ IFN $\gamma$ +IL2+TNF $\alpha$ + -Tripelproduzenten, es war wie beschrieben ein deutlicher, signifikanter Anstieg der Tripelproduzenten mit zunehmendem Alter zu verzeichnen. Auch bei den CD8+ IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + Doppelproduzenten zeigte sich unabhängig von der Krankheitsvorgeschichte eine deutliche Zunahme bei den älteren Kindern.

Dahingegen fanden sich bei den CD4+ IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ + Doppelproduzenten Unterschiede zwischen den Altersklassen nur bei den Kindern, bei denen auch Sekundärinfektionen vorgelegen hatten, nicht jedoch bei denen ohne infektiöse Vorgeschichte.

Folglich scheinen vorangegangene Infektionen in den ersten beiden Lebensjahren zwar für die verringerte Häufigkeit von CD4+ T-Zellen, welche IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  koexprimieren, verantwortlich zu sein. Der Anstieg der Dreifachproduzenten ist jedoch ausschließlich im Rahmen der entwicklungsbedingten T-Zell-Differenzierung zu sehen. Gegensätzlich verhalten sich die CD8+ T-Zellen, deren Zunahme von Zytokin-Koproduzenten jeglicher Art ausschließlich durch das Alter, also lediglich entwicklungsbedingt, beeinflusst wird.

Dieses könnte dadurch bedingt sein, dass beim Vorliegen von Infektionen die Produktion der Tripelproduzenten zu Lasten der Doppelproduzenten gehen kann. Eine ontogenetische Bedeutung könnte diese Beobachtung dadurch erlangen, dass Tripelproduzenten eher in den T-Gedächtniszellpool übergehen können.<sup>46</sup> Die

Fähigkeit, komplexere T-Zell-Antworten zu erzeugen, könnte somit auch auf festgelegte, intrinsische Mechanismen innerhalb der Entwicklung des kindlichen Immunsystems zurückgehen.

### **4.3 Stärken und Grenzen der Arbeit**

Im Zentrum der Arbeit stehen multifunktionale Gedächtniszellen, welche nach Seder als „CD4+ oder CD8+ T-Zellen, die zwei oder mehr verschiedene Zytokine produzieren“ definiert sind<sup>46</sup> (Definition übersetzt durch Verfasserin). In Anlehnung an dieses Modell zur T-Zell-Differenzierung können Parallelen gezogen werden zu anderen Studien, die das vermehrte Vorkommen von diesen multifunktionalen T-Zellen mit einer Infektionskontrolle gleichsetzen.

Bei den Zellen, welche gleichzeitig mehr als ein Zytokin produzieren, konnte anhand des Aufbaus unserer Untersuchungen keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um T-Effektor- oder T-Gedächtniszellen handelt, da in keinem der verwendeten Farbe-Panel für die Durchflusszytometrie Gedächtniszellmarker und Zytokine zusammen vorkamen. Es kann an diesem Punkt lediglich darüber spekuliert werden, an welchem Punkt in der T-Zell-Differenzierung sich die gezeigten Zellen befinden, und durch weitere Studien untersucht werden.

Nach Farber sind die meisten Humanexperimente bezüglich ihrer Aussage zur Gedächtniszellbildung eingeschränkt repräsentativ, da sie zum einen lediglich Untersuchungen an Blut vornehmen und zum anderen überwiegend Material von (jungen) Erwachsenen untersuchen.<sup>40</sup> Durch die Verwendung von Lymphgewebe, welches zum Höhepunkt der Gedächtniszellbildung während primärer Infektionen in der Kindheit gewonnen wurde, hat die vorliegende Studie demnach einen hohen Aussagewert.

Als Bestandteil des lymphatischen Gewebes erfolgt eine Mitreaktion und beginnende Hypertrophie der Tonsilla pharyngea ab dem Zeitpunkt, an dem sich der kindliche Organismus mit Pathogenen auseinandersetzen beginnt.<sup>50</sup> Diese Mitreaktion an sich ist also durchaus als physiologisch im Rahmen des Erwerbs kindlicher Immunkompetenz zu sehen.<sup>52</sup> Die chronische und somit pathologische Hypertrophie der Adenoide und das Auftreten infektiöser Sekundärkomplikationen stellen dann den eigentlichen Krankheitswert dar.<sup>53</sup> Es existieren meines Wissens nach bisher lediglich

Untersuchungen des Keimspektrums in Adenoiden sowie des Mittelohrs.<sup>97</sup> Diese lassen jedoch keine eindeutigen Schlussfolgerungen darüber zu, ob die chronisch hypertrophierten Adenoide ein Keimreservoir darstellen und damit zu chronisch rezidivierenden Infektionen der oberen Atemwege oder des Mittelohrs führen oder ob vielmehr das ständige Auseinandersetzen mit Krankheitserregern während der Kindheit erst zu einer chronischen Hypertrophie des Adenoids führt. Zur präventiven Bekämpfung scheint es unumgänglich zu sein, die Frage nach Ursache und Wirkung eindeutig zu klären, auch wenn dies wahrscheinlich nur beobachtend möglich sein wird.

Bei der Analyse der Qualität von T-Zellen in hypertrophierten Adenoiden ist zu bedenken, dass die Operation jeweils zum Zeitpunkt klinischer Infektfreiheit durchgeführt wurde. Aussagen zu akuten Infektionen können deswegen nur begrenzt vorgenommen werden, für chronisch-rezidivierende Infektionen sind die Proben jedoch sehr gut repräsentativ.

Bei epidemiologischer Betrachtung der vorliegenden Daten zeigt sich, dass alle Kinder präoperativ in ihrer Eigenanamnese eine eingeschränkte Nasenatmung, jedoch nur etwas über die Hälfte auch rezidivierende Infektionen der Atemwege und nur knapp ein Drittel rezidivierende Mittelohrentzündungen in ihrer Krankenvorgeschichte aufwiesen. Es kann diskutiert werden, dass bei den Kindern ohne begleitende Infekte eine bessere Krankheitskontrolle durch das Vorkommen eines höheren Anteils an multifunktionalen T-Zellen bedingt ist, wie es in der vorliegenden Arbeit erfolgt. Werden die Infektionen der oberen Atemwege oder des Mittelohrs als Sekundärkomplikationen angesehen, so könnte jedoch auch argumentiert werden, dass sie bei jedem Kind zwangsläufig auftreten würden, wenn dieses nur lange genug nicht operiert würde, man also so gesehen mit der Operation der Entstehung von infektiösen Folgereaktionen nur vorgreift.<sup>98</sup> Fast 75% der Kinder mit alleiniger nasaler Obstruktion waren jedoch drei Jahre oder älter zum Zeitpunkt der Operation (Tabelle 9), sodass die Abwesenheit von chronischen Infektionen als valide und repräsentativ anzusehen ist.

Durch die Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurde nicht ausgeschlossen, dass auch Kinder in die Studie aufgenommen werden konnten, bei denen zeitgleich neben der

Adenotomie noch eine weitere Operation im HNO-Bereich stattfand. Dementsprechend erhielten im untersuchten Kollektiv 21,6% der Patienten zudem eine Tonsillo- oder Tonsillektomie und zwei (2%) der Kinder eine Nasenmuschelplastik bei Nasenmuschelhyperplasie. Letztere erhielten interessanterweise die zwei ältesten Kinder des Kollektivs, welche aufgrund der im Vordergrund stehenden nasalen Symptomatik beide Gruppe 1 zugeordnet worden waren. Es lässt sich diskutieren, ob ebenjene Symptomatik wirklich alleinig durch vergrößerte Adenoide ausgelöst worden war und nicht mindestens kodependent auch von der Muschelhyperplasie. Beide Kinder wiesen jedoch makroskopisch auch große Adenoide auf, die nach der Operation im Labor für diese Doktorarbeit aufbereitet wurden. Einen Ausschluss dieser beiden Patienten durch strengere Ein- bzw. Ausschlusskriterien hätte jedoch die Alterszusammensetzung in Gruppe 1 verändert und die größten Ausreißer bezüglich des Alters ausgeschlossen.

Anhand dieser Studie kann zudem nicht geklärt werden, ob es bei den Probanden im Laufe der Zeit mit fortschreitender Immunkompetenz nicht auch zu einer spontanen Regression der Adenoiden Hypertrophie gekommen wäre.<sup>51</sup> In der vorliegenden Arbeit wird zudem nicht untersucht, ob im Vorfeld der stationären Einweisung zur Operation vorher konservative Therapieversuche erfolgt sind. Eine Therapieoption zur operativen Entfernung der Adenoide wurde durch eine Studie analysiert, in welcher Kinder bei vorliegender Rhinosinusitis eine medikamentöse Therapie mittels oraler Antibiotika sowie Antihistaminika und intranasaler Steroide erhielten. Der Erfolg der Therapie wurde hierbei gemessen an einer Abnahme der adenoiden Hypertrophie ermittelt durch MRT-Bildgebung. Diese Studie stellte die operative Exzision der Adenoide als ultima ratio in Frage, konnte andererseits aber auch keinen eindeutigen Vorteil durch eine medikamentöse Therapie nachweisen.<sup>99</sup>

Die Adenotomie scheint bei angemessener klinischer Indikationsstellung nicht nur eine effiziente operative Methode darzustellen, sondern vor allem auch keine negativen Einflüsse auf den Gesundheitszustand oder die Immunkompetenz von Kindern zu haben.<sup>72</sup>

## 5 Zusammenfassung – Ausblick und klinische Relevanz

Bei der adenoiden Hypertrophie handelt es sich empirisch neben der chronischen Tonsillitis um die häufigste Krankheit des Hals-Nasen-Ohren-Bereiches im Kindesalter. Für die in dieser Studie untersuchten Kinder konnte ein differentes T-Zell-Profil je nach klinischer Symptomatik und Alter im Vorfeld der Operation nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass in Adenoiden von 102 Kindern im Alter von ein bis elf Jahren ähnliche Verteilungen von naiven, T-Effektor- T-Gedächtniszellen vorlagen, ohne dass ein Einfluss von vorangegangenen Infektionen bestand. Dahingegen zeigten Patienten mit einer Vorgeschichte von rezidivierenden Infektionen einen geringeren Anteil an multifunktionalen CD4+ oder CD8+ T-Zellen. Innerhalb dieser Gruppe dominierten zudem T<sub>H</sub>1-Zellen, wohingegen Kinder ohne begleitende Infekte ein Gleichgewicht der T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17-Kompartimente aufwiesen. Darüber hinaus zeigte die Analyse der multifunktionalen CD4+ und CD8+ T-Zellen, dass sich Kinder im Alter von mindestens drei Jahren signifikant von jüngeren Kindern unterscheiden, sodass ein entscheidender Wandel der T-Zell-Differenzierung in diesem Altern angenommen werden kann.

Mittels einer konzeptionellen Trennung, durch welche die Unabhängigkeit der Einflussfaktoren einer Infektionsvorgeschichte bzw. des Alterns voneinander gewährleistet werden konnte, wurde deutlich, dass die CD8+ T-Zell-Differenzierung ausschließlich der Entwicklung durch Altern unterliegt, wohingegen die CD4+ T-Zell-Funktionalität teilweise auch durch Infektionen beeinträchtigt wird. Bis zum Alter von drei Jahren wird diese Funktionalität jedoch wiederhergestellt, sodass das Alter von drei Jahren einen entscheidenden Zeitpunkt in der kindlichen Entwicklung des Immunsystems darzustellen scheint, um robuste, höherqualitative T-Zell-Kompartimente zu bilden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse die Aussage treffen, dass bei der Entscheidung über klinische Verfahren das Alter von Patienten sowie die Infektionsgeschichte der Patienten mit in Erwägung zu ziehen sind, um entsprechend auch Indikationsstellungen und klinische Protokolle zu überprüfen und eventuell anzupassen. Bereits nach dem dritten Lebensjahr scheint das Immunsystem voll ausgeprägt und dementsprechend in der Lage zu sein, der Krankheitsexposition in Adenoiden effektiv zu begegnen.

## Literaturverzeichnis

- 1 Moulton VR, Farber DL. Committed to memory: Lineage choices for activated T cells. *Trends Immunol.* (2006) 27(6):261-267. doi:10.1016/j.it.2006.04.006.
- 2 Vogel K, Pierau M, Arra A, et al. Developmental induction of human T-cell responses against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep.* (2018) 8(1):16904. doi:10.1038/s41598-018-35161-5.
- 3 van den Aardweg MT, Schilder AG, Herkert E, Boonacker CW, Rovers MM. Adenoidectomy for otitis media in children. *Cochrane Database Syst Rev.* (2010) (1):CD007810. doi:10.1002/14651858.CD007810.pub2.
- 4 Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol.* (2004) 25(12):640-644. doi:10.1016/j.it.2004.10.001.
- 5 Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T. *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe; mit 216 Tabellen.* 2., völlig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; (2013)
- 6 Pierau M, Arra A, Brunner-Weinzierl MC. Preventing Atopic Diseases During Childhood - Early Exposure Matters. *Front Immunol.* (2021) 12:617731. doi:10.3389/fimmu.2021.617731.
- 7 Lee AH, Shannon CP, Amenyogbe N, et al. Dynamic molecular changes during the first week of human life follow a robust developmental trajectory. *Nat Commun.* (2019) 10(1):1092. doi:10.1038/s41467-019-08794-x.
- 8 Memar MY, Alizadeh N, Varshochi M, Kafil HS. Immunologic biomarkers for diagnostic of early-onset neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* (2019) 32(1):143-153. doi:10.1080/14767058.2017.1366984.
- 9 Schroeder HW, Zhang L, Philips JB. Slow, programmed maturation of the immunoglobulin HCDR3 repertoire during the third trimester of fetal life. *Blood.* (2001) 98(9):2745-2751. doi:10.1182/blood.V98.9.2745.
- 10 Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Ehrenstein M, Seidler L. *Janeway Immunologie.* 7., Aufl., korrigierter Nachdr. (2014) Berlin: Springer Spektrum; 2014.
- 11 Williams MA, Holmes BJ, Sun JC, Bevan MJ. Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol. Rev.* (2006) 211:146-153. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00389.x.
- 12 Bommhardt U, Beyer M, Hunig T, Reichardt HM. Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci.* (2004) 61(3):263-280. doi:10.1007/s00018-003-3224-3.
- 13 Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, Burt TD, et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science.* (2010) 330(6011):1695-1699. doi:10.1126/science.1196509.

- 14 Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood*. (2009) 113(4):769-774. doi:10.1182/blood-2008-02-139154.
- 15 Kieper WC, Jameson SC. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1999) 96(23):13306-13311.
- 16 Clarke SR, Rudensky AY. Survival and homeostatic proliferation of naive peripheral CD4+ T cells in the absence of self peptide: MHC complexes. *J Immunol*. (2000) 165(5):2458-2464.
- 17 Larbi A, Fulop T. From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: When markers predict functionality. *Cytometry A*. (2014) 85(1):25-35. doi:10.1002/cyto.a.22351.
- 18 Fink PJ, Hendricks DW. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nat Rev Immunol*. (2011) 11(8):544-549. doi:10.1038/nri3028.
- 19 Vrisekoop N, den Braber I, Boer AB de, et al. Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2008) 105(16):6115-6120. doi:10.1073/pnas.0709713105.
- 20 Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zajac AJ, Weaver CT. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature*. (2008) 452(7185):356-360. doi:10.1038/nature06672.
- 21 Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. (2006) 441(7095):890-893. doi:10.1038/nature04790.
- 22 Rosa SC de, Lu FX, Yu J, et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol*. (2004) 173(9):5372-5380.
- 23 Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev*. (2010) 238(1):247-262. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x.
- 24 Halonen M, Lohman IC, Stern DA, et al. Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *J Immunol*. (2009) 182(5):3285-3293. doi:10.4049/jimmunol.0711996.
- 25 Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. (2009) 30(5):646-655. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001.
- 26 Lévy R, Okada S, Béziat V, et al. Genetic, immunological, and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2016) 113(51): E8277-E8285. doi:10.1073/pnas.1618300114.

- 27 Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.* (2008) 223:87-113. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x.
- 28 Gibbons D, Fleming P, Virasami A, et al. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat Med.* (2014) 20(10):1206-1210. doi:10.1038/nm.3670.
- 29 Vanden Eijnden S, Goriely S, Wit D de, Willems F, Goldman M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur. J. Immunol.* (2005) 35(2):469-475. doi:10.1002/eji.200425677.
- 30 Thome JJC, Bickham KL, Ohmura Y, et al. Early-life compartmentalization of human T cell differentiation and regulatory function in mucosal and lymphoid tissues. *Nat Med.* (2016) 22(1):72-77. doi:10.1038/nm.4008.
- 31 Tato CM, O'Shea JJ. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature.* (2006) 441(7090):166-168. doi:10.1038/441166a.
- 32 Hebel K, Weinert S, Kuroopka B, et al. CD4+ T cells from human neonates and infants are poised spontaneously to run a nonclassical IL-4 program. *J Immunol.* (2014) 192(11):5160-5170. doi:10.4049/jimmunol.1302539.
- 33 Angkasekwinai P. Th9 Cells in Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* (2019) 19(5):29. doi:10.1007/s11882-019-0860-8.
- 34 He Y, Dong L, Cao Y, Bi Y, Liu G. IL-9 and Th9 Cells in Tumor Immunity. *Adv Exp Med Biol.* (2020) 1240:35-46. doi:10.1007/978-3-030-38315-2\_3.
- 35 Eyerich K, Eyerich S. Th22 cells in allergic disease. *Allergo J Int.* (2015) 24(1):1-7. doi:10.1007/s40629-015-0039-3.
- 36 Kondělková K, Vokurková D, Krejsek J, Borská L, Fiala Z, Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove).* (2010) 53(2):73-77. doi:10.14712/18059694.2016.63.
- 37 Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity.* (2007) 27(3):393-405. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.007.
- 38 Stockinger B, Bourgeois C, Kassiotis G. CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. *Immunol. Rev.* (2006) 211:39-48. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00381.x.
- 39 Galindo-Albarrán AO, López-Portales OH, Gutiérrez-Reyna DY, et al. CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Rep.* (2016) 17(8):2151-2160. doi:10.1016/j.celrep.2016.10.056.
- 40 Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* (2014) 14(1):24-35. doi:10.1038/nri3567.

- 41 Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* (2004) 22:745-763. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- 42 Opata MM, Stephens R. Early Decision: Effector and Effector Memory T Cell Differentiation in Chronic Infection. *Curr Immunol Rev.* (2013) 9(3):190-206. doi:10.2174/1573395509666131126231209.
- 43 Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* (2013) 43(11):2797-2809. doi:10.1002/eji.201343751.
- 44 Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur. J. Immunol.* (2009) 39(8):2076-2082. doi:10.1002/eji.200939722.
- 45 Stemberger C, Huster KM, Busch DH. Defining correlates of T cell protection against infection. *Discov Med.* (2006) 6(34):148-152.
- 46 Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol.* (2008) 8(4):247-258. doi:10.1038/nri2274.
- 47 Lichterfeld M, Yu XG, Waring MT, et al. HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood.* (2004) 104(2):487-494. doi:10.1182/blood-2003-12-4341.
- 48 Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* (2011) 17(10):1290-1297. doi:10.1038/nm.2446.
- 49 Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Sierro S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000) 97(24):13263-13268. doi:10.1073/pnas.230417497.
- 50 Brambilla I, Pusateri A, Pagella F, et al. Adenoids in children: Advances in immunology, diagnosis, and surgery. *Clin Anat.* (2014) 27(3):346-352. doi:10.1002/ca.22373.
- 51 Amici M de, Ciprandi G, Marseglia A, et al. Adenoid hypertrophy: definition of some risk factors. *J Biol Regul Homeost Agents.* (2012) 26(1 Suppl): S1-7.
- 52 Brietzke SE, Brigger MT. Adenoidectomy outcomes in pediatric rhinosinusitis: A meta-analysis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* (2008) 72(10):1541-1545. doi:10.1016/j.ijporl.2008.07.008.
- 53 Pagella F, Colombo A, Gatti O, Giourgos G, Matti E. Rhinosinusitis and otitis media: the link with adenoids. *Int J Immunopathol Pharmacol.* (2010) 23(1 Suppl):38-40.

- 54 Rosenfeld RM, Shin JJ, Schwartz SR, et al. Clinical Practice Guideline: Otitis Media with Effusion (Update). *Otolaryngol Head Neck Surg.* (2016) 154(1 Suppl):S1-S41. doi:10.1177/0194599815623467.
- 55 Torretta S, Marchisio P, Esposito S, Cappadona M, Fattizzo M, Pignataro L. Diagnostic accuracy of the nasal obstruction index in detecting adenoid hypertrophy in children without allergy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* (2011) 75(1):57-61. doi:10.1016/j.ijporl.2010.10.007.
- 56 Skoloudik L, Kalfert D, Valenta T, Chrobok V. Relation between adenoid size and otitis media with effusion. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* (2018) doi:10.1016/j.anorl.2017.11.011.
- 57 Zielnik-Jurkiewicz B, Stankiewicz-Szymczak W. Pro-inflammatory interleukins in middle ear effusions from atopic and non-atopic children with chronic otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* (2015) doi:10.1007/s00405-015-3683-9.
- 58 van den Aardweg MT, Schilder AG, Herkert E, Boonacker CW, Rovers MM. Adenoidectomy for recurrent or chronic nasal symptoms in children. *Cochrane Database Syst Rev.* (2010) (1):CD008282. doi:10.1002/14651858.CD008282.
- 59 Pagella F, Amici M de, Pusateri A, et al. Adenoids and clinical symptoms: Epidemiology of a cohort of 795 pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* (2015) 79(12):2137-2141. doi:10.1016/j.ijporl.2015.09.035.
- 60 Smith ME, Tysome JR. Tests of Eustachian tube function: A review. *Clin Otolaryngol.* (2015) 40(4):300-311. doi:10.1111/coa.12428.
- 61 Thakur JS, Chauhan I, Mohindroo NK, Sharma DR, Azad RK, Vasanthalakshmi MS. Otoacoustic Emissions in Otitis Media with Effusion: Do They Carry any Clinical Significance? *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* (2013) 65(1):29-33. doi:10.1007/s12070-012-0587-5.
- 62 Cai T, McPherson B. Hearing loss in children with otitis media with effusion: A systematic review. *Int J Audiol.* (2017) 56(2):65-76. doi:10.1080/14992027.2016.1250960.
- 63 Ungkanont K, Damrongsak S. Effect of adenoidectomy in children with complex problems of rhinosinusitis and associated diseases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* (2004) 68(4):447-451. doi:10.1016/j.ijporl.2003.11.016.
- 64 Sade K, Fishman G, Kivity S, DeRowe A, Langier S. Expression of Th17 and Treg lymphocyte subsets in hypertrophied adenoids of children and its clinical significance. *Immunol Invest.* (2011) 40(6):657-666. doi:10.3109/08820139.2011.575426.
- 65 Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* (2012) 33(7):323-332. doi:10.1016/j.it.2012.02.010.
- 66 Lugli E, Roederer M, Cossarizza A. Data analysis in flow cytometry: the future just started. *Cytometry A.* (2010) 77(7):705-713. doi:10.1002/cyto.a.20901.

- 67 Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* (2019) 49(10):1457-1973. doi:10.1002/eji.201970107.
- 68 Staats J, Divekar A, McCoy JP, Maecker HT. Guidelines for Gating Flow Cytometry Data for Immunological Assays. *Methods Mol Biol.* (2019) 2032:81-104. doi:10.1007/978-1-4939-9650-6\_5.
- 69 Çalık Ç, Turan MS, Peralta R. The Multiplicative Complexity of 6-variable Boolean Functions. *Cryptogr Commun.* (2018) 11(1):93-107. doi:10.1007/s12095-018-0297-2.
- 70 Arra A, Lingel H, Kuroпка B, et al. The differentiation and plasticity of Tc17 cells are regulated by CTLA-4-mediated effects on STATs. *Oncoimmunology.* (2017) 6(2): e1273300. doi:10.1080/2162402X.2016.1273300.
- 71 Lawrence SM, Ruoss JL, Wynn JL. IL-17 in neonatal health and disease. *Am J Reprod Immunol.* (2018) 79(5): e12800. doi:10.1111/aji.12800.
- 72 Yan Y, Song Y, Liu Y, et al. Early Stage Impacts of Adenoidectomy With/Without Tonsillectomy on Immune Functions of Children Aged Less Than Three Years. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* (2019) 32(1):18-22. doi:10.1089/ped.2018.0964.
- 73 Schmiedeberg K, Krause H, Röhl F-W, Hartig R, Jorch G, Brunner-Weinzierl MC. T Cells of Infants Are Mature, but Hyporeactive Due to Limited Ca<sup>2+</sup> Influx. *PLoS ONE.* (2016) 11(11): e0166633. doi:10.1371/journal.pone.0166633.
- 74 Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint J-P, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech Ageing Dev.* (2006) 127(3):274-281. doi:10.1016/j.mad.2005.11.001.
- 75 Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity.* (2018) 48(2):202-213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007.
- 76 Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity.* (2017) 46(3):350-363. doi:10.1016/j.immuni.2017.03.009.
- 77 Thome JJC, Yudanin N, Ohmura Y, et al. Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell.* (2014) 159(4):814-828. doi:10.1016/j.cell.2014.10.026.
- 78 Youngblood B, Hale JS, Kissick HT, et al. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature.* (2017) 552(7685):404-409. doi:10.1038/nature25144.

- 79 Yatsunenkeno T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. (2012) 486(7402):222-227. doi:10.1038/nature11053.
- 80 Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol*. (2007) 81(16):8468-8476. doi:10.1128/JVI.00228-07.
- 81 Hernández DM, Valderrama S, Gualtero S, et al. Loss of T-Cell Multifunctionality and TCR-V $\beta$  Repertoire Against Epstein-Barr Virus Is Associated With Worse Prognosis and Clinical Parameters in HIV+ Patients. *Front Immunol*. (2018) 9:2291. doi:10.3389/fimmu.2018.02291.
- 82 Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, et al. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol*. (2007) 81(21):12071-12076. doi:10.1128/JVI.01261-07.
- 83 Ferreira VH, Kumar D, Humar A. Deep Profiling of the CD8+ T cell Compartment identifies Activated cell subsets and Multifunctional Responses Associated with Control of Cytomegalovirus Viremia. *Transplantation*. (2018) doi:10.1097/TP.0000000000002373.
- 84 Westerhof LM, McGuire K, MacLellan L, et al. Multifunctional cytokine production reveals functional superiority of memory CD4 T cells. *Eur. J. Immunol*. (2019) 49(11):2019-2029. doi:10.1002/eji.201848026.
- 85 Vingert B, Benati D, Lambotte O, et al. HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J Virol*. (2012) 86(19):10661-10674. doi:10.1128/JVI.00056-12.
- 86 Darrah PA, Patel DT, De Luca, Paula M, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*. (2007) 13(7):843-850. doi:10.1038/nm1592.
- 87 Becattini S, Latorre D, Mele F, et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4<sup>+</sup> T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science*. (2015) 347(6220):400-406. doi:10.1126/science.1260668.
- 88 Trieu M-C, Zhou F, Lartey SL, Sridhar S, Mjaaland S, Cox RJ. Augmented CD4+ T-cell and humoral responses after repeated annual influenza vaccination with the same vaccine component A/H1N1pdm09 over 5 years. *NPJ Vaccines*. (2018) 3:37. doi:10.1038/s41541-018-0069-1.
- 89 Sales NS, Silva JR, Aps LRMM, et al. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8+ T cells. *Vaccine*. (2017) 35(52):7240-7249. doi:10.1016/j.vaccine.2017.11.011.
- 90 Flaxman A, Ewer KJ. Methods for Measuring T-Cell Memory to Vaccination: From Mouse to Man. *Vaccines (Basel)*. (2018) 6(3). doi:10.3390/vaccines6030043.

- 91 Black A, Bhaumik S, Kirkman RL, Weaver CT, Randolph DA. Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates. *Eur. J. Immunol.* (2012) 42(2):311-319. doi:10.1002/eji.201141847.
- 92 Rudolph ME, McArthur MA, Barnes RS, Magder LS, Chen WH, Sztein MB. Differences Between Pediatric and Adult T Cell Responses to In Vitro Staphylococcal Enterotoxin B Stimulation. *Front Immunol.* (2018) 9:498. doi:10.3389/fimmu.2018.00498.
- 93 Lelic A, Verschoor CP, Ventresca M, et al. The polyfunctionality of human memory CD8+ T cells elicited by acute and chronic virus infections is not influenced by age. *PLoS Pathog.* (2012) 8(12):e1003076. doi:10.1371/journal.ppat.1003076.
- 94 MacLennan IC, Bazin H, Chassoux D, Gray D, Lortan J. Comparative analysis of the development of B cells in marginal zones and follicles. *Adv Exp Med Biol.* (1985) 186:139-144. doi:10.1007/978-1-4613-2463-8\_17.
- 95 Chen G, Lustig A, Weng N-P. T cell aging: A review of the transcriptional changes determined from genome-wide analysis. *Front Immunol.* (2013) 4:121. doi:10.3389/fimmu.2013.00121.
- 96 Nikolich-Zugich J. T cell aging: Naive but not young. *J Exp Med.* (2005) 201(6):837-840. doi:10.1084/jem.20050341.
- 97 Buzatto GP, Tamashiro E, Proenca-Modena JL, et al. The pathogens profile in children with otitis media with effusion and adenoid hypertrophy. *PLoS ONE.* (2017) 12(2): e0171049. doi:10.1371/journal.pone.0171049.
- 98 Rusetskii YY, Latysheva EN, Spiranskaya OA, Pashkova AE, Malyavina US. Immunologicheskie posledstviia i riski adenotomii. *Vestn Otorinolaringol.* (2018) 83(2):73-76. doi:10.17116/otorino201883273-76.
- 99 Georgalas C, Thomas K, Owens C, Abramovich S, Lack G. Medical treatment for rhinosinusitis associated with adenoidal hypertrophy in children: An evaluation of clinical response and changes on magnetic resonance imaging. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* (2005) 114(8):638-644. doi:10.1177/000348940511400810.

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Allen Eltern, die zugestimmt haben, ihre Kinder an der Studie teilnehmen zu lassen, bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet.

Besonderer Dank gilt:

Frau Professor Dr. rer. nat. Monika Brunner-Weinzierl und Herrn Professor Dr. med. Gerhard Jorch für die Vergabe dieses interessanten Themas, der Bereitstellung der experimentellen Voraussetzungen sowie der kritischen Durchsicht meines Manuskripts. Herrn Professor Dr. med. Christoph Arens, mit dessen Unterstützung eine Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde etabliert werden konnte.

Frau Dr. rer. nat. Katrin Hebel und Frau Dr. rer. nat. Mandy Pierau für die unermüdliche Unterstützung, die Hilfestellung beim Aufbau der Experimente und ihre unendliche Geduld und Motivation.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Pädiatrie und Neonatologie für die technische Einarbeitung, die stetige Unterstützung und die liebevolle Aufnahme ins Team.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, unter deren Aufsicht und Supervision ich die Aufklärungsgespräche mit den Eltern der Patienten führen durfte und die sicher gestellt haben, dass mir die Proben auf sicherem Wege übermittelt wurden.

Insbesondere danke ich auch meiner Familie, welche mir mein Studium und damit auch die hier vorliegende Arbeit erst ermöglicht und mich während der gesamten Zeit durch ihre Fürsorge und ihren Beistand unterstützt haben.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Der Einfluss von Alter und Infektionen auf die  
Differenzierung von T-Zellen bei Kindern“**

in der OVG-Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung für Experimentelle Pädiatrie und Neonatologie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Berlin, den 14.02.2022

Unterschrift