

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
Klinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin
Labor für Experimentelle Feto-Maternale Medizin

Direktor der Einrichtung
Prof. Dr. med. K. Hecher

Der Einfluss des Fms-like tyrosine kinase 3-Liganden (Flt3L) im mütterlichen Blut in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut auf die Reife des kindlichen Immunsystems zum Zeitpunkt der Geburt.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Franziska Jahn
aus Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.05.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Petra Arck

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Die Entwicklung des kindlichen Immunsystems – ein sensibler Prozess von seinen Anfängen bis über die Geburt hinaus	5
1.2 Die Genese des kindlichen Immunsystems und seine Besonderheiten	6
1.3 Die hämatopoetische Stammzelle – Grundstein des Immunsystems	8
1.4 Die regulatorische T-Zelle – Stellschraube zwischen Toleranz und Abwehr	10
1.5 Der Flt3-Ligand und sein Rezeptor.....	11
1.6 Einflussreiche Schwangerschaft – programmierte Gesundheit	14
1.7 Zielsetzungen	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Rekrutierung von Studienteilnehmerinnen.....	18
2.2 Studienablauf	18
2.3 Methoden	19
2.4 Statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	29
3.1 Studienpopulation.....	29
3.2 Der Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand (Flt3L) in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut	33
3.3 Der Einfluss des Flt3L im Nabelschnurblut auf die Reife des kindlichen Immunsystems	37
3.4 Der Einfluss des mütterlichen Flt3L in der Schwangerschaft auf die Reife des kindlichen Immunsystems	47
3.5 Die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und die Reife des kindlichen Immunsystems in Abhängigkeit von Gestationsalter und kindlichem Ponderalindex	54
3.6 Der Einfluss mütterlicher Faktoren auf den Flt3L und die Reife des kindlichen Immunsystems	58
4. Diskussion	70

5. Zusammenfassung/Summary	81
6. Abkürzungsverzeichnis	85
7. Literaturverzeichnis	87
8. Danksagung	102
9. Lebenslauf	103
10. Eidesstattliche Versicherung	104

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung des kindlichen Immunsystems – ein sensibler Prozess von seinen Anfängen bis über die Geburt hinaus

Bereits in der Schwangerschaft werden die Weichen für ein gesundes kindliches Immunsystem gestellt. Exogene und endogene Faktoren, die Einfluss auf die werdende Mutter ausüben, können bereits zu diesem frühen Zeitpunkt im Leben des Kindes das Risiko für diverse Erkrankungen im späteren Leben erhöhen (Chung et al. 2007, Gluckman et al. 2008). So erklärt sich beispielsweise auch die steigende Prävalenz atopischer und autoimmuner Erkrankungen (EURODIAB ACE Study Group 2000, Bach 2002, Asher et al. 2006, Schmitz et al. 2014) nicht allein durch eine genetische Prädisposition (Hinz et al. 2012, Peters et al. 2012). Auch Umweltfaktoren und deren epigenetische Effekte beeinflussen die Entwicklung des kindlichen Immunsystems und die Entstehung dieser Erkrankungen (Chung et al. 2007, Metsala et al. 2008, Szyf 2009, Martino 2011). Die mütterliche Exposition gegenüber Tabakrauch (Metsala et al. 2008, Hinz et al. 2012), Mikroben (McKeever et al. 2002, Schaub et al. 2009) und Allergenen (Hagendorens et al. 2004, Peters et al. 2012), die mütterliche Ernährung (Chatzi et al. 2008, Palmer 2011) sowie die Stressbelastung während der Schwangerschaft (Sausenthaler et al. 2009, Peters et al. 2012, Hartwig et al. 2014) gelten unter anderem als solche Umweltfaktoren, die das Risiko für Allergien und atopische Erkrankungen erhöhen. Bereits im Nabelschnurblut des Neugeborenen kann sich dieses Risiko beispielsweise in der Zusammensetzung, der unterschiedlichen Ausdifferenzierung und Funktionalität der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen und der regulatorischen T-Zellen abzeichnen (Upham et al. 1999, Haddeland et al. 2005, Fernandes et al. 2008, Hinz et al. 2012). Reguliert wird die Hämatopoese und damit auch die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen durch den Wachstumsfaktor Flt3L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand) und seinen Rezeptor (Small et al. 1994, Weisel et al. 2009). Beide greifen außerdem über die dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen in die Immunantwort ein (Karsunky et al. 2003, Swee et al. 2009, Klein et al. 2013). Durch seine Regulationsmöglichkeit scheint der Flt3L und sein Rezeptors ebenfalls eine Rolle für die Pathogenese und den Verlauf allergischer und atopischer Erkrankungen zu spielen, wie Studien zum therapeutischen Einsatz beider Faktoren erahnen lassen (Agrawal et al. 2001, Edwan et al. 2005). Inwieweit der Flt3L in der Schwangerschaft bereits Hinweise auf das Zellprofil des Nabelschnurblutes offenbart

und damit einen Ausblick auf das Risiko für die Entstehung von allergischen und atopischen Erkrankungen bietet, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Darauf aufbauend schließen sich die Betrachtungen denkbarer Einflussfaktoren auf den Flt3L an. Vorerst sollen nun jedoch die Entwicklung und Besonderheiten des kindlichen Immunsystems nachvollzogen und zwei wichtige Bestandteile dessen – die hämatopoetischen Stammzellen und die regulatorischen T-Zellen – näher beleuchtet werden, um den Ausgangspunkt für alle weiteren Zusammenhänge zu verdeutlichen.

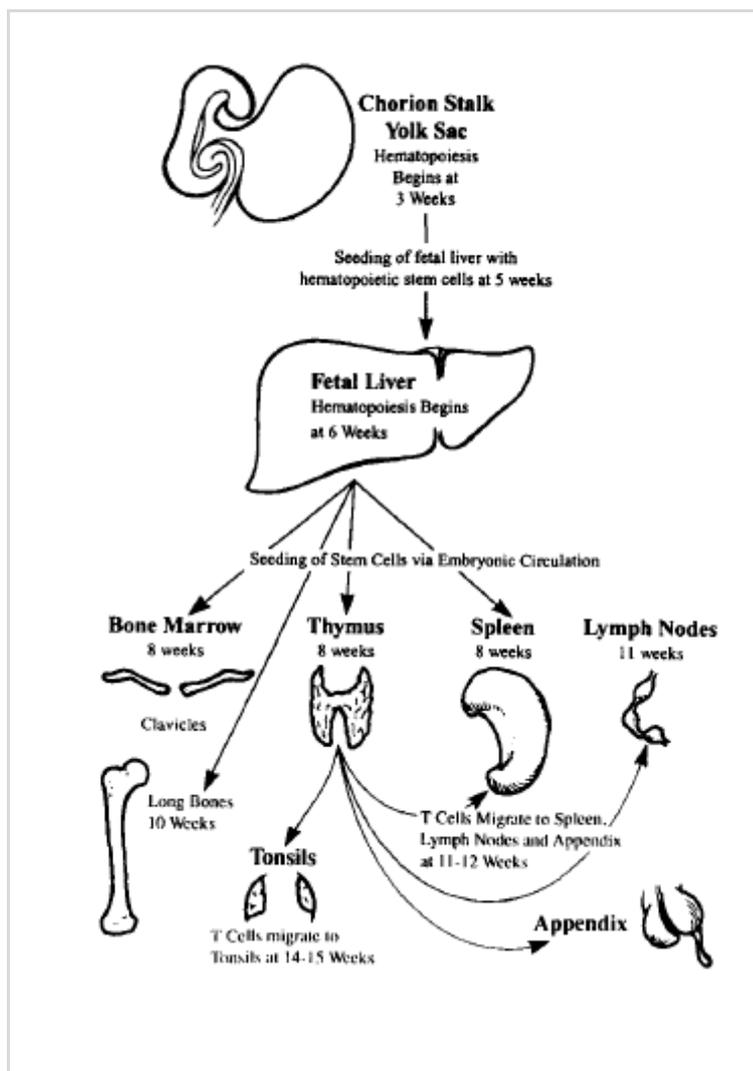


Abbildung 1 Zeitlicher Verlauf der Besiedelung fetaler Organe durch Immunzellen in der physiologischen Entwicklung (Stamatoyannopoulos et al. 2001).

1.2 Die Genese des kindlichen Immunsystems und seine Besonderheiten

Die Hämatopoese

Ausgangspunkt für die Entwicklung des humanen Immunsystems ist der Beginn der Hämatopoese. Findet anfangs die Blutbildung noch durch sogenannte *Blutinseln* des Dottersacks statt (Bloom und Bartelmez 1940), so zeigen sich bereits in der 5.

Schwangerschaftswoche (SSW) erste hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellkolonien im Endothel der dorsalen Aorta (Tavian et al. 1996, Tavian et al. 2001). Mit der Besiedelung der Leber durch diese

Stammzellen ab der 5. SSW (Tavian et al. 1999) wird der Grundstein für die spätere Hämatopoese gelegt (Marshall et al. 1999, Tavian et al. 2001). Die Leber entwickelt sich vorübergehend zum wichtigsten hämatopoetischen Organ des Fetus und löst damit den Dottersack in dieser Funktion ab (Migliaccio et al. 1986). Die in der Leber

entstehenden hämatopoetischen Stammzellen besiedeln im Verlauf die embryonalen Anlagen des Thymus (Haynes und Heinly 1995) und der Milz sowie das Knochenmark, wo sich schließlich zwischen der 10. und 15. SSW die Hämatopoese zu etablieren beginnt (Charbord et al. 1996). Hiervon ausgehend erfolgt nun die Weiterentwicklung und Ausreifung der späteren hämatopoetischen und lymphatischen Organe (Cumano und Godin 2007). Abbildung 1 skizziert den zeitlichen Verlauf dieser Entwicklung.

Die Entwicklung des T-Zell-Pools

Zwischen der 7. und 8. SSW wird die embryonale Anlage des Thymusepithels von hämatopoetischen Stammzellen besiedelt (Haynes und Heinly 1995, Res und Spits 1999). Dies stellt den Ausgangspunkt für die weitere T-Zell-Differenzierung dar. Bereits ab der 8. SSW lassen sich erste reife T-Zellen nachweisen (Haynes und Heinly 1995). Ab der 14. SSW zeigen sich regulatorische T-Zellen (Sakaguchi et al. 2010), die ab diesem Zeitpunkt die fetalen Organe besiedeln. Mit der 20. SSW ist die Organogenese des Thymus abgeschlossen. Darauf folgt ein starkes Größenwachstum (Haynes und Hale 1998) und das T-Zellrepertoire erweitert sich. Im Verlauf erfolgt im Thymus die Selektion der T-Zellen. Zum einen sorgt die positive Selektion unreifer doppelt positiver CD4CD8-Zellen dafür, dass T-Zellen nur weiter zu einfach positiven CD4- oder CD8-Zellen ausreifen können, wenn sie in der Lage sind, Selbst-MHC-Moleküle zu erkennen (Cantani 2008, Murphy et al. 2009). Zum anderen wird durch negative Selektion eine ausreichende Selbsttoleranz gewährleistet, indem stark autoreaktive T-Zellen in die Apoptose geleitet werden (Cantani 2008, Murphy et al. 2009). Auf den Selektionsprozess folgt schließlich die Emigration der naiven T-Zellen in das Blut und damit die Etablierung des peripheren T-Zell-Pools (Haynes und Hale 1998, Murphy et al. 2009, Sakaguchi et al. 2010).

Physiologische Besonderheiten des kindlichen Immunsystems

Auch wenn die Entwicklung des kindlichen Immunsystems schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft beginnt, ist dieser Prozess weder mit der Geburt des Kindes abgeschlossen noch erreicht das Immunsystem zu diesem Zeitpunkt die Funktionalität des adulten (Adkins et al. 2004, Levy 2007, Ygberg und Nilsson 2012, Speer und Gahr 2013). Vermindert funktionsfähige Immunzellen und

eine eingeschränkte Immunantwort kennzeichnen das Immunsystem des Neugeborenen, wodurch eine nur unzureichende Abwehr von Infektionen bedingt ist (Adkins et al. 2004, Ygberg und Nilsson 2012, Speer und Gahr 2013). Abhängig vom Zelltyp äußert sich diese Beeinträchtigung beispielsweise in verminderter Zytokinproduktion, reduzierter Zytotoxizität oder verringerter Mitogenstimulierbarkeit (Adkins et al. 2004, Levy 2007, Schaub et al. 2008b, Ygberg und Nilsson 2012, Speer und Gahr 2013). Nabelschnurblutanalysen geben bereits unmittelbar nach der Geburt Auskunft über die Reife des kindlichen Immunsystems (Basford et al. 2010, D'Alessio et al. 2011).

Mit dem Austritt aus der mütterlichen Umgebung im Rahmen der Geburt steht das Immunsystem des Kindes nun vor der Aufgabe weiter auszureifen. Es muss sich der gegenüber dem intrauterinen Milieu äußerst nuancenreichen Keimbeseidlung der neuen Umwelt stellen, um so im Jugendalter schließlich seine volle Funktionsfähigkeit erreichen zu können (Levy 2007, Ygberg und Nilsson 2012, Speer und Gahr 2013, Agaard et al. 2014).

1.3 Die hämatopoetische Stammzelle – Grundstein des Immunsystems

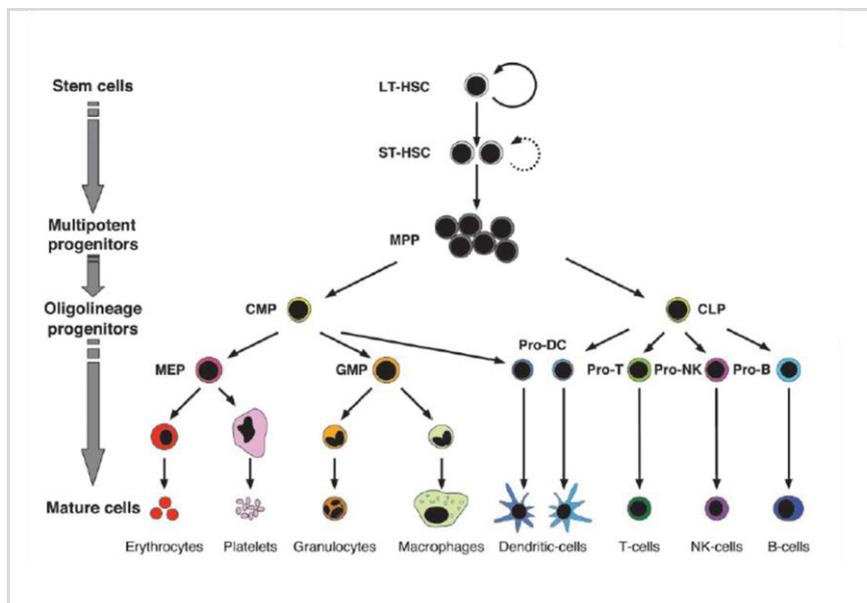


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Hämatopoese nach (Passegué et al. 2003).

Die hämatopoetischen Stammzellen bilden den Ausgangspunkt für die Entstehung aller Blut- und Immunzellen (McCulloch 1983).

Sie zeichnen sich gegenüber den übrigen Zellen durch ihre Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Differenzierung aus (Ogawa et al. 1983,

Aumüller et al. 2010). Aus den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gehen fortdauernd neue Zellen dieser Art hervor, die im Verlauf in der lymphatischen oder myeloischen Reihe weiter ausdifferenzieren (McCulloch 1983). Wie Abbildung 2 veranschaulicht, geschieht dies über Vorläuferzellen, die sich in ihrer

Ausdifferenzierung und damit ihrem Differenzierungspotenzial unterscheiden (Passegué et al. 2003). Über primitive oligopotente Progenitorzellen entwickeln sich schließlich die reifen Zellen (Ogawa et al. 1983, Dexter und Spooncer 1987, Aumüller et al. 2010).

Das sensible Gleichgewicht der Hämatopoese wird durch Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, Chemokine und die jeweiligen Rezeptoren reguliert (Dexter und Spooncer 1987, Broxmeyer 2008, Aumüller et al. 2010). Eine wichtige Rolle für diese Regulation spielen hierbei der Wachstumsfaktor Flt3L und sein Rezeptor (Small et al. 1994). Sie werden in Abschnitt 1.4 ausführlich besprochen. Wird das hämatopoetische Gleichgewicht aus Zellerneuerung, Differenzierung und Zelltod in besonderem Ausmaß gestört, können daraus hämatologische Erkrankungen wie beispielsweise Leukämien resultieren (McCulloch 1983, Parcells et al. 2006).

Die hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut - Spiegel des kindlichen Immunsystems

Hämatopoetische Stammzellen sind nicht nur im Knochenmark zu finden, sondern auch als mobilisierte Zellen im peripheren Blut (Barr et al. 1975). Das Nabelschnurblut eines Neugeborenen beinhaltet eine große Menge hämatopoetischer Stammzellen, was unter anderem dessen Wichtigkeit für Stammzelltransplantationen unterstreicht (Broxmeyer et al. 1989, Broxmeyer et al. 1992). Doch nicht nur für die Diagnostik und Therapie hämatologischer Erkrankungen ist das Nabelschnurblut von Bedeutung. Anhand diverser in unterschiedlichem Ausmaß exprimierter Oberflächenmoleküle geben die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen Auskunft über ihren Reife- und Differenzierungsgrad. Oberflächenproteine wie CD34, CD133 und CD38 ermöglichen es, den Differenzierungsgrad der Zellen zu unterscheiden und Stamm- von Progenitorzellen und reifen Zellen abzugrenzen (Haddad 2004, Basford et al. 2010, D'Alessio et al. 2011, Takahashi et al. 2014). Mithilfe des Nabelschnurblutes ist es möglich, die Reife des Kindes hinsichtlich der körperlichen Entwicklung und des hämatopoetischen Systems zu charakterisieren und somit auch die Reife des kindlichen Immunsystems zu beurteilen (Ballen et al. 2001, Aroviita et al. 2004, Bizzarro et al. 2007, Rong-Hwa et al. 2008, D'Alessio et al. 2011, Wen et al. 2012). Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt können so beispielsweise anhand der Variabilität

des Nabelschnurblutprofils prognostische Aussagen bezüglich des Risikos, eine respiratorische oder atopische Erkrankung zu entwickeln, getroffen werden (Upham et al. 1999, Fernandes et al. 2008).

Beeinflusst wird die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes hinsichtlich hämatopoetischer Stammzellen zum Beispiel durch mütterliche Eigenschaften wie die Veranlagung für atopische Erkrankungen oder Variablen wie vorausgegangene Schwangerschaften oder der Geburtsmodus (Rong-Hwa et al. 2008, Reece et al. 2011).

1.4 Die regulatorische T-Zelle – Stellschraube zwischen Toleranz und Abwehr

Regulatorische T-Zellen sind durch ihre suppressive Aktivität an der Kontrolle der Immunantwort beteiligt. Sie sorgen für die Toleranz des Immunsystems gegenüber eigenen und fremden Antigenen (Murphy et al. 2009, Schmetterer et al. 2012). Kommt es zur Störung dieser regulativen Funktion, können daraus unter anderem Autoimmunerkrankungen, atopische Erkrankungen und Allergien resultieren (Murphy et al. 2009, Sakaguchi et al. 2010). In der Schwangerschaft sind die regulatorischen T-Zellen für die gegenseitige Toleranz des mütterlichen und fetalen Immunsystems überlebenswichtig (Aluvihare et al. 2004).

Bei den regulatorischen T-Zellen handelt es sich um eine heterogene Subpopulation (Murphy et al. 2009). Die Zellen finden sich im peripheren Blut sowie im Nabelschnurblut und werden durch Oberflächenmoleküle wie CD25, die sie in hohem Maße exprimieren, CD4 und CD45RA von anderen T-Zellen abgegrenzt und in verschiedene Reifegrade unterteilt (Clement et al. 1990, Jonuleit et al. 2001, Baecher-Allan et al. 2001, Murphy et al. 2009, Schmetterer et al. 2012). Die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen lässt sich über den Transkriptionsfaktor FoxP3, der ein spezifischer Marker dieser Zellen ist, abschätzen (Fontenot et al. 2005, Godfrey 2005, Murphy et al. 2009).

Die regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut – Wie gesund wird das Kind?

Nicht allein die hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut eignen sich, um die Reife des kindlichen Immunsystems zu beurteilen. Die regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut spiegeln ebenfalls den Entwicklungsstand des Kindes und damit

auch des kindlichen Immunsystems wider (Clement et al. 1990, Steinborn et al. 2010, Mukhopadhyay et al. 2014). Darüber hinaus ist es mit ihrer Hilfe möglich, eine Aussage über das Risiko für die Entwicklung einer atopischen oder allergischen Erkrankung zu treffen (Hagendorens et al. 2004, Haddeland et al. 2005, Smith et al. 2008, Hinz et al. 2012). Umwelteinflüsse, mütterliche Atopie und der mütterliche Immunstatus in der Schwangerschaft wirken auch hier mitbestimmend auf das Reifeprofil und die Funktionalität der Zellen im Nabelschnurblut (Hagendorens et al. 2004, Schaub et al. 2008a, Schaub et al. 2009, Hinz et al. 2012).

1.5 Der Flt3-Ligand und sein Rezeptor

Der Flt3-Ligand

Der Flt3L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand) ist ein Wachstumsfaktor, der über den Tyrosin-Kinase-Rezeptor CD135 (auch Flk-2, STK-1) die Proliferation von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen reguliert (Lyman et al. 1993, Lyman et al. 1994, Hannum et al. 1994). Er tritt als Homodimer auf und ähnelt in Größe und Struktur den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren CSF-1 und SCF, die ebenfalls zu den Transmembranproteinen vom Typ 1 gezählt werden (Lyman et al. 1993, Hannum et al. 1994). Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form des Flt3L zeigen biologische Aktivität (Lyman et al. 1993, Lyman et al. 1994, Hannum et al. 1994).

Der Flt3L verbessert die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Stamm- und primitive Vorläuferzellen und sorgt so für eine bessere Zellproliferation und eine erhöhte Gesamtzellzahl (Nakamori et al. 2012). Er nimmt – mit Ausnahme der erythroiden - Einfluss auf die Generierung aller myeloiden Zelllinien (Hannum et al. 1994, Nakamori et al. 2012). Außerdem besitzt der Flt3L einen wichtigen Stellenwert in der T-Zell-Entwicklung (Hannum et al. 1994). Für die Generierung früher NK und B-Zellstadien aus hämatopoetischen Progenitorzellen und als Wachstumsfaktor für dendritische Zellen ist der Ligand ebenfalls von Bedeutung (Maraskovsky et al. 1996, Tobón et al. 2010, Nakamori et al. 2012). Vermittelt durch die dendritischen Zellen sorgt der Flt3L außerdem für eine Vermehrung regulatorischer T-Zellen (Klein et al. 2013). Es ist offensichtlich, dass der Flt3L an vielen Punkten für die Entwicklung und Funktionalität des Immunsystems essenziell ist, weshalb seine Rolle in der Schwangerschaft in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll.

Der Flt3-Rezeptor

Der Rezeptor für den Flt3L, CD135, zählt ebenso wie die Rezeptoren für CSF-1 und SCF (Ullrich und Schlessinger 1990), denen er strukturell ähnelt (Rosnet et al. 1993), zu den Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der Klasse 3 (Rosnet et al. 1991, Matthews et al. 1991, Rosnet et al. 1993, Small et al. 1994, Murphy et al. 2009). Das Gen für den humanen Flt3-Rezeptor liegt auf dem Chromosomenabschnitt 13q12 (Rosnet et al. 1991). Zur Expression kommt es vor allem auf Stamm- und Progenitorzellen des hämatopoetischen Systems (Matthews et al. 1991, Small et al. 1994, Rappold et al. 1997, Murphy et al. 2009). Seine funktionelle Bedeutung liegt vor allem in der Regulation der Hämatopoese. Er beeinflusst die Proliferation und das Wachstum früher hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (Small et al. 1994, Mackarehtschian et al. 1995, Weisel et al. 2009).

Die Bedeutung des Flt3L und seines Rezeptors für Erkrankungen des Immunsystems

Eine Fehlregulierung durch den Flt3L und seinen Rezeptor kann die Entstehung hämatologischer Erkrankungen zur Folge haben. Eine erhöhte Expression des Flt3-Rezeptors wurde bei verschiedenen Leukämieformen nachgewiesen (Birg et al. 1992, Rosnet et al. 1993). Bei Patienten mit Fanconi-Anämie und erworbener aplastischer Anämie zeigten sich massiv erhöhte Flt3L-Serumkonzentrationen (Lyman et al. 1995).

Neben onkologischen Krankheitsbildern ist dem Flt3L auch bei allergischen und Autoimmunerkrankungen eine klinische Bedeutung beizumessen, weshalb er vermehrt in den Fokus der Forschung rückt. Das Sjögren-Syndrom, eine Autoimmunerkrankung, die sich an Tränen- und Speicheldrüsen manifestiert, geht beispielsweise mit erhöhten Serum-Flt3L Levels einher. Seine Krankheitsaktivität und das Risiko für eine Lymphomentwicklung werden durch die Flt3L Level beeinflusst (Tobón et al. 2010). In der Therapie von Autoimmunerkrankungen gilt der Flt3-Rezeptor als möglicher Ansatzpunkt für eine immunsuppressive Therapie (Whartenby et al. 2005). Im Mausmodell zeigte sich bei einer Behandlung mit Flt3L ein stadienabhängiger Einfluss auf den Krankheitsverlauf eines autoimmunassoziierten Diabetes mellitus Typ-1 (van Belle et al. 2010). In der

Therapie des allergischen Asthmas zeigte sich ebenfalls im Mausmodell durch die Behandlung mit dem Flt3L beziehungsweise mit einem das humane Flt3L-Gen enthaltende Plasmid ein positiver präventiver und therapeutischer Effekt (Agrawal et al. 2001, Edwan et al. 2005). Inwieweit der Flt3L als prognostischer Marker für die Entwicklung von atopischen, allergischen oder autoimmunen Erkrankungen geeignet ist, bleibt von Interesse. Erste Betrachtungen zu dieser Fragestellung werden in der vorliegenden Arbeit angestellt.

Der Flt3L und sein Rezeptor bei Mutter und Kind

Obgleich die Analysen von Nabelschnurblut und damit die Betrachtung des Flt3L im Hinblick auf Stammzelltransplantationen und hämatoonkologische Fragestellungen einen großen Raum in der Forschung einnehmen, ist wenig bekannt über den Einfluss des Flt3L auf die Reife des kindlichen Immunsystems im Verlauf der Schwangerschaft und zum Zeitpunkt der Geburt. Wenige Studien haben sich mit mütterlichem und kindlichem Flt3L und dessen Rezeptor beschäftigt (Malamitsi-Puchner et al. 2005, Gonzalez et al. 2009). Malamitsi-Puchner et al. beschrieben beispielsweise einen Zusammenhang zwischen mütterlichen Flt3-Level kurz vor der Entbindung, jenen im Nabelschnurblut und den entsprechenden Level des Neurotrophin-3 (NT-3), einem Faktor, dem neben seinem Einfluss auf die Hirnentwicklung auch eine Beteiligung an immunologischen Reaktionen zugesprochen wird (Malamitsi-Puchner et al. 2005). Ein Zusammenhang mit dem Geschlecht, dem Gestationsalter oder dem Geburtsmodus und den genannten Faktoren konnte die Arbeitsgruppe jedoch nicht darstellen (Malamitsi-Puchner et al. 2005). In den von Gonzales et al. dokumentierten Versuchen fanden sich im Plasma des Nabelschnurblutes termingeborener Kinder um ein Vielfaches höhere Konzentrationen des Flt3L als im mütterlichen Plasma (Gonzalez et al. 2009). Die Versuche der Wissenschaftler zeigten auch, dass die Konzentrationen des Flt3L im Nabelschnurblut frühgeborener Kinder höher waren als jene bei termingerecht geborenen Kindern (Gonzalez et al. 2009). Im neonatalen Mausmodell konnte durch die Behandlung mit Flt3L ein positiver Effekt auf die Immunantwort und damit das Langzeitüberleben nach einer Infektion induziert werden (Vollstedt et al. 2003). Ob jedoch bereits in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut anhand des Flt3L eine Aussage über die Reife des kindlichen Immunsystems getroffen werden kann

und welche Einflussfaktoren diesbezüglich eine Rolle spielen, wurde noch nicht untersucht. Dies wird deshalb im Fokus dieser Arbeit stehen.

1.6 Einflussreiche Schwangerschaft – programmierte Gesundheit

Die Entwicklung des kindlichen Immunsystems ist ein über die gesamte Schwangerschaft andauernder und noch darüber hinausreichender Prozess (Ygberg und Nilsson 2012). Während dieser Zeit bietet sich Einflussfaktoren eine breite Angriffsfläche, die die spätere Gesundheit des Kindes im Sinne einer *fetalen Programmierung* modulieren, was zunächst im Zusammenhang mit der Entstehung eines Diabetes mellitus (Hales und Barker 1992) und einer Adipositas (Whitaker und Dietz 1998) diskutiert wurde. Mütterliches Alter, mütterliches Gewicht und Stress während der Schwangerschaft sind ebensolche Faktoren, die nicht nur im Hinblick auf den Schwangerschaftserfolg eine intensivere Betrachtung sinnvoll machen (Nohr et al. 2008, Nakamura et al. 2008, Chantrapanichkul und Chawanpaiboon 2013). Auch in der Diskussion um mögliche Risikokonstellationen bezüglich der Entwicklung des kindlichen Immunsystems erfordern sie eine tiefer gehende Untersuchung. In den Betrachtungen der vorliegenden Arbeit werden sie deshalb ebenfalls Beachtung finden.

Zu jung, zu alt – Risikofaktor mütterliches Alter?

In den Diskussionen um Risikoschwangerschaften ist das mütterliche Alter omnipräsent. Sowohl ein extrem niedriges als auch ein hohes mütterliches Alter stellen ein erhöhtes Risiko für Schwangerschaftserkrankungen und –komplikationen, Frühgeburtlichkeit und intrauterine Wachstumsrestriktion dar (Alshami et al. 2011, Chantrapanichkul und Chawanpaiboon 2013, Xiaoli und Weiyuan 2014). Dass ein erhöhtes mütterliches Alter ebenso das Auftreten von genetischen Defekten bedingen kann, ist bekannt (Schaaf und Zschocke 2013). Auch im Hinblick auf das kindliche Immunsystem zeigt sich der Einfluss des mütterlichen Alters. So kann sowohl ein sehr niedriges als auch ein hohes mütterliches Alter das Risiko für Symptome kindlicher Atemwegsobstruktion und Asthma erhöhen (Sherriff et al. 2001, Dik et al. 2004).

Ob sich der Einfluss des mütterlichen Alters darüber hinaus auch in Bezug auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems zeigt und in den Flt3L-Konzentrationen in

der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut widerspiegelt, wird ebenfalls in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Zuviel des Guten – Risikofaktor Gewicht?

Die Einflüsse des mütterlichen Gewichts und der mütterlichen Gewichtszunahme auf den Schwangerschaftsverlauf und –erfolg wurden in zahlreichen Studien untersucht (Nohr et al. 2008, Gaillard et al. 2013, Ferrari et al. 2014). Doch nicht nur im Hinblick auf das unmittelbare Schwangerschaftsergebnis, sondern auch in Bezug auf die weitere gesundheitliche Entwicklung des Kindes, kommt dem mütterlichen Gewicht und der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft eine große Bedeutung zu. Übergewicht und eine exzessive Gewichtszunahme erhöhen beispielsweise nicht nur das Risiko für das Kind, selbst an Übergewicht und einem metabolischen Syndrom zu leiden (Boney 2005, Gaillard et al. 2013). Auch die Entwicklung kindlichen Asthmas und anderer Atemwegserkrankungen im Kindesalter wird dadurch begünstigt (Håberg et al. 2009, Kumar et al. 2010, Lowe et al. 2011, Harpsøe et al. 2013, Ekström et al. 2014).

Die Frage, inwieweit sich ein Einfluss des mütterlichen Gewichts auf das kindliche Immunsystem bereits im Nabelschnurblut nachvollziehen lässt, bleibt derzeit noch unbeantwortet und wird ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein.

Stress in der Schwangerschaft – Gestresste Mutter, gestresstes Kind?

Die Wurzeln der Stressforschung liegen in der wissenschaftlichen Arbeit von H. Selye. Dieser untersuchte bereits im Jahr 1936 Stress als Reaktion eines Organismus auf schädliche Substanzen oder Stimuli, den sogenannten *Stressoren* (Selye 1998).

In der Schwangerschaft betreffen diese Stressoren gleichsam zwei Organismen. Während dieser Zeit befindet sich das mütterliche Immunsystem in einem empfindlichen Gleichgewicht, um den Fetus immunologisch tolerieren zu können (Reinhard et al. 1998, Arck und Hecher 2013, Arck et al. 2014). Diese Balance kann durch Stress beeinflusst werden und sich nicht nur auf den Schwangerschaftserfolg, sondern durch fetale Programmierung auch auf die spätere Gesundheit des Neugeborenen auswirken (Knackstedt et al. 2005, Arck et al. 2007, Nakamura et al. 2008, Parker und Douglas 2010, Solano et al. 2011). Pränataler Stress begünstigt so

zum Beispiel die Entstehung von Asthma und anderen atopischen Erkrankungen (von Hertzen 2002, Sausenthaler et al. 2009, Hartwig et al. 2014).

Doch nicht erst im Säuglings- oder Kleinkindalter, wenn sich Allergien und atopische Erkrankungen erstmals manifestieren, zeigt sich dieser Einfluss von pränatalem Stress. Bereits im Nabelschnurblut können diesbezüglich Veränderungen nachgewiesen werden. So ließen sich bei hohem mütterlichen pränatalen Stress beispielsweise erhöhte Immunglobulin-E(IgE)-Konzentrationen im Nabelschnurblut messen, was mit einem erhöhten Risiko für atopische Erkrankungen assoziiert sein kann (Ferguson et al. 2009, Peters et al. 2012). Auch zeigten sich bei pränatalem Stress veränderte Zytokinantworten im Nabelschnurblut, welche ebenfalls das Risiko für die Entstehung allergischer Erkrankungen beeinflussen können (Wright et al. 2010).

Inwieweit sich der Einfluss des pränatalen Stresses in den Flt3L-Konzentrationen und in Zellsubpopulationen im Nabelschnurblut widerspiegelt, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.7 Zielsetzungen

Die vorliegende Arbeit erforscht den Einfluss des Flt3L auf die Reife des kindlichen Immunsystems.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, werden folgende Unterpunkte beleuchtet:

- der Zusammenhang des mütterlichen Flt3L während der Schwangerschaft und des kindlichen Flt3L im Nabelschnurblut
- der Zusammenhang des Flt3L im Nabelschnurblut mit der Reife der hämatopoetischen Stammzellen und regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut
- der Einfluss des mütterlichen Flt3L in der Schwangerschaft auf die Zellpopulationen im Nabelschnurblut

Darüber hinaus werden folgende Faktoren im Hinblick auf ihren Einfluss auf den Flt3L und das kindliche Immunsystem untersucht:

- das Gestationsalter

- der kindliche Ponderalindex
- die mütterliche Gewichtszunahme in der Schwangerschaft
- das mütterliche Alter
- der mütterliche Stress während der Schwangerschaft

Anhand der untersuchten Punkte wird weiterführend die Frage diskutiert, inwieweit bereits anhand des Flt3L in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut Aussagen über das Risiko, später Allergien oder Asthma zu entwickeln, getroffen werden können und ob sich daraus ein möglicher prädiktiver Wert des Flt3L im Hinblick auf die beschriebene Problematik ergeben kann.

2. Material und Methoden

2.1 Rekrutierung von Studienteilnehmerinnen

Die Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen erfolgte im Rahmen der ‚Prince-Studie‘ (Prince – Prenatal Identification of Children´s Health), die in Zusammenarbeit zwischen der Klinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin mit dem Labor für Experimentelle Feto-Maternale Medizin am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg seit dem Jahre 2011 durchgeführt wird. In die Studienpopulation dieser Arbeit wurden jene Teilnehmerinnen der ‚Prince-Studie‘ - mitsamt ihren Neugeborenen - eingeschlossen, die im Zeitraum Januar bis Oktober 2012 am UKE entbunden haben.

Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. Die Teilnehmerinnen wurden über den Studienablauf aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Ein positives Ethikvotum lag vor. Die erforderlichen Daten wurden in pseudonymisierter Form erhoben und ausgewertet. Es wurden ausschließlich nichtrauchende Frauen mit Einlingsschwangerschaften rekrutiert. Minderjährige Schwangere, Schwangerschaften als Resultat einer künstlichen Befruchtung und Frauen mit bekannten Infektionen (HIV, HBV etc.) waren von der Studie ausgenommen.

2.2 Studienablauf

An drei Untersuchungszeitpunkten - um die 14., 24. und 36. SSW – wurden bei den Teilnehmerinnen jeweils 7,5 ml Blut in eine *Sarstedt Monovette® Serum-Gel* entnommen. Aus diesem erfolgte innerhalb von zwei Stunden die Gewinnung von Serum, in welchem zu einem späteren Zeitpunkt die Flt3L-Serumkonzentrationen mittels ELISA bestimmt wurden. Zusätzlich wurde an diesen drei Zeitpunkten der von den Probandinnen in der Schwangerschaft erlebte Stress mit Hilfe des Stress-CAT-Fragebogens erhoben. Am ersten Untersuchungstermin wurden zudem soziodemographische, schwangerschafts- und allgemeinanamnestische Daten mittels Fragebögen erfasst. Diese Daten sind den Tabellen zur Beschreibung der Studienpopulation im Ergebnisteil zu entnehmen.

Nach der Geburt wurden jeweils 7,5 ml Nabelschnurblut in eine *Sarstedt Monovette® Serum-Gel* und zwei *Sarstedt Monovetten® EDTA* entnommen. Die Weiterverarbeitung des Nabelschnurblutes für die durchflusszytometrischen

Analysen, die Isolation von PBMCs und die Gewinnung von Serum zur Flt3L-Serumkonzentrationsbestimmung mittels ELISA erfolgte innerhalb von 12 Stunden. Nach der Entbindung wurden die Teilnehmerinnen gebeten, einen kurzen Fragebogen zu Schwangerschaftskomplikationen und dem Verlauf der Entbindung auszufüllen. In diesem Zusammenhang wurden auch die Daten der Neugeborenen erhoben. Die Angaben finden sich ebenfalls in den Tabellen zur Beschreibung der Studienpopulation im Ergebnisteil.

2.3 Methoden

2.3.1 Computer Adaptiver Test zur Erfassung von Stress (Stress-CAT)

Der Stress-CAT wurde gewählt, um den von den Studienteilnehmerinnen in der Schwangerschaft wahrgenommenen Stress zu erfassen. Die Erhebung erfolgte zu allen drei Untersuchungszeitpunkten.

Der Fragebogen wurde auf Grundlage einer Item-Datenbank entwickelt, die sich aus Items der Stressfragebögen PSQ, TICS, ABF und FESB zusammensetzt (Kocalevent et al. 2009). Es wurde von den Teilnehmerinnen in den zurückliegenden vier Monaten wahrgenommener Stress erfasst.

Der Fragebogen beinhaltete 10 Items, die auf einer Skala von 1 bis 5 (1 ‚nie‘ 2 ‚selten‘ 3 ‚manchmal‘ 4 ‚häufig‘ 5 ‚sehr häufig‘) zu bewerten waren. Der Gesamtscore berechnete sich aus der Summe der Punktwerte (1-5) der einzelnen Items dividiert durch die Anzahl der Items. Je größer der von den Teilnehmerinnen wahrgenommene Stress war, desto höher fiel der Gesamtscore aus.

2.3.2 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs)

Die Isolierung der PBMCs erfolgte durchgehend unter sterilen Bedingungen unter der Abzugshaube (*MSC-Advantage*, Thermo Scientific).

Das EDTA-Blut wurde, nach Abnahme des Blutes für die Oberflächenfärbung im Vollblut, in einer 50 ml *Cellstar®-Tube* (greiner bio-one) gesammelt. Das Volumen wurde ermittelt und danach phosphatgepufferte Salzlösung (*Dulbecco's PBS (1x) Without Ca & Mg*, PAA Laboratories GmbH) in gleichem Volumenanteil zugegeben und gemischt. Anschließend wurden in drei 15 ml *Cellstar®-Tubes* (greiner bio-one) je 4 ml Lymphozytentrennmedium (*LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium*, PAA

Laboratories GmbH) vorgelegt und danach in jede Tube die gleiche Menge der Suspension (circa 8 ml) vorsichtig darüber geschichtet. Die Röhrchen wurden darauffolgend bei 400g und Raumtemperatur für 35 Minuten ohne Bremse und Beschleunigung zentrifugiert (*ZentrifugeRotina 380 R*, Hettich Zentrifugen).

Im Anschluss wurde der Überstand bis auf 1 cm über der Interphase abgesaugt (*Vacunsafe Comfort*, IBS Integra Biosciences), die Lymphozytenschicht mit sterilen Pasteurpipetten (*Einweg-Pasteurpipetten 3,2 ml*, Carl Roth GmbH) isoliert und in einer 50 ml *Cellstar®-Tube* gesammelt. Danach wurde das Röhrchen auf 50 ml mit kaltem PBS aufgefüllt und bei Raumtemperatur und 350g über 10 min zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde erneut der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in etwas kaltem PBS gelöst und dann wieder mit PBS auf 25 ml aufgefüllt. Eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 300g über 7 Minuten schloss sich an. Danach wurde erneut der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml eines Mediums aus RPMI-1640 (gibco® by life technologies™) und 10 % fetalen Rinderserums (*FBS*, gibco® by life technologies™) aufgenommen.

10 µl dieser Lösung wurden dann zu 90 µl *Türk-Lösung* (Flucal Analytical) gegeben. Danach wurden 10 µl der Lösung für die mikroskopische Bestimmung (Mikroskop, *Objektiv Ph1 10/0.22*, Carl Zeiss) der Zellzahl in der Zählkammer (*Neubauer bright line*, Marienfeld Germany) verwendet.

Abschließend wurde aus den PBMCs das einer Million Zellen entsprechende Volumen entnommen, in ein Polystyrol-Rundbodenröhrchen (*BD Falcon Polystyrene Round-Bottom Tube*, BD Biosciences) aufgenommen und im weiteren Verlauf für das Protokoll zur intrazellulären Färbung mit FoxP3-Antikörpern verwendet.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Prinzip

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, diverse Merkmale von Zellen darzustellen, die Expression verschiedenster Oberflächenrezeptoren zu untersuchen und unterschiedliche Zelltypen zu identifizieren. Voraussetzung hierfür ist die Markierung der zu untersuchenden Zellen mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Probe der markierten Zellen wird nach entsprechender Präparation im Durchflusszytometer angesaugt. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und durch einen Laserstrahl geleitet. Größe und Granularität beeinflussen

zum Einen die Streuung des Laserlichtes. Zum anderen werden die Fluorochrome der Antikörper durch die unterschiedlichen Wellenlängen der Laser angeregt. So können unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten detektiert werden, die Aufschluss über die Eigenschaften der Zellen geben (Schütt und Bröker 2011).

Oberflächenfärbung des Nabelschnurblutes

Für die Oberflächenfärbung wurden je 100 µl EDTA-Nabelschnurblut in zwei Polystyrol-Rundbodenröhrchen vorgelegt. Jedem Röhrchen wurden anschließend 70 µl eines spezifischen Antikörper-Gemisches zugegeben. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 1 und 2 zu entnehmen.

Antigenspezifität	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD4	V500	RPA-T4	1:10	BD Biosciences
CD127	BV421	A019D5	1:10	BioLegend
CD45RO	FITC	UCHL1	1:3	BioLegend
CD25	PE	BC96	1:4	BioLegend
CD39	PE/Cy7	A1	1:3	BioLegend
CD3	APC/Cy7	SK7	1 :10	BioLegend

Tabelle 1 Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen der regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut (Röhrchen 1)

Antigenspezifität	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD45	V500	HI30	1:3	BD Biosciences
CD38	BV421	HIT2	1 :10	BioLegend
CD135	PE	BV10A4H2	pur	BioLegend
CD34	PE/Cy7	581	pur	BioLegend
CD133	APC	293C3	pur	Miltenyi Biotec

Tabelle 2 Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen der hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut (Röhrchen 2)

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden den Röhrchen je 1 ml Lyse-Lösung (*BD FACSTM Lysing Solution*, BD Biosciences) in einer Verdünnung von 1:10 zugegeben. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubationszeit unter gleichen Bedingungen wurden die Proben bei 1500 rpm über 5 Minuten zentrifugiert. Sodann wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 3 ml PBS aufgenommen und bei 1500 rpm über 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand erneut dekantiert.

Erschien das Zellpellet zu diesem Zeitpunkt noch blutig (rötlich-orange), erfolgte eine erneute Zugabe von 300 µl Lyse-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Minuten und anschließender Zentrifugation bei 1500 rpm über 5 Minuten wurde der Überstand wieder dekantiert. Dann wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und erneut, wie bereits beschrieben, zentrifugiert.

Nach der Dekantierung des verbliebenen Überstandes wurde das Zellpellet in 300 µl PBS aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C gelagert.

Intrazelluläre Färbung der PBMCs mit FoxP3-Antikörpern

Zunächst wurde den entnommenen 1 Million zuvor isolierten PBMCs 1 ml kaltes PBS zugegeben. Die Probe wurde dann 5 Minuten bei 4°C und 400g zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes erfolgte die Zugabe von 50 µl eines spezifischen Antikörper-Cocktails. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Antigenspezifität	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD4	V500	RPA-T4	1:10	BD Biosciences
CD25	PE	BC96	1:4	BioLegend
CD127	PerCP/Cy5.5	HCD127	1:3	BioLegend
HLA-DR	FITC	L243	1:3	BioLegend
CD45RA	Pacific Blue	HI100	1:10	BioLegend

Tabelle 3 Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen der regulatorischen T-Zellen in den zuvor aus dem Nabelschnurblut isolierten PBMCs

Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C wurde der Probe erneut 1 ml kaltes PBS zugefügt. Danach wurde das Zellmaterial bei 400g und 4°C über 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert.

Zwischenzeitlich wurden 300 µl eines Fixations- und Permeabilisationskonzentrats mit 900 µl des zugehörigen Verdünnungs-Mediums versetzt (*Fixation/Permeabilization Diluent + Concentrate – Kit*, eBiosciences). 1 ml dieser Mischung wurde anschließend auf das Zellpellet pipettiert und danach für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss daran wurde die Probe zwei Mal mit je 2 ml kaltem PBS durch Zentrifugation über 5 Minuten bei 4°C und 400g gewaschen. Anschließend wurden 10 µl eines Antikörpers spezifisch für FoxP3 (AlexaFluor®647, Klon 259D, BioLegend) in einer Verdünnung von 1:3 zum Zellpellet gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Zellen noch einmal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen

und das Zellpellet schließlich in 300 µl PBS aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung kurzzeitig bei 4°C gelagert.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit dem *FACSCanto II* (BD Biosciences). Die Auswertung wurde schließlich mithilfe der *FlowJo* Software (Version 9.5.2, Tree Star) durchgeführt. Die Auswertungsstrategien werden im entsprechenden Abschnitt des Ergebnisteils erläutert.

2.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Serumkonzentrationen des Flt3L wurde der *Quantikine® Human Flt-3/Flk-2 Ligand Immunoassay* (R&D Systems) verwendet, welcher nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs funktioniert. Die Durchführung erfolgte wie in dem beiliegenden Manual beschrieben (R&D Systems 2010). Als Reagenzien wurden ausschließlich die in den Kits vorhandenen verwendet.

Serumaufbereitung

Die Serum-Gel-Röhrchen wurden bei 2000g und Raumtemperatur über 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl Aliquots des Serums bei -80°C eingefroren und bis zur Durchführung des ELISAs aufbewahrt.

Vorbereitung der Reagenzien

Für eine hohe Homogenität der verwendeten Serumproben wurden diese nach dem Auftauen zunächst zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen 150 µl der Probe abpipettiert, mittels Vortex-Schüttler (*Press-To-Mix ,524‘*, R LABIN) homogenisiert und anschließend als Probenmaterial für die Bestimmung des Flt3L verwendet.

Alle Reagenzien des Kits wurden zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Um den Wasch-Puffer herzustellen, wurden 20 ml Wasch-Puffer Konzentrat mit 480 ml H₂O_{dest} gemischt.

Der Flt3L-Standard wurde mit 1 ml H₂O_{dest} vermischt, um die Stammlösung mit einer Flt3L-Konzentration von 10000 pg/ml herzustellen. Nach 15 Minuten wiederholten Durchmischens wurde diese Lösung zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe verwendet.

Erstellung der Standardverdünnungsreihe

Für die Standardverdünnungsreihe wurden zuerst 900 μl des Kalibrator-Verdünners RD6-11 in ein mit '1000 pg/ml' beschriftetes Polystyrol-Röhrchen pipettiert und in weitere sechs Polystyrol-Röhrchen jeweils 500 μl dieses Kalibrator-Verdünners gegeben. Darauf wurden 100 μl der Stammlösung in das 1000 pg/ml Röhrchen gegeben, welches nun den Ausgangspunkt für die weitere Verdünnungsreihe darstellte. Nach gründlichem Durchmischen wurden diesem Röhrchen 500 μl Lösung entnommen und in das nächste Polystyrol-Röhrchen gegeben, welches nun eine Flt3L-Konzentration von 500 pg/ml aufwies. Nach eben diesem Prinzip wurde auch mit den weiteren fünf Röhrchen verfahren. Es ergab sich daraus eine Verdünnungsreihe mit folgenden Flt3L-Konzentrationen: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 und 15.6 pg/ml. Der Kalibrator-Verdüner diente mit der Konzentration 0 pg/ml als Null-Standard. Abbildung 3 zeigt das Schema zur Erstellung der Standard-Verdünnungsreihe.

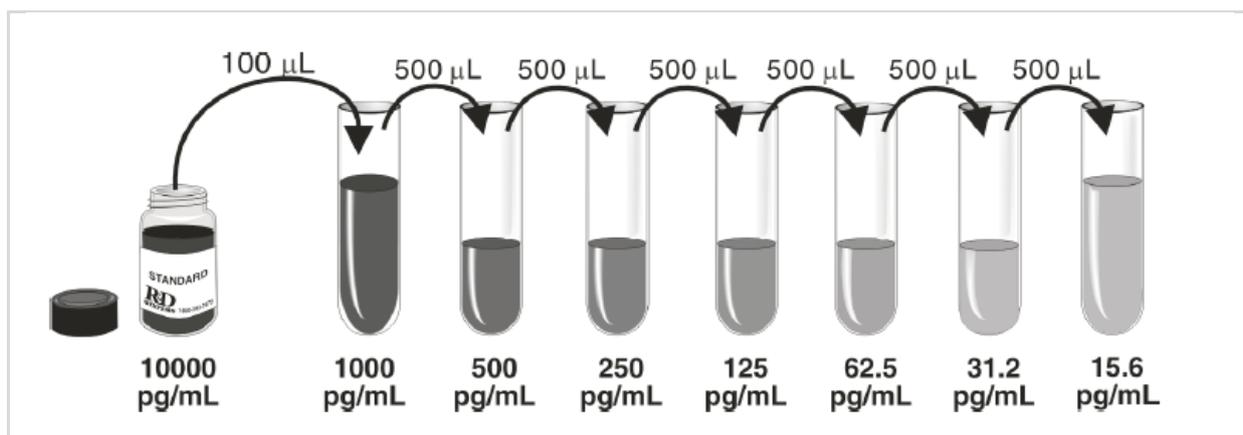


Abbildung 3 Erstellung der Standard-Verdünnungsreihe für den ELISA zur Bestimmung der Flt3L-Serumkonzentrationen (R&D Systems 2010).

Durchführung des Assays

Im nächsten Schritt wurden je 100 μl des Assay-Verdünners RD1W in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und anschließend Dubletten mit je 50 μl der Standardproben pro Vertiefung sowie Dubletten der Proben mit je 50 μl pro Well bestückt. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen versiegelt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Es schloss sich ein vierfacher Waschgang an, wobei um Kontaminationen durch zu hohe Flüssigkeitsniveaus in den Vertiefungen zu vermeiden, nur 200 μl des Wasch-Puffers pro Durchgang verwendet wurden statt der im Manual vorgesehenen 400 μl .

Nach jedem Waschgang wurde die Flüssigkeit in den Vertiefungen der Platte komplett entfernt, indem die Platten auf saubere Papiertücher gedrückt wurden.

Anschließend wurden 200 µl des Flt3L-Konjugates in jede Vertiefung gegeben, die Platte wieder mit einem Klebestreifen versiegelt und 2 Stunden bei Raumtemperatur und konstanter leichter Durchmischung auf einem Laborschüttler inkubiert. Es folgte erneut ein vierfacher Waschgang wie oben beschrieben.

Circa 15 Minuten vor Einsatz der Substrat-Lösung wurde diese durch Mischen der Farb-Reagenzien A und B zu gleichen Volumenanteilen hergestellt. Die Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt. Nach dem letzten Waschgang wurden 200 µl dieser Substrat-Lösung in jede Vertiefung gegeben und die Platte dann bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µl der Stop-Lösung in jede Vertiefung. Es zeigte sich darauf ein Farbumschlag von blau zu gelb.

Innerhalb der nächsten 30 Minuten erfolgte anschließend die photometrische Messung der Flt3L-Konzentrationen der Proben.

Vorversuch

Um vor den Messungen der eigentlichen Proben zu evaluieren, inwieweit die Flt3L-Serumkonzentrationen der Proben im messbaren Bereich liegen, wurden Testreihen mit den Proben zweier Probandinnen und dem dazugehörigen Nabelschnurblut durchgeführt. Die Proben wurden in Verdünnungen von 1:2 bis 1:16 gemessen.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass zu hohe Verdünnungen Flt3L-Konzentrationen im nicht mehr messbaren Bereich nach sich zogen. Lediglich in den unverdünnten Proben war eine durchgehende Bestimmung der Konzentrationen möglich. Folglich wurden im Hauptversuch ausschließlich unverdünnte Proben verwendet.

Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden die gesamten Serumproben der drei Zeitpunkte in der Schwangerschaft sowie die dazugehörigen Nabelschnurblut-Seren nach der oben beschriebenen Methodik gemessen.

Messung und Auswertung

Zur Bestimmung der Flt3-Serumkonzentrationen in den Proben wurden die optischen Dichten eben dieser mittels Microplate Reader (*infinite M200*, TECAN) bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm *Magellan V 6.6* (Tecan) ausgewertet.

Es wurde mit einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm gearbeitet.

Es wurden jeweils zwei Messungen der Standards bzw. der Proben durchgeführt. Aus den jeweiligen Messergebnissen wurden anschließend die entsprechenden Mittelwerte berechnet.

Die gemittelten Messwerte für die optische Dichte der Standards abzüglich der Leerwerte bildeten in Abhängigkeit von den Flt3L-Konzentrationen der Standards die Standardkurve. Anhand dieser wurden abschließend den Werten der optischen Dichte der Proben die entsprechenden Flt3L-Serumkonzentrationen der Proben zugeordnet. Für jede Mikrotiter-Platte wurde eine gesonderte Standardkurve ermittelt. Abbildung 4 zeigt beispielhaft eine dieser Standardkurven.

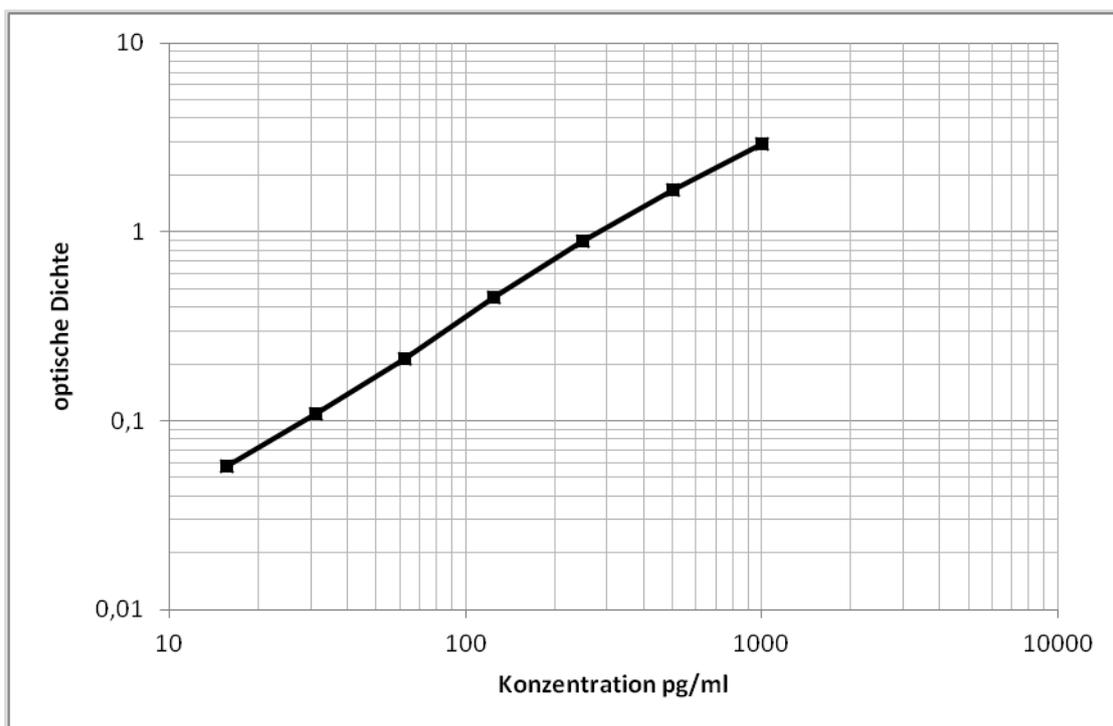


Abbildung 4 Beispiel einer Standardkurve für die photometrische Messung der Flt3L-Konzentrationen in den mittels ELISA präparierten Proben

Im Manual des Herstellers wird für den verwendeten Assay eine Intra-Assay Präzision von 1,9 pg/ml Standardabweichung für mittlere Konzentrationen von 69,5pg/ml und eine Inter-Assay Präzision von 8,7 pg/ml Standardabweichung bei mittleren Konzentrationen von 78,2 pg/ml angegeben. Bezüglich der Sensitivität gibt der Hersteller die kleinste messbare Flt3L-Konzentration von weniger als 7 pg/ml an (R&D Systems 2010).

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit *SPSS Statistics 20* (IBM).

Zur Prüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung angewandt. Das Signifikanzniveau wurde hierfür auf einen p-Wert von kleiner als 0,001 festgelegt. Bei einem p-Wert kleiner als 0,001 wurde davon ausgegangen, dass der betreffende Parameter nicht normalverteilt ist. Zusätzlich wurden sowohl bei einem Quotienten aus Schiefe bzw. Kurtosis und dem zugehörigen Standardfehler größer als 3,29 und z-Werten der Variablen von größer als 3,29 (Tabachnick und Fidell 2007) die entsprechenden Ausreißer auf Plausibilität überprüft. Auch offensichtliche visuelle Ausreißer in den Box-Plot-Diagrammen wurden kontrolliert. Die Werte einer Teilnehmerin mussten bei den Berechnungen mit den mütterlichen Flt3L-Konzentrationen aufgrund ihrer offensichtlichen Ausreißerposition in sämtlichen Berechnungen aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Korrelationen wurden bei vorliegender Normalverteilung mit dem Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Andernfalls wurde auf den Rangkorrelationskoeffizienten von Spearman-Rho zurückgegriffen.

Bei Gruppenvergleichen wurden, sofern keine medizinisch oder wissenschaftlich begründbare Einteilung vorgenommen werden konnte beziehungsweise eine solche aufgrund der kleinen Stichprobenmenge nicht sinnvoll erschien, die Einteilungen nach festgelegten Perzentilen vorgenommen. Abweichungen von dieser Einteilung sind gesondert aufgeführt.

Bei normalverteilten Werten innerhalb der Gruppen wurden Gruppenvergleiche unter Verwendung des T-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde auf den Mann-Whitney U-Test zurückgegriffen.

Allein bei dem Vergleich der mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen wurde, sofern eine Normalverteilung vorlag, auf T-Tests für verbundene Stichproben

zurückgegriffen, da es sich bei den Werten derselben Frau um wiederholte, voneinander abhängige Messungen handelte. Konnte hier nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt.

Die visuelle Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc.).

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation umfasst 35 Neugeborene, die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf geboren wurden, sowie deren Mütter, die im Rahmen der ‚Prince-Studie‘ (*Prince – Prenatal Identification of Children´s health*) rekrutiert worden sind.

In Tabelle 4 sind die Charakteristika der Studienpopulation im Vergleich zur Originalpopulation, d.h. den gesamten übrigen in der ‚Prince-Studie‘ rekrutierten Frauen, aufgezeigt. Wie dort ersichtlich wird, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der aufgeführten Eigenschaften der Neugeborenen (Geschlecht, Schwangerschaftsalter, Geburtsgewicht und –länge, Ponderalindex). Auch bezüglich der mütterlichen Charakteristika zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung, wie ebenfalls Tabelle 4 zu entnehmen ist. In wenigen Punkten unterschieden sich die beiden Gruppen signifikant voneinander. In der Studienpopulation zeigte sich beispielsweise ein signifikant höherer mütterlicher Altersdurchschnitt (32,7 Jahre versus 31,1 Jahre). Auch hatten mehr Frauen in der Studienpopulation bereits ein oder mehrere Kinder aus vorangegangenen Schwangerschaften (100% versus 64,3%) und waren seltener in einer Beziehung (94,3% versus 100%).

	Studien- population N=35	Original- population N=76 ^a	p-Wert ^b
Angaben zur Mutter			
Alter, Jahre	32,7 [4,3] ^c	31,1 [3,4] N=75	0,03 ^{sd}
BMI zu Studienbeginn, kg/m ²	24,1 [4,2]	24,2 [3,6] N=68	0,76 ^e
Herkunftsland, %			
Mittleuropa	97,1	93,4	0,42
Asien	2,9	1,3	0,57
Sonstige Staaten	0	5,3	0,17
Frühere Schwangerschaften ≥ 1, %			
Ja	37,1	39,5	0,82
Kinder aus früheren Schwangerschaften ≥ 1, % ^f			
Ja	100	64,3	0,01*
Höchster Bildungsgrad, %			
Mittlere Reife	28,6	14,5	0,08
Fachabitur	11,4	6,6	0,38
Abitur	20,0	23,7	0,67
Hoch-/Fachhochschulabschluss	37,1	48,7	0,27
Berufstätigkeit, %	91,4	88,2	0,61
In einer Beziehung, %	94,3	100	0,04*
Chronische Erkrankungen ≥ 1, %			
Ja	11,4 ^g	21,1 ^h	0,22
Komplikationen während Schwangerschaft/Geburt ≥ 1, %			
Ja	22,9 ⁱ	22,4 ^k	0,95
Entbindungsmodus, %			
Vaginale Entbindung	85,7	85,3	0,84
Sectio	14,3	14,7	0,98
Angaben zum Kind			
Geschlecht, %			
Weiblich	40,0	35,5	0,75
Männlich	60,0	63,2	0,75
Schwangerschaftsalter, SSW	39,3 [1,5]	39,2 [1,7] N=75	1,00 ^e
Schwangerschaftsalter <37 SSW, %	2,9	7,9	0,31
Geburtsgewicht, g	3528,4 [466,9]	3440,5 [473,5] N=75	0,36 ^d
Geburtslänge, cm	51,9 [2,2]	51,8 [2,3] N=75	0,88 ^d
Ponderalindex, g/cm ³	2,5 [0,2]	2,5 [0,2] N=75	0,22 ^d

a N=76, wenn nicht anders angegeben b Chi-Quadrat-Test nach Pearson, wenn nicht anders angegeben c Mittelwert [SD] d Mittelwertvergleich mittels T-Test e Mittelwertvergleich mittels Mann-Whitney-U-Test f Der prozentuale Anteil bezieht sich auf Frauen mit mindestens einer vorangegangenen Schwangerschaft g Angegebene Erkrankungen: Hypothyreose (n=3), Migräne (n=1) h Angegebene Erkrankungen: Asthma (n=5), Epilepsie (n=1), Hyperthyreose (n=1), Hypothyreose (n=9), Morbus Bechterew (n=1) i Angegebene Komplikationen: Fraktur (n=1), HELLP-Syndrom (n=1), Hypertonus (n=1), Infektionen (n=2), Schilddrüsenzyste (n=1), Sturz/Unfall (n=2), Vorzeitiger Blasensprung (n=1), Vorzeitige Wehentätigkeit (n=2) k Angegebene Komplikationen: Gestationsdiabetes (n=1), Hämorrhoiden (n=1), Hypertonus (n=1), Infektionen (n=7), SGA (n=1), Symphysenlockerung (n=1), Vorzeitiger Blasensprung (n=1), Vorzeitige Wehentätigkeit (n=6) * Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,05

Tabelle 4 Charakteristika der Studienpopulation im Vergleich zur Originalpopulation der ‚Prince-Studie‘

Tabelle 5 zeigt den Vergleich der Studienpopulation mit den in der Jahresauswertung der Geburtshilfe für die EQS-Hamburg Landesgeschäftsstelle Qualitätssicherung erfassten Geburten des Jahres 2012 in Hamburg (EQS Hamburg Landesgeschäftsstelle 2013). Beide Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Angaben zum Kind bezüglich Geschlecht, Schwangerschaftsalter, Geburtsgewicht und –länge nicht. Bei den Schwangeren hingegen gab es auch hier signifikante Unterschiede hinsichtlich ihres Alters. Die Studienpopulation wies einen größeren Anteil von Frauen im Alter von 30 bis 35 Jahren auf (57,1% versus 35,9%) und einen geringeren Anteil von Schwangeren jünger als 30 Jahre (17,1% versus 34,4%). Außerdem zeigte die Studienpopulation ein geringeres Spektrum an

Herkunftsländern als die Hamburger Geburtskohorte. Zudem war die Anzahl vorausgegangener Schwangerschaften in der Studienpopulation signifikant niedriger (37,1% versus 58,1%). In der Studienpopulation waren darüber hinaus mehr Frauen zum Befragungszeitpunkt berufstätig (91,4% versus 53,1%) und häufiger in einer Beziehung (94,3% versus 80,8%). Weiterhin zeigten sich unterschiedlich häufig bestimmte Komplikationen während der Schwangerschaft und Geburt, wie ebenfalls Tabelle 5 zu entnehmen ist. Die Kinder der Studienpopulation wurden außerdem seltener per Sectio entbunden (14,3% versus 32,4%).

	Studienpopulation N=35	Hamburger Geburten 2012 ^a N=20564	p-Wert ^b
Angaben zur Mutter			
Alter, %			
<30 Jahre	17,1	34,4	0,03*
30 - <35 Jahre	57,1	35,9	0,009**
35 - <40 Jahre	22,9	23,7	0,91
>= 40 Jahre	2,9	6,0	0,43
BMI bei Erstuntersuchung, %			
<20 kg/m ²	14,3	14,0	0,96
20 - <25 kg/m ²	45,7	49,2	0,68
25 - <30 kg/m ²	31,4	19,5	0,08
>30 kg/m ²	8,6	10,3	0,74
Herkunftsland, %			
Mittel- /Nordeuropa, Nordamerika	97,1	79,4	0,01*
Mittelmeerländer	0	2,8	0,31
Osteuropa	0	6,3	0,13
Nordafrika	0	5,1	0,17
Asien	2,9	2,1	0,77
Sonstige Staaten	0	4,3	0,21
Anzahl frühere Schwangerschaften ≥ 1, %			
Ja	37,1	58,1	0,01*
Anzahl Kinder aus früheren Schwangerschaften ≥ 1, %^c			
Ja	100	79,9 ^d	0,07
Berufstätigkeit während der jetzigen Schwangerschaft, %			
Ja	91,4	53,1	0,00***
In einer Beziehung, %	94,3	80,8	0,03*
Komplikationen während Schwangerschaft/Geburt^e, %			
Vorzeitiger Blasensprung	2,9	19,6	0,01*
Vorzeitige Wehentätigkeit	5,9	2,2	0,17
HELLP-Syndrom	2,9	0,5	0,04*
Hypertonie	2,9	1,1	0,30
Entbindungsmodus, %			
Spontan und vaginal operativ	85,7	67,5 ^f	0,02*
Sectio	14,3	32,4 ^f	0,02*
Angaben zum Kind			
Geschlecht, %			
Weiblich	40,0	48,3 ^g	0,32
Männlich	60,0	51,7 ^g	0,32
Schwangerschaftsalter, %			
<37 SSW	2,9	9,4 ^g	0,19
37 - <42 SSW	94,3	89,5 ^g	0,35
>42 SSW	2,9	1,2 ^g	0,36
Geburtsgewicht, %			
<1000 g	0	0,8 ^g	0,59
1000 - < 1500g	0	0,9 ^g	0,58
1500 - < 2500g	2,9	5,8 ^g	0,45
2500 - < 4000g	85,7	81,9 ^g	0,56
>4000g	11,4	10,5 ^g	0,86
Geburtslänge, %			
<40 cm	0	0,7 ^h	0,61
40 - <45 cm	0	1,6 ^h	0,44
45 - <50 cm	11,4	17,7 ^h	0,33
50 - <55 cm	77,1	67,0 ^h	0,20
>55 cm	11,4	10,8 ^h	0,90

a Geburten inklusive Mehrlingsschwangerschaften, wenn nicht anders angegeben b Chi-Quadrat-Test nach Pearson c Der prozentuale Anteil bezieht sich auf Frauen mit mindestens einer vorangegangenen Schwangerschaft d Anzahl Lebendgeburten aus vorangegangenen Schwangerschaften ≥ 1 e Weitere aufgetretene Komplikationen in der Studienpopulation sind Tabelle 4 zu entnehmen. Aufgrund nicht vorhandener Angaben diesbezüglich in der Hamburger Gesamtkohorte wurde hier auf eine vergleichende Auflistung verzichtet. f Entbindungsmodi bei Einlingsgeburten, n=20096 g Die Angabe bezieht sich auf alle 2012 geborenen Kinder, n=21035 h Die Angabe bezieht sich auf alle 2012 lebend geborenen Kinder, n=20970 * Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,05 ** Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,01 *** Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,001

Tabelle 5 Charakteristika der Studienpopulation im Vergleich zu den in der Jahresauswertung der Geburtshilfe im Jahr 2012 erfassten Geburten in Hamburg (EQS Hamburg Landesgeschäftsstelle 2013)

3.2 Der Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand (Flt3L) in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut

Um den Einfluss des Flt3L auf die Reife des kindlichen Immunsystems untersuchen zu können, wurden zunächst einige allgemeine Betrachtungen zum Flt3L bei Mutter und Kind angestellt. Hierfür wurden die Flt3L-Serumkonzentrationen mittels ELISA im mütterlichen Blut in der 14., 24. und 36. Schwangerschaftswoche und im Nabelschnurblut bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind im Folgenden beschrieben.

Der Vergleich der mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen zeigte, dass sich die mittleren Flt3L-Serumkonzentrationen der drei Zeitpunkte in der Schwangerschaft nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Werte waren jedoch im Durchschnitt zu allen Zeitpunkten in der Schwangerschaft höher als die gemessenen Werte im Nabelschnurblut, was zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 5 dargestellt ist. Die einzelnen Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen sind der Bildunterschrift zu entnehmen. Die Graphik zeigt sowohl die einzelnen gemessenen Konzentrationen, als auch den Mittelwert samt Fehlerbalken für die Standardabweichung. Bei dem mit *b* markierten Wert handelt es sich um die Flt3L-Konzentration im Nabelschnurblut des vor der 37. SSW entbundenen Kindes. Der im Diagramm ersichtliche, ähnlich hoch liegende Wert ist einem termingerecht geborenen Kind zuzuordnen. Die zugehörigen mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen des Frühgeborenen lagen im Bereich der Fehlerbalken, weshalb hier auf eine zusätzliche Markierung verzichtet wurde.

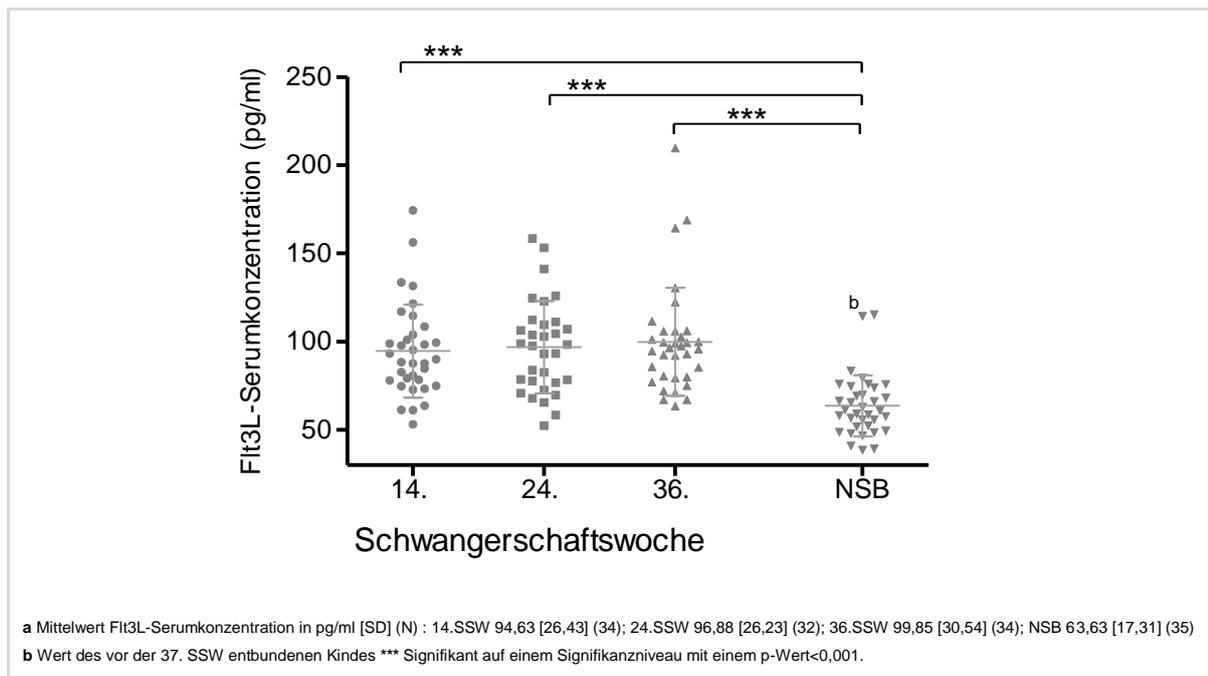


Abbildung 5 Unterschiede in den mittleren Flt3L-Serumkonzentrationen (pg/ml) in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut (NSB)^a

In welchem Zusammenhang die Flt3L-Serumkonzentrationen der einzelnen Studienteilnehmerinnen zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft stehen, wurde ebenfalls rechnerisch untersucht. Es zeigte sich, dass die mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen zu den jeweiligen Messzeitpunkten in der Schwangerschaft positiv miteinander korrelierten. Die Ergebnisse sind Tabelle 6 zu entnehmen. Auf eine graphische Darstellung wurde an dieser Stelle zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

Messzeitpunkte der korrelierten Flt3L-Serumkonzentrationen	Korrelationskoeffizient r^a (N)	p-Wert
14. SSW und 24. SSW	0,789 (32)	<0,001***
24. SSW und 36. SSW	0,753 ^b (32)	<0,001***
14. SSW und 36. SSW	0,554 ^b (34)	0,001**

a Korrelation nach Pearson, wenn nicht b

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

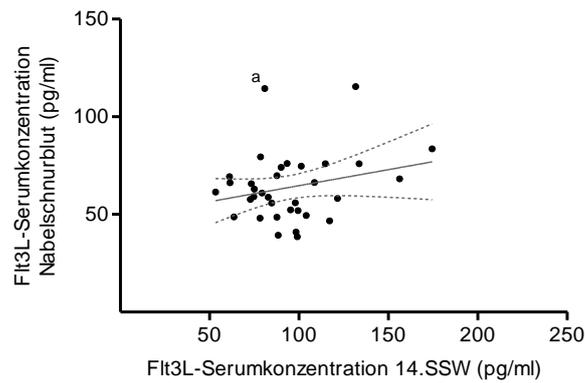
** Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,01

*** Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,001

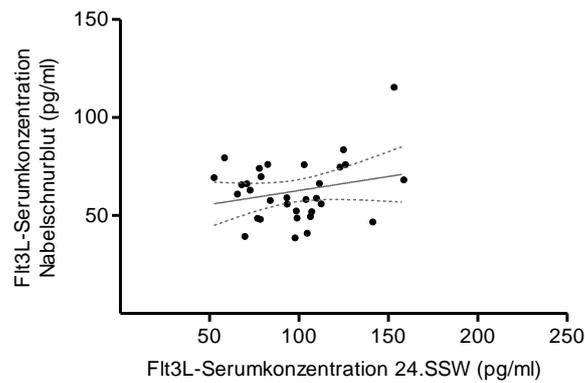
Tabelle 6 Zusammenhang zwischen den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft (pg/ml)

Im nächsten Schritt wurde evaluiert, ob ein Zusammenhang zwischen dem mütterlichen Flt3L in der Schwangerschaft und dem Flt3L im Nabelschnurblut nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden die entsprechenden Konzentrationen miteinander korreliert.

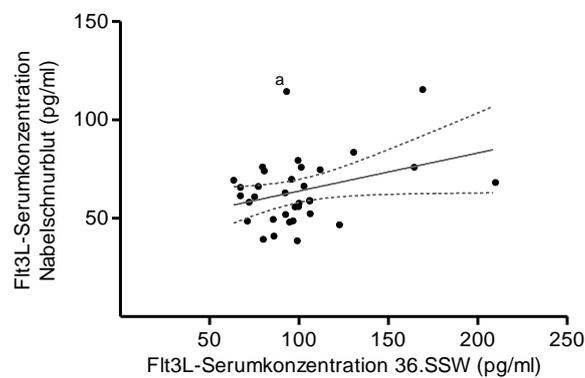
Es zeigte sich, dass die mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen der drei Messzeitpunkte schwach positiv, jedoch nicht signifikant, mit den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut korrelierten. Um den Zusammenhang der Konzentrationen genauer im Hinblick auf die Verteilung der Einzelwerte und Tendenzen der Korrelationen betrachten zu können, wurde auf die graphische Darstellung (Abbildung 6 A-C) zurückgegriffen. Mit *a* sind wiederum die dem vor der 37. SSW entbundenen Kind zuzuordnenden Flt3L-Konzentrationen markiert. In Abbildung B fehlt jene Markierung, da zum zweiten Untersuchungszeitpunkt kein mütterlicher Wert erhoben werden konnte.

A

Korrelation nach Pearson: $r=0,247$, $p\text{-Wert}=0,16$

B

Korrelation nach Pearson: $r=0,241$, $p\text{-Wert}=0,19$

C

Korrelation nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt: $r=0,207$, $p\text{-Wert}=0,24$

a Werte des vor der 37. SSW entbundenen Kindes

Abbildung 6 Zusammenhänge zwischen den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut und den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. **(A)**, 24. **(B)** und 36. Schwangerschaftswoche **(C)**.

3.3 Der Einfluss des Flt3L im Nabelschnurblut auf die Reife des kindlichen Immunsystems

Das kindliche Immunsystem zum Zeitpunkt der Geburt

Für einen differenzierten Blick auf die Reife des kindlichen Immunsystems zum Zeitpunkt der Geburt erfolgte im nächsten Schritt die Analyse der kindlichen hämatopoetischen Stammzellen und der regulatorischen T-Zellen hinsichtlich ihrer Ausdifferenzierung mittels Durchflusszytometrie. Die Analysen sind beispielhaft als Punktwolken (Dot Plots) dargestellt, wobei hier jedem Punkt jeweils ein Ereignis zugeordnet ist.

Analyse hämatopoetischer Stammzellen

Bevor die Einteilung der hämatopoetischen Stammzellen in die einzelnen Subpopulationen erfolgte, wurden zunächst aus der Gesamtheit der Leukozyten all jene Zellen ermittelt, die den Rezeptor CD135 für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor Flt3L exprimieren. Abbildung 7 A zeigt diese Zellpopulation. Die weitere Klassifizierung unterschiedlich differenzierter hämatopoetischer Stammzellsubpopulationen erfolgte unter Zuhilfenahme der Oberflächenproteine CD34 und CD133. In Anlehnung an die Arbeiten von D'Alessio et al., Basford et al. und Takahashi et al. wurden die hämatopoetischen Stammzellen in solche Zellen unterschieden, die in der Hämatopoese eine frühere Entwicklungsstufe umschreiben und zu diesem Zeitpunkt lediglich CD133, nicht aber CD34 exprimieren (HSC^{early}), solche, die als Übergangsstufe sowohl CD133 als auch CD34 exprimieren (HSC^{mid}) und eben jene, die nur noch eine Expressierung von CD34 zeigen und damit als am weitesten differenziert von den drei genannten Subpopulationen gelten können (HSC^{late}) (Basford et al. 2010, D'Alessio et al. 2011, Takahashi et al. 2014). Abbildung 7 B zeigt die Unterscheidung in eben diese Gruppen. Im nächsten Schritt erfolgte die weitere Einteilung der $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen anhand ihrer Expression von CD45, CD135 und CD38. Ebenfalls in Anlehnung an die Arbeit von D'Alessio et al. erfolgte die Unterscheidung in unreifere ($CD45^{dim}CD34^+CD135^+$; $CD45^{dim}CD38^-$) und weiter differenzierte Subpopulationen ($CD45^+CD34^+CD135^+$; $CD45^{dim}CD38^+$) (D'Alessio et al. 2011). Abbildungen 7 C und D zeigen eben diese Subpopulationen in den zur Abgrenzung verwendeten Gates. Aus den $CD45^{dim}CD38^-$

und den $CD45^{dim}CD38^+$ wurden abschließend die Zellen abgegrenzt, die sowohl $CD133$ als auch $CD135$ exprimieren, wie Abbildung 7 E und F zeigen.

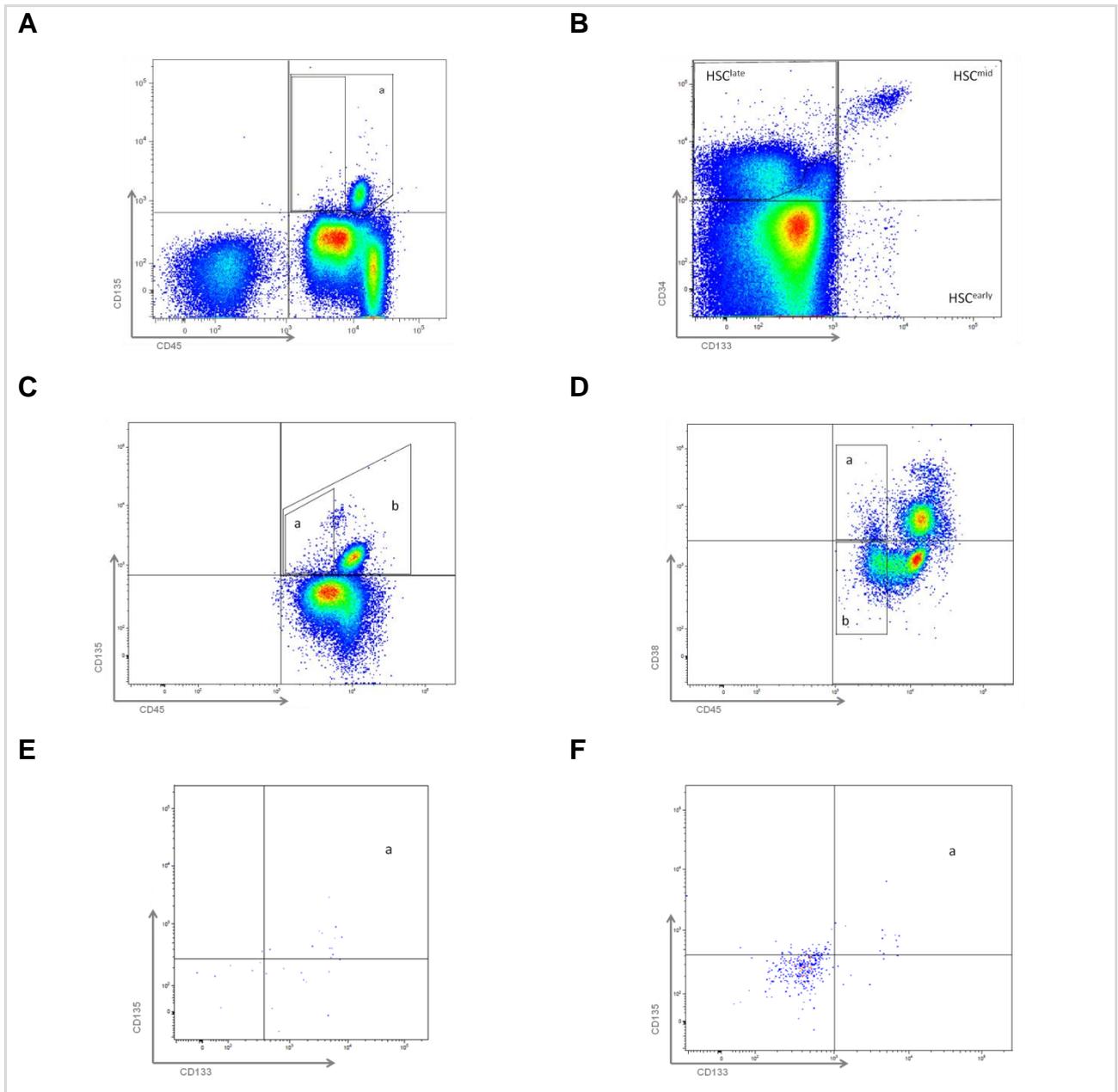


Abbildung 7 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut

A Gesamtheit der $CD135^+$ Zellen in den Leukozyten (a) **B** Entwicklungsstufen der hämatopoetischen Stammzellen differenziert anhand der Expression von $CD133$ und $CD34$ **C** Subpopulationen $CD34^+$ hämatopoetischer Stammzellen differenziert anhand der Expression von $CD45$ und $CD135$ - $CD45^{dim}CD34^+CD135^+$ HSC (a) Gesamtheit der $CD45^+CD34^+CD135^+$ HSC (b)

D Subpopulationen $CD34^+$ hämatopoetischer Stammzellen differenziert anhand der Expression von $CD45$ und $CD38$ - $CD45^{dim}CD38^+$ HSC (a), $CD45^{dim}CD38^-$ HSC (b) **E** Subpopulation der $CD133^+CD135^+$ hämatopoetischen Stammzellen (a) aus der Grundgesamtheit der $CD45^{dim}CD38^+$ Zellen **F** Subpopulation der $CD133^+CD135^+$ hämatopoetischen Stammzellen (a) aus der Grundgesamtheit der $CD45^{dim}CD38^-$ Zellen.

Frequenzen der hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut

Aus den oben beschriebenen Analysen ergaben sich die in Tabelle 7 aufgeführten Frequenzen der Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen im Nabelschnurblut. Die Frequenzen verstehen sich generell als prozentualer Anteil einer Grundgesamtheit. Die entsprechende Grundgesamtheit ergibt sich aus der beschriebenen Auswertungsstrategie. Die Subpopulationen sind eingerückt dargestellt gegenüber der Grundgesamtheit, der sie entspringen.

Zellpopulation	Mittelwert, %	Standardabweichung
CD45⁺CD135⁺ gesamt	4,04	2,43
CD34⁻CD133⁺ HSC (HSC^{early})	0,23	0,18
CD34⁺CD133⁺ HSC (HSC^{mid})	0,26	0,12
CD34⁺CD133⁻ HSC (HSC^{late})	5,56	1,60
CD34⁺ HSC	16,62	7,58
CD45⁺CD135⁺CD34⁺ HSC	16,90	10,09
CD45^{dim}CD135⁺ HSC	1,01	0,86
CD45^{dim}CD38⁺ HSC	1,75	2,28
CD133⁺CD135⁺CD38⁺HSC	42,41	15,09
CD45^{dim}CD38⁻ HSC	15,60	10,25
CD133⁺CD135⁺CD38⁻HSC	5,86	6,05

Tabelle 8 Frequenzen der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen (N=34)

Die Analyse der gesamten CD135⁺ Zellen ergab die in Abbildung 8 gezeigte Verteilung der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen. Die CD34⁺CD133⁻ hämatopoetische Stammzellen (HSC^{late}) nahmen hierbei im Verhältnis zu den weniger differenzierten hämatopoetischen Stammzellen den größten Anteil an den gesamten CD135⁺ Zellen ein. Der Anteil der frühen Subpopulation der CD34⁻CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{early}) betrug lediglich 0,31%.

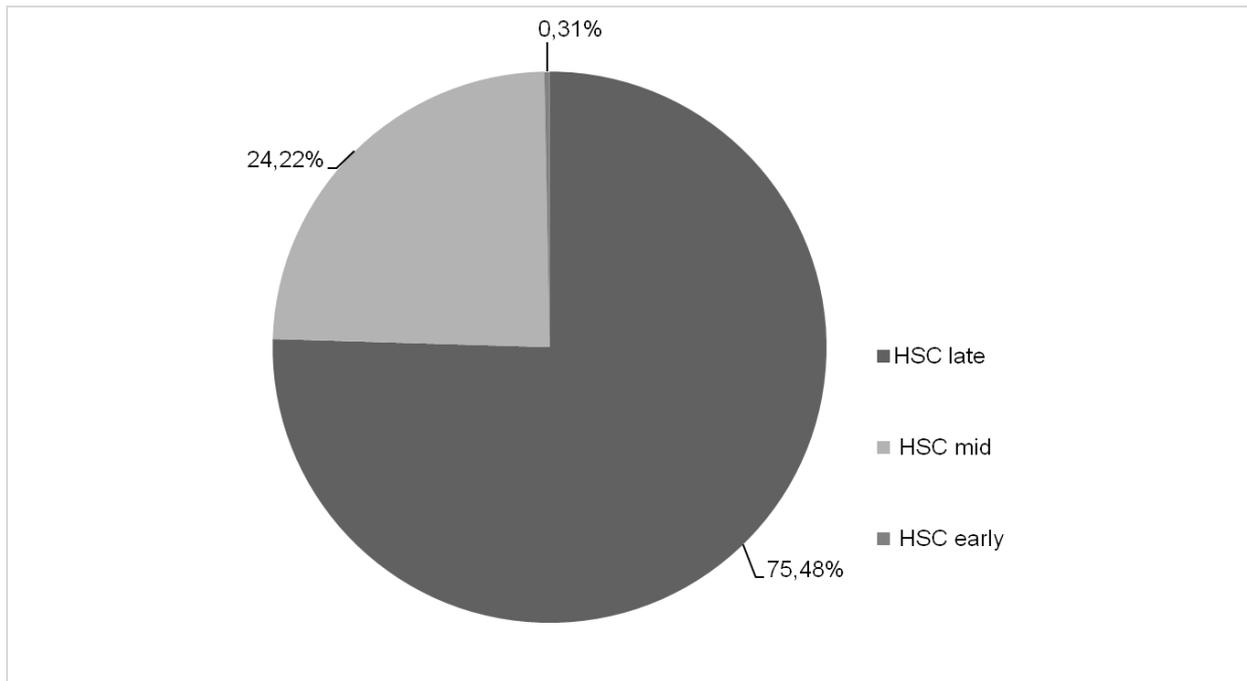


Abbildung 8 Prozentuale Anteile der $CD34^+CD133^-$ (HSC^{late}), $CD34^+CD133^+$ (HSC^{mid}) und $CD34^-CD133^+$ (HSC^{early}) hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut an der Gesamtheit der $CD45^+CD135^+$ Leukozyten.

Analyse regulatorischer T-Zellen

Die regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut wurden anhand durchflusszytometrischer Analysen, zum einen im Vollblut, zum anderen in zuvor isolierten peripheren mononukleären Zellen (PBMC), untersucht. Hierfür wurden typische die regulatorischen T-Zellen charakterisierenden Oberflächenproteine genutzt (Schmetterer et al. 2012). Das genaue Vorgehen wird im Anschluss näher erläutert.

In der Analyse des Vollblutes erfolgte zuerst die Abgrenzung in $CD4^+CD3^+$ T-Helfer-Zellen nach dem Beispiel in Abbildung 9 A. Aus diesen Zellen wurden im Anschluss die $CD25^+CD127^-$ regulatorischen T-Zellen bestimmt, wie Abbildung 9 B zeigt. Daraus hervorgehend wurde die Subpopulation abgegrenzt, die das Oberflächenprotein CD39 aufweisen, welches auf FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und als wichtiger Faktor für die suppressive Funktionalität eben dieser Zellen gilt (Deaglio et al. 2007, Borsellino et al. 2007). Abbildung 9 C zeigt diese Subpopulation.

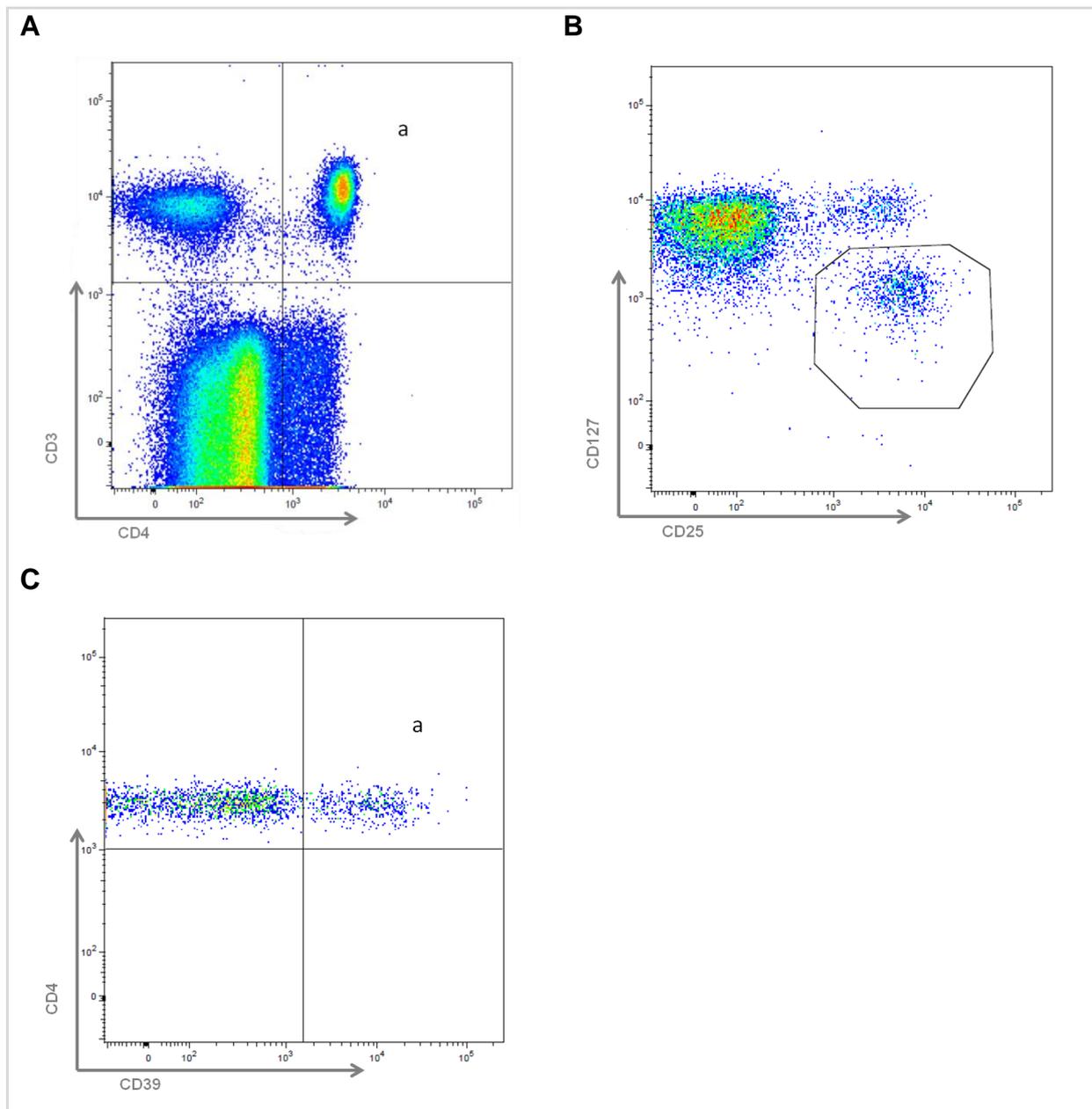


Abbildung 9 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut
A CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen (a) **B** CD25⁺CD127⁻ regulatorischen T-Zellen **C** CD39⁺ regulatorische T-Zellen (a)

In der durchflusszytometrischen Analyse der PBMCs wurde zunächst die Abgrenzung der CD25⁺CD127⁻ regulatorischen T-Zellen, wie im Vorangegangenen erläutert, vorgenommen. Darauffolgend wurden aus diesen die FoxP3⁺ Zellen bestimmt, wie Abbildung 10 A zu entnehmen ist. Anhand der Expressierung von HLA-DR und CD45RA wurden, unter anderem in Anlehnung an die Arbeit von Takahata et al. (Takahata et al. 2004), die naiven regulatorischen T-Zellen (HLA-DR⁻CD45RA⁺) von einer Zwischenstufe (HLA-DR⁻CD45RA⁻) und den reiferen aktiven regulatorischen T-Zellen (HLA-DR⁺CD45RA⁻) unterschieden, wie Abbildung 10 B zeigt.

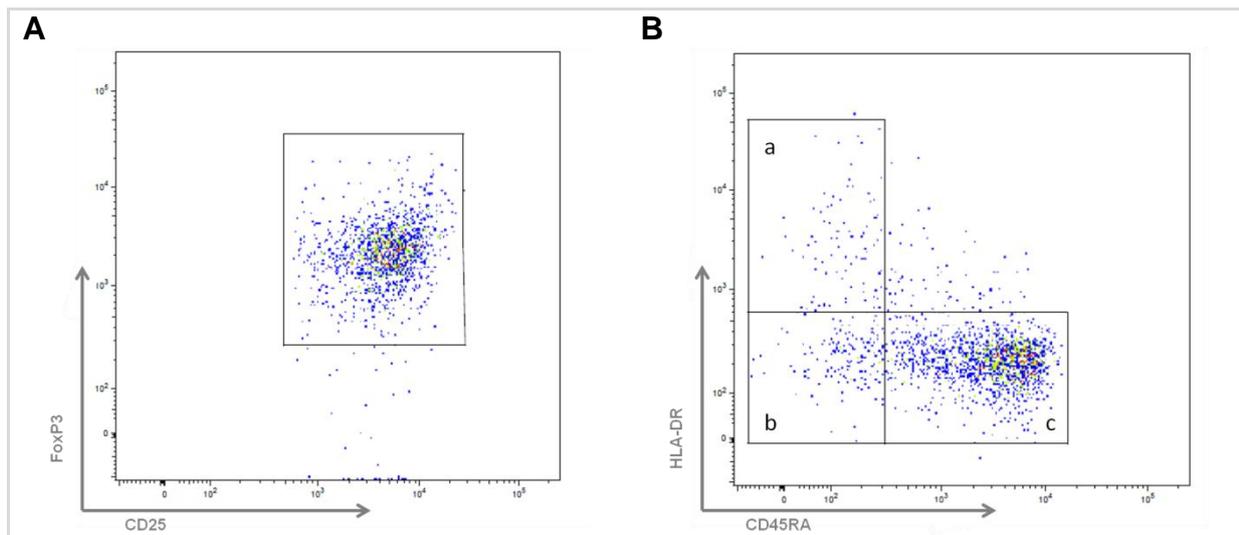


Abbildung 10 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse der aus dem Nabelschnurblut isolierten PBMCs
A FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen **B** Differenzierung der regulatorischen T-Zellen nach der Expressierung von HLA-DR und CD45RA – reife HLA-DR⁺CD45RA⁻ Zellen (a), HLA-DR⁻CD45RA⁻ (b), HLA-DR⁺CD45RA⁺ (c)

Frequenzen der regulatorischen T-Zellen

Aus den beschriebenen Analysen ergaben sich die in Tabelle 8 aufgeführten Frequenzen für die Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen, die im weiteren Verlauf für die Berechnung der Zusammenhänge genutzt wurden.

Subpopulation	Mittelwert, % (N)	Standardabweichung
CD127 ⁺ CD25 ⁺ Tregs	7,82 (35)	1,77
CD39 ⁺ Tregs	18,16 (35)	9,69
FoxP3 ⁺ Tregs	5,51 (28)	1,41
naiveHLA-DR ⁻ CD45RA ⁺ Tregs	82,90 (28)	7,18
HLA-DR ⁻ CD45RA ⁻ Tregs	10,40 (28)	5,56
HLA-DR ⁺ CD45RA ⁻ Tregs	3,01 (28)	1,97

Tabelle 8 Frequenzen der regulatorischen T-Zellsubpopulationen

Der Einfluss des Flt3L im Nabelschnurblut auf die kindlichen hämatopoetischen Stammzellen

Um den Zusammenhang zwischen dem Flt3L und dem kindlichen Immunsystem zu untersuchen, wurden Korrelationen zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen und den, anhand der Oberflächenmoleküle CD133 und CD34 differenzierten, hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen berechnet. Auf diese Weise wurde beurteilt, ob anhand einer Messung des Flt3L im Nabelschnurblut Aussagen über den Reifegrad der dort untersuchten hämatopoetischen Stammzellen möglich sind.

Die Berechnungen ergaben eine signifikant positive Korrelation zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und den Frequenzen der CD34⁺CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{mid}). Eine höhere Flt3L-Konzentration ging folglich mit einer höheren Frequenz dieser Zellen einher und umgekehrt, wie Abbildung 11 C zeigt. Außerdem zeigte sich eine negative, nicht signifikante Korrelation mit den CD34⁻CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{early}), also eine Abnahme der Frequenz dieser Zellen bei steigender Flt3L-Konzentration, wie Abbildung 11 B zu entnehmen ist. Die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut korrelierten weder mit den CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (Abbildung 11 D) noch mit den gesamten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (Abbildung 11 A). Um eine bessere Vorstellung von der Verteilung der Werte zu bekommen und später einen visuellen Vergleich mit den Korrelationen der hämatopoetischen Stammzellen und den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen zu ermöglichen, wurde hier auf eine graphische Darstellung zurückgegriffen. Die Markierung der dem vor der 37. SSW entbundenen Kind zuzuordnenden Werte (a) wurde nur vorgenommen, sofern sie sich außerhalb des Konfidenzintervalls befanden. Dies gilt ebenso für alle folgenden Abbildungen, sofern nicht anders kommentiert.

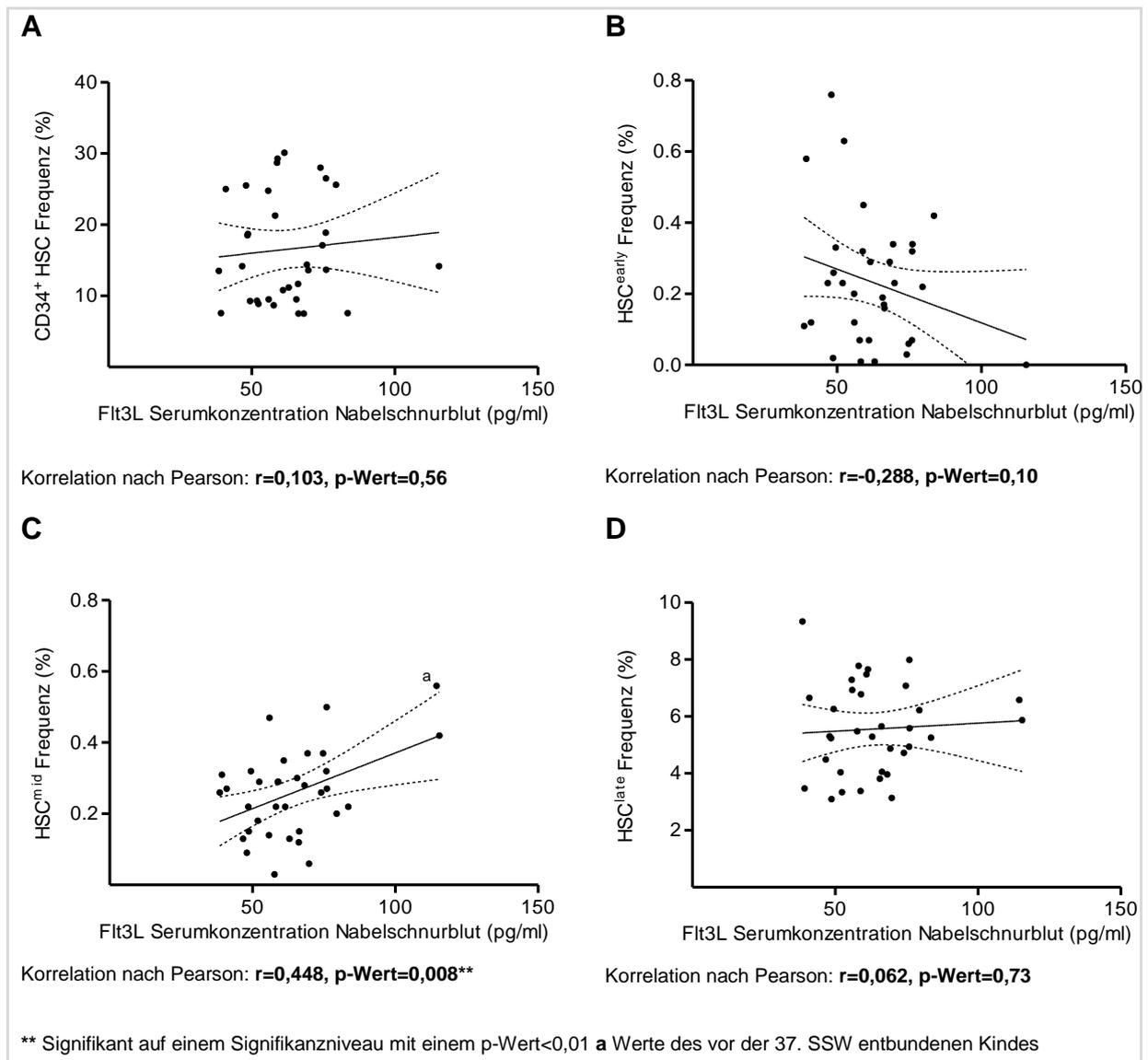


Abbildung 11 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und den CD34⁺ (A), den CD34⁻CD133⁺ (HSC^{early}) (B), den CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) (C) und den CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (D).

Weiterhin wurde untersucht, ob sich der vorab dargestellte Zusammenhang auch in der Betrachtung der Verhältnisse der Zellen zueinander zeigt. Diese Verhältnisse stellen ein relatives Maß für die Zusammensetzung der unterschiedlich reifen hämatopoetischen Stammzellen dar. Sie wurden gebildet aus den Frequenzen der unreiferen zu den reifen Zellen. Zum einen wurde das Verhältnis der CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) zu den CD34⁺CD133⁻ (HSC^{late}) und zum anderen das Verhältnis der CD34⁻CD133⁺ (HSC^{early}) zu den CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) berechnet.

Hieraus ergab sich, dass die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut positiv, aber nicht signifikant, mit dem Verhältnis der CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) zu den CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) korrelierten, wie Abbildung

12 B zeigt. Je mehr Flt3L also im Serum gemessen wurde, desto größer war auch die Frequenz der HSC^{mid} im Verhältnis zu den HSC^{late} . Zum Verhältnis der $CD34^-CD133^+$ (HSC^{early}) zu den $CD34^+CD133^-$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) bestand hingegen keine Korrelation, wie Abbildung 12 A zu entnehmen ist. Beide Ergebnisse sind, um den direkten Vergleich zu ermöglichen, graphisch dargestellt.

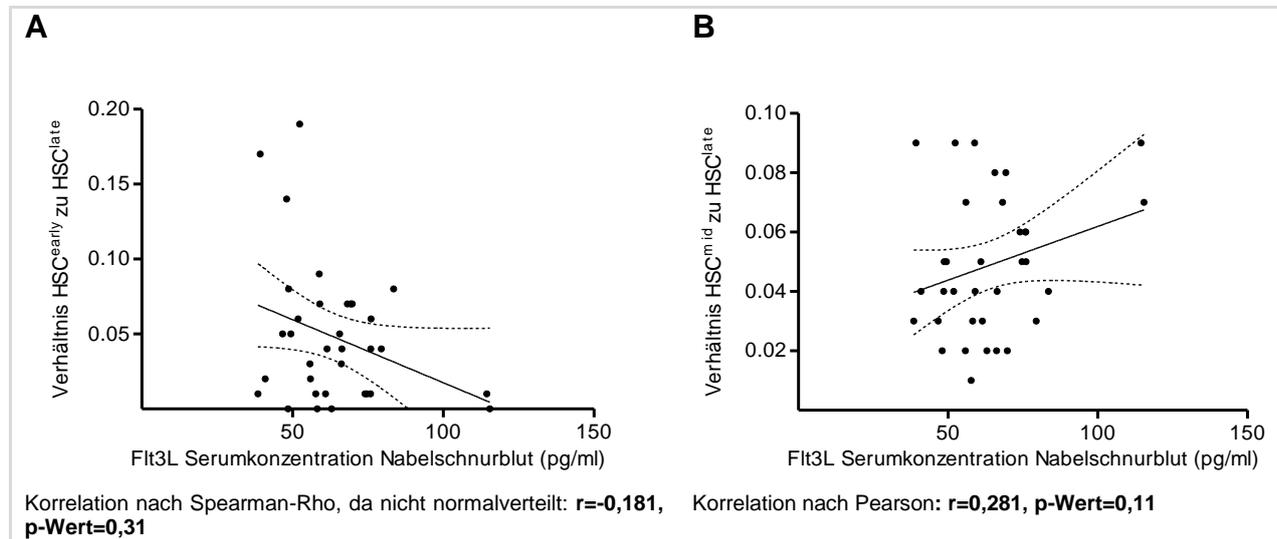


Abbildung 12 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und dem Verhältnis der $CD34^-CD133^+$ hämatopoetischen (HSC^{early}) zu den $CD34^+CD133^-$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (A) und dem Verhältnis der $CD34^+CD133^+$ (HSC^{mid}) zu den $CD34^+CD133^-$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (B)

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern die Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut mit der Expressierung des Flt3-Rezeptors (CD135) auf den hämatopoetischen Stammzellen zusammenhängen und ob sich ein Zusammenhang auch für die Grundgesamtheiten, aus denen die Subpopulationen entspringen, ergibt.

Es zeigten sich keine Korrelationen bezüglich dieser Fragestellung, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde und die Ergebnisse lediglich gesammelt in Tabelle 9 dargestellt sind.

Mit Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut korrelierte Zellpopulationen	Korrelationskoeffizient r^a	p-Wert
Gesamtheit CD45 ⁺ CD135 ⁺ Zellen	0,073	0,68
CD45 ⁺ CD135 ⁺ CD34 ⁺ HSC	0,182	0,30
CD45 ^{dim} CD135 ⁺ HSC	-0,060 ^b	0,74
CD45 ^{dim} CD38 ⁺ HSC	-0,020 ^b	0,91
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁺ HSC	0,057	0,75
CD45 ^{dim} CD38 ⁻ HSC	-0,020	0,91
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁻ HSC	0,118 ^b	0,51

a Korrelation nach Pearson, wenn nicht b

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

Tabelle 9 Zusammenhänge zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und den Subpopulationen der hämatopoetischen Stammzellen, die den Flt3-Rezeptor exprimieren und den Grundgesamtheiten, aus denen sie hervorgehen (N=34)

Der Einfluss des Flt3L im Nabelschnurblut auf die kindlichen regulatorischen T-Zellen

Um zu untersuchen, inwieweit die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut einen Einfluss auf die Differenzierung der kindlichen regulatorischen T-Zellen ausüben, wurden nun Korrelationen mit den unterschiedlich ausdifferenzierten Subpopulationen eben dieser Zellen berechnet.

Es zeigte sich hierfür kein Zusammenhang, weshalb lediglich die tabellarische Darstellung der Ergebnisse erfolgte (Tabelle 10). Auch die Verhältnisse der reiferen zu den naiven, also die Verhältnisse der HLA-DR⁻CD45RA⁻ zu den naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ und der HLA-DR⁺CD45RA⁻ zu den naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ regulatorischen T-Zellen, zeigten keine Korrelationen mit den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut, wie ebenfalls in Tabelle 10 ersichtlich wird.

Mit Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut korrelierte Subpopulation der regulatorischer T-Zellen	Korrelationskoeffizient r^a (N)	p-Wert
CD127 ⁻ CD25 ⁺ Tregs	0,166 (35)	0,34
CD39 ⁺ Tregs	-0,055 (35)	0,76
FoxP3 ⁺ Tregs als Anteil CD4 ⁺ Zellen	0,026 (28)	0,89
naiveHLA-DR ⁻ CD45RA ⁺ Tregs	0,025 (28)	0,90
HLA-DR ⁻ CD45RA ⁻ Tregs	-0,031 (28)	0,88
HLA-DR ⁺ CD45RA ⁻ Tregs	0,008 (28)	0,97
Verhältnis der HLA-DR ⁻ CD45RA ⁻ Tregs zu den naiven HLA-DR ⁻ CD45RA ⁺ Tregs	-0,013 (28)	0,95
Verhältnis der HLA-DR ⁺ CD45RA ⁻ Tregs zu den naiven HLA-DR ⁻ CD45RA ⁺ Tregs	0,035 (28)	0,86

a Korrelation nach Pearson

Tabelle 10 Zusammenhänge der Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut mit den verschiedenen regulatorischen T-Zellsubpopulationen

3.4 Der Einfluss des mütterlichen Flt3L in der Schwangerschaft auf die Reife des kindlichen Immunsystems

Der Einfluss des mütterlichen Flt3L in der Schwangerschaft auf die kindlichen hämatopoetischen Stammzellen

Um den Zusammenhang zwischen den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen und dem Reifegrad der kindlichen hämatopoetischen Stammzellen, und damit der Reife des kindlichen Immunsystems zu untersuchen, wurden ebenfalls Korrelationsberechnungen durchgeführt.

Die Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. Schwangerschaftswoche korrelierten negativ mit den Frequenzen der gesamten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut, wie Abbildung 13 A zu entnehmen ist. Es wurde jedoch keine Signifikanz erreicht (p-Wert=0,09). Weitere Korrelationen mit den anhand der Expression von CD34 und CD133 differenzierten, hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen zeigten sich nicht. Um den visuellen Vergleich mit den Korrelationen zwischen dem Flt3L im Nabelschnurblut und den hämatopoetischen Stammzellen durchführen zu können, wurde hier die graphische Darstellung einer tabellarischen vorgezogen (Abbildung 13 B-D).

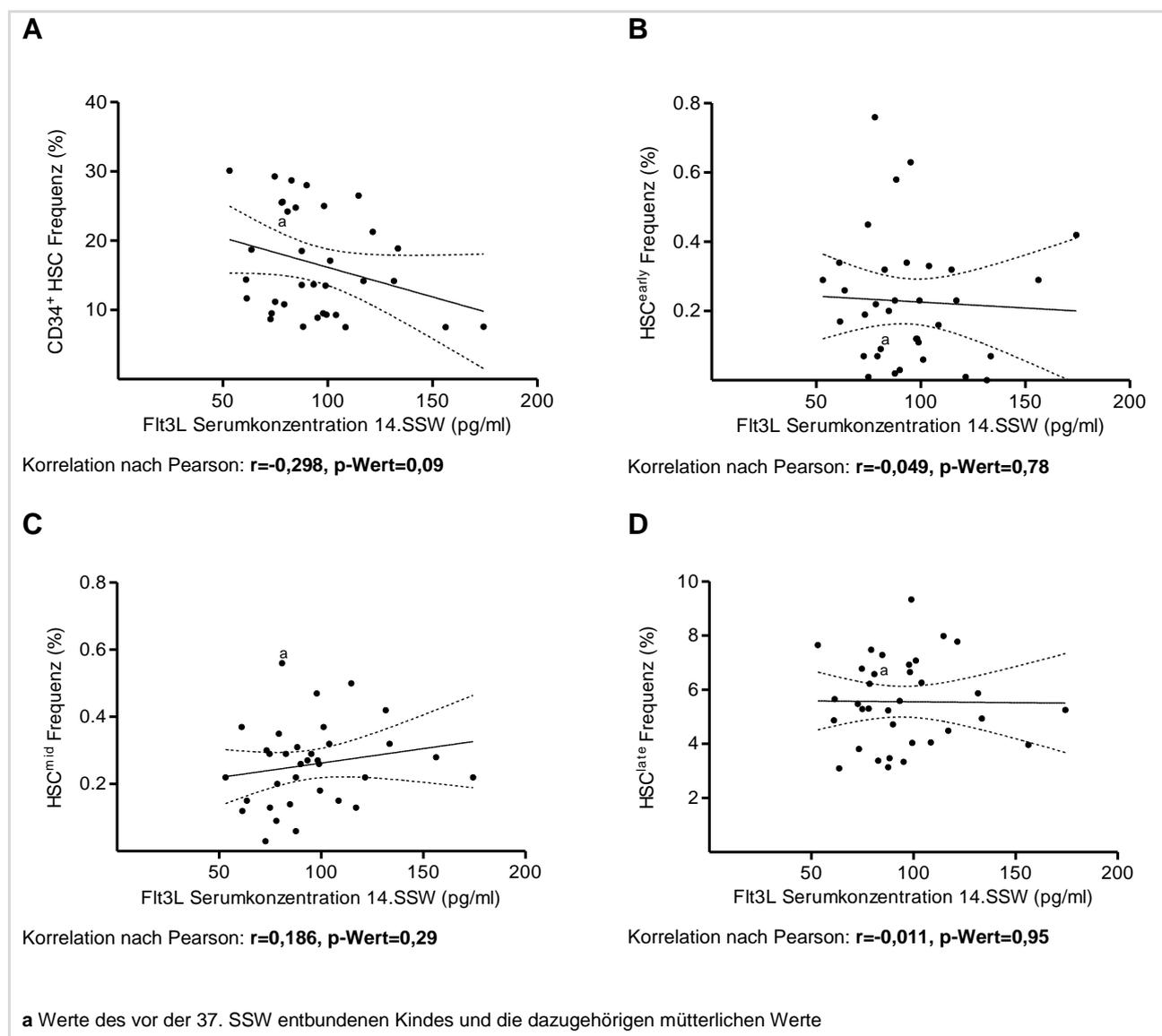


Abbildung 13 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. SSW und den gesamten CD34⁺ (A), den CD34⁺CD133⁺ (HSC^{early}) (B), den CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) (C) und den CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (D).

Auch in Bezug auf die mütterliche Flt3L-Konzentration wurde ein Zusammenhang mit den Frequenzen der CD135⁺ hämatopoetischen Stammzellen und den Grundgesamtheiten, aus denen sie hervorgehen, untersucht.

Die Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. Schwangerschaftswoche korrelierten negativ, aber nicht signifikant, mit den undifferenzierten CD45^{dim}CD34⁺CD38⁻ hämatopoetischen Stammzellen. Der Zusammenhang lässt sich Abbildung 14 entnehmen.

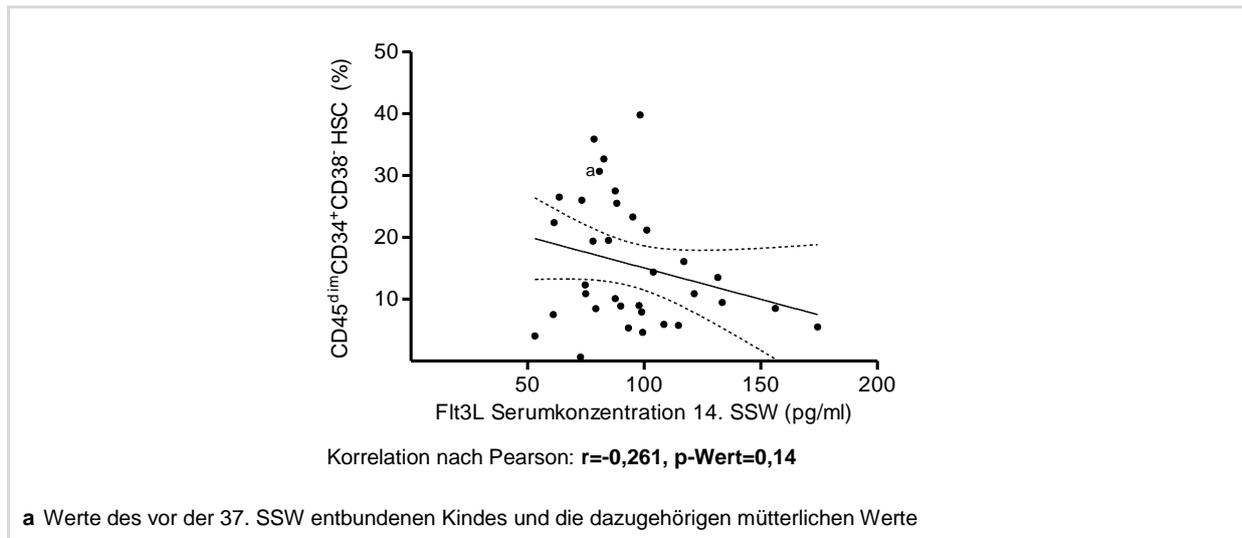
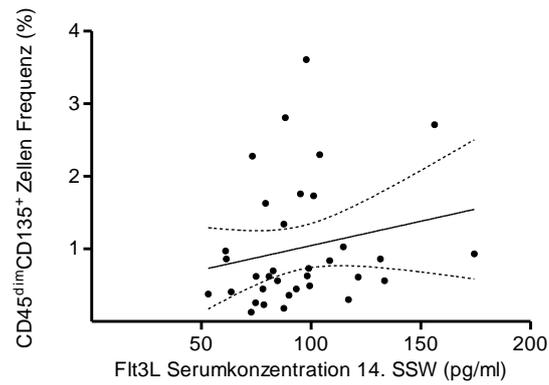
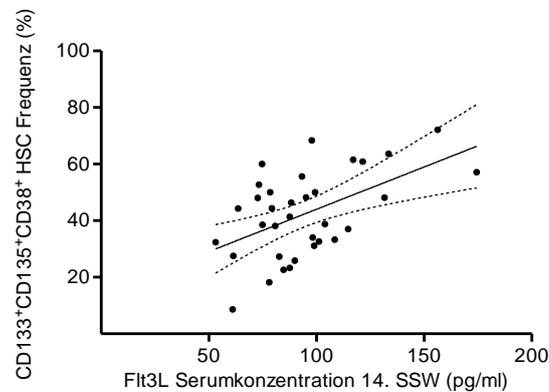


Abbildung 14 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. SSW und den CD45^{dim}CD34⁺CD38⁻ hämatopoetischen Stammzellen.

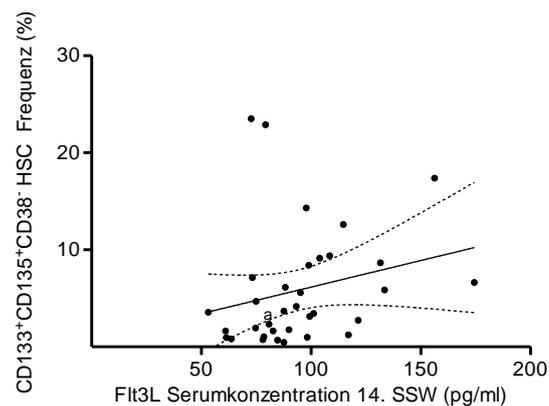
Die CD45^{dim}CD135⁺ HSC korrelierten positiv, aber nicht signifikant, mit den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. Schwangerschaftswoche, wie Abbildung 15 A zeigt. Sowohl die CD133⁺CD135⁺CD38⁺ (Abbildung 15 B) als auch die CD133⁺CD135⁺CD38⁻ hämatopoetischen Stammzellen (Abbildung 15 C) korrelierten signifikant positiv mit den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. Schwangerschaftswoche. Dies zeigte sich auch in der 24. und 36. Schwangerschaftswoche. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden jedoch nur die Ergebnisse der 14. Schwangerschaftswoche graphisch dargestellt. Die übrigen Ergebnisse finden sich gesammelt in Tabelle 11. Um einen direkten Vergleich der Berechnungen anstellen zu können, wurden auch die bereits graphisch dargestellten Ergebnisse in die Tabelle aufgenommen, auch wenn sich hieraus eine Doppelnennung ergibt.

A

Korrelation nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt:
r=0,287, p-Wert=0,10

B

Korrelation nach Pearson: **r=0,524, p-Wert=0,001****

C

Korrelation nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt:
r=0,365, p-Wert=0,03*

a Werte des vor der 37. SSW entbundenen Kindes und die dazugehörigen mütterlichen Werte * Signifikanz auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert<0,05 ** Signifikanz auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert<0,01

Abbildung 15 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. SSW und den gesamten CD45^{dim}CD135⁺ (A), den CD133⁺CD135⁺CD38⁺ (B) und den CD133⁺CD135⁺CD38⁻ hämatopoetischen Stammzellen (C).

Flt3L-Serumkonzentration	14. SSW (N=34)		24. SSW (N=32)		36. SSW (N=34)	
	r ^a	p-Wert	r ^a	p-Wert	r ^a	p-Wert
Korrelierte Zellpopulation						
CD45 ⁺ CD135 ⁺ gesamt	0,003	0,99	-0,010	0,96	-0,070 ^b	0,70
CD34 ⁻ CD133 ⁺ (HSC ^{early})	-0,049	0,78	-0,116	0,53	0,063 ^b	0,72
CD34 ⁺ CD133 ⁺ (HSC ^{mid})	0,186	0,29	0,222	0,22	0,073 ^b	0,68
CD34 ⁺ CD133 ⁻ (HSC ^{late})	-0,011	0,95	-0,001	0,99	-0,119 ^b	0,50
HSC ^{early} /HSC ^{late}	-0,102 ^b	0,57	-0,014 ^b	0,94	0,133 ^b	0,45
HSC ^{mid} /HSC ^{late}	0,163	0,36	0,179	0,33	0,118 ^b	0,51
CD34 ⁺ HSC	-0,298	0,09	-0,120	0,51	-0,117 ^b	0,51
CD45 ⁺ CD135 ⁺ CD34 ⁺ HSC	0,152	0,39	0,088	0,63	-0,025 ^b	0,89
CD45 ^{dim} CD135 ⁺ HSC	0,287 ^b	0,10	0,114 ^b	0,54	-0,028 ^b	0,88
CD45 ^{dim} CD38 ⁺ HSC	-0,060 ^b	0,74	-0,011 ^b	0,95	-0,176 ^b	0,32
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁺ HSC	0,524	<0,01**	0,479	<0,01**	0,339 ^b	0,05
CD45 ^{dim} CD38 ⁻ HSC	-0,261	0,14	-0,173	0,34	0,032 ^b	0,86
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁻ HSC	0,365 ^b	<0,05*	0,240 ^b	0,19	0,191 ^b	0,28

a Korrelation nach Pearson, wenn nicht b

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

* Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,05

** Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,01

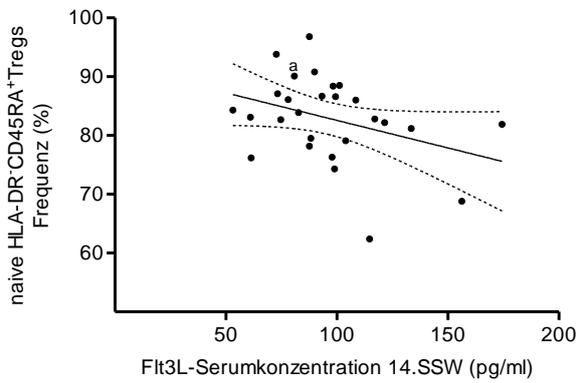
Tabelle 11 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft mit den hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen im Nabelschnurblut

Der Einfluss des mütterlichen Flt3L in der Schwangerschaft auf die Differenzierung der kindlichen regulatorischen T-Zellen

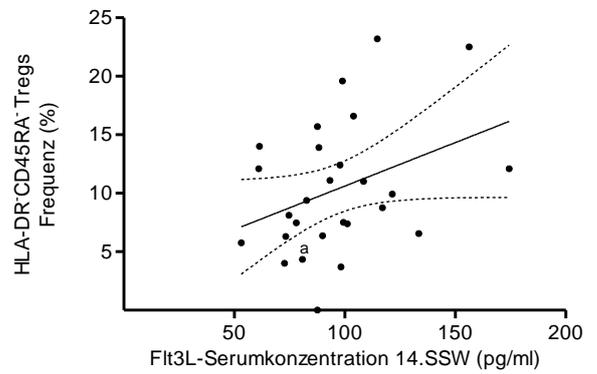
Um zu untersuchen, inwieweit die mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft auf die Differenzierung der kindlichen regulatorischen T-Zellen schließen lassen, wurden ebenfalls Korrelationen berechnet.

Die Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. Schwangerschaftswoche korrelierten negativ, jedoch nicht signifikant mit den naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ regulatorischen T-Zellen, wie Abbildung 16 A zeigt. Positive, nicht signifikante Korrelationen lagen zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. Schwangerschaftswoche und den HLA-DR⁻CD45RA⁻ (Abbildung 16 B), den HLA-DR⁺CD45RA⁻ (Abbildung 16 C),

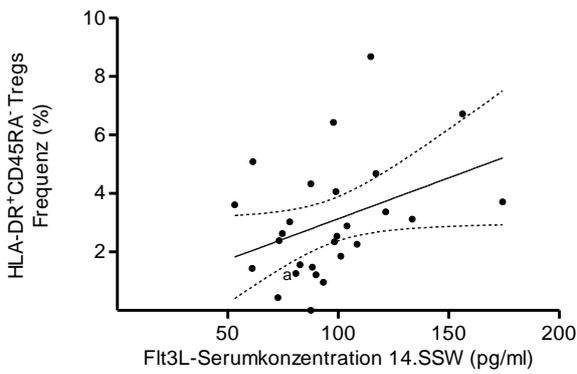
sowie den Verhältnissen der HLA-DR⁻CD45RA⁻ zu den naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ (Abbildung 16 D) und der HLA-DR⁺CD45RA⁻ zu den naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ regulatorischen T-Zellen (Abbildung 16 E) vor. Die gleichen Tendenzen zeigten sich mit den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 24. und 36. Schwangerschaftswoche. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde aber auf die graphischen Darstellungen dieser gleichartigen Tendenzen verzichtet und die Ergebnisse der Korrelationen gesammelt in Tabelle 12 dargestellt. Auch die Korrelationen der 14. Schwangerschaftswoche finden sich dort zur leichteren Vergleichbarkeit mit den übrigen Ergebnissen, auch wenn sich hieraus eine Doppelnennung ergibt.

A

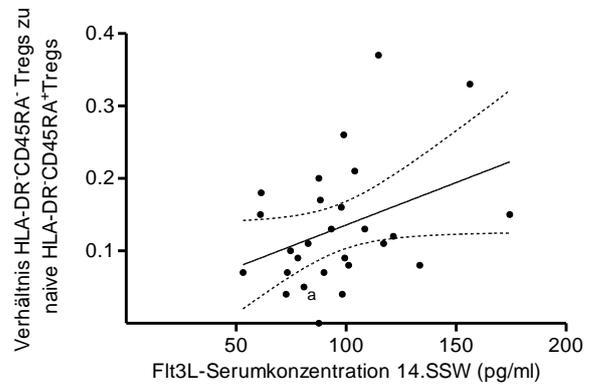
$r=-0,352$, $p\text{-Wert}=0,07$

B

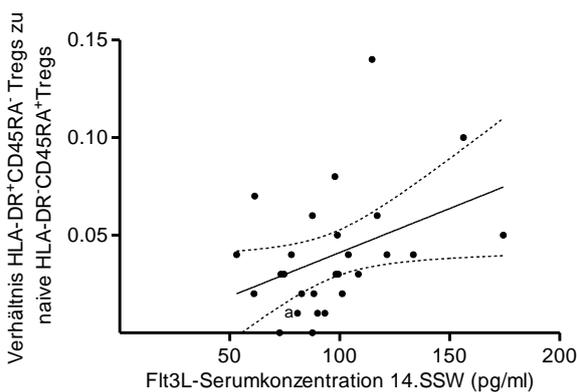
$r=0,361$, $p\text{-Wert}=0,06$

C

$r=0,383$, $p\text{-Wert}=0,05$

D

$r=0,368$, $p=0,06$

E

$r=0,378$, $p=0,05$

Korrelationen nach Pearson a Werte des vor der 37. SSW entbundenen Kindes und die dazugehörigen mütterlichen Werte

Abbildung 16 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. SSW und den naiven HLA-DR⁺CD45RA⁺ (A), den HLA-DR⁻CD45RA⁻ (B) und den HLA-DR⁺CD45RA⁻ regulatorischen T-Zellen (C), sowie dem Verhältnis aus HLA-DR⁻CD45RA⁻ und naiven HLA-DR⁺CD45RA⁺ regulatorischen T-Zellen (D) und dem Verhältnis aus HLA-DR⁺CD45RA⁻ und naiven HLA-DR⁺CD45RA⁺ regulatorischen T-Zellen (E).

Flt3L-Serumkonzentrationen	14. SSW		24. SSW		36. SSW	
	r ^a (N)	p-Wert	r ^a (N)	p-Wert	r ^b (N)	p-Wert
Korrelierte Subpopulation						
CD127⁺CD25⁺ Tregs	-0,227 (34)	0,20	-0,115 (32)	0,53	-0,107 (34)	0,55
CD39⁺ Tregs	0,216 (34)	0,22	0,180 (32)	0,32	-0,103 (34)	0,56
FoxP3⁺ Tregs	-0,221 (27)	0,27	-0,031 (25)	0,88	-0,116 (27)	0,56
Naive HLA-DR⁻CD45RA⁺ Tregs	-0,352 (27)	0,07	-0,311 (25)	0,13	-0,278 (27)	0,16
HLA-DR⁻CD45RA⁻ Tregs	0,361 (27)	0,06	0,230 (25)	0,27	0,197 (27)	0,32
HLA-DR⁺CD45RA⁻ Tregs	0,383 (27)	0,05	0,448 (25)	0,03*	0,350 (27)	0,07
HLA-DR⁻CD45RA⁻ Tregs/naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ Tregs	0,368 (27)	0,06	0,248 (25)	0,23	0,201 (27)	0,32
HLA-DR⁺CD45RA⁻ Tregs/naiven HLA-DR⁻CD45RA⁺ Tregs	0,378 (27)	0,05	0,413 (25)	0,04*	0,340 (27)	0,08

a Korrelation nach Pearson

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

* Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert <0,05

Tabelle 12 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft und den regulatorischen T-Zellsubpopulationen im Nabelschnurblut

3.5 Die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und die Reife des kindlichen Immunsystems in Abhängigkeit von Gestationsalter und kindlichem Ponderalindex

Der Flt3L im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom Gestationsalter und dem kindlichen Ponderalindex

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter der Neugeborenen sowie dem kindliche Ponderalindex und den Konzentrationen des Flt3L im Nabelschnurblut besteht, wurden auch hier Korrelationen zwischen den genannten Faktoren berechnet.

Das Gestationsalter ist hierbei angegeben als die bei Geburt abgeschlossenen Schwangerschaftswochen. Es wurde ausgehend vom Geburtstag des Neugeborenen abzüglich des Tages der letzten Menstruation der Mutter berechnet.

Um die Nachteile einer absoluten Messgröße wie der des Geburtsgewichts auszuräumen, wurde zur Betrachtung des Schwangerschaftsoutcomes der Ponderalindex gewählt. Dieser versteht sich im vorliegenden Fall als der Quotient aus dem Geburtsgewicht und der dritten Potenz der Geburtslänge.

Die Berechnungen zeigten, dass die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut negativ mit dem Gestationsalter korrelierten, wie Abbildung 17 B veranschaulicht. Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Weiterhin korrelierten die Flt3L-Serumkonzentrationen schwach negativ mit dem kindlichen Ponderalindex, was in Abbildung 17 A dargestellt ist.

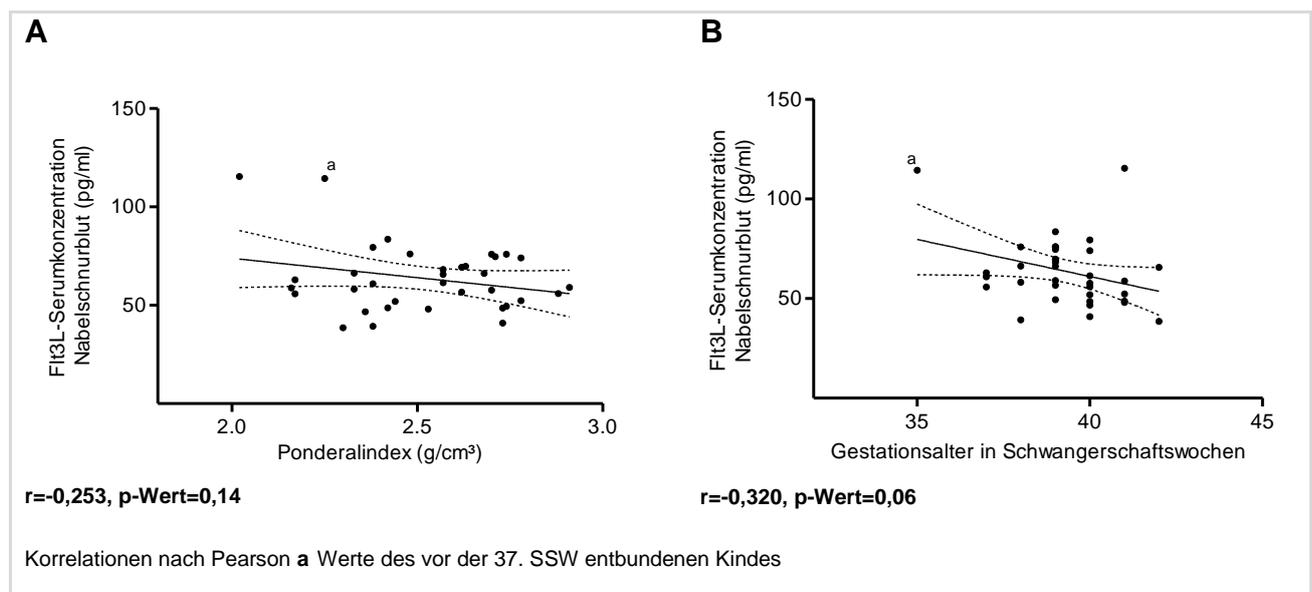


Abbildung 17 Die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom kindlichen Ponderalindex (A) und vom Gestationsalter (B)

Da im Hinblick auf einen möglichen Einfluss des Ponderalindex auf die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut keine lineare Beziehung vermutet wurde, erfolgte eine Gruppeneinteilung der Stichprobe bezüglich des betrachteten Faktors. Da es sich lediglich um eine kleine Stichprobe handelte, wurde auf eine Einteilung in Quartile zurückgegriffen, wobei das 2. und 3. Quartil zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Die einzelnen sich daraus ergebenden Grenzwerte für die Gruppeneinteilung sind Abbildung 18 zu entnehmen. Die Berechnungen ergaben

keinen signifikanten Unterschied der Flt3L-Serumkonzentrationen zwischen den verschiedenen Gruppen.

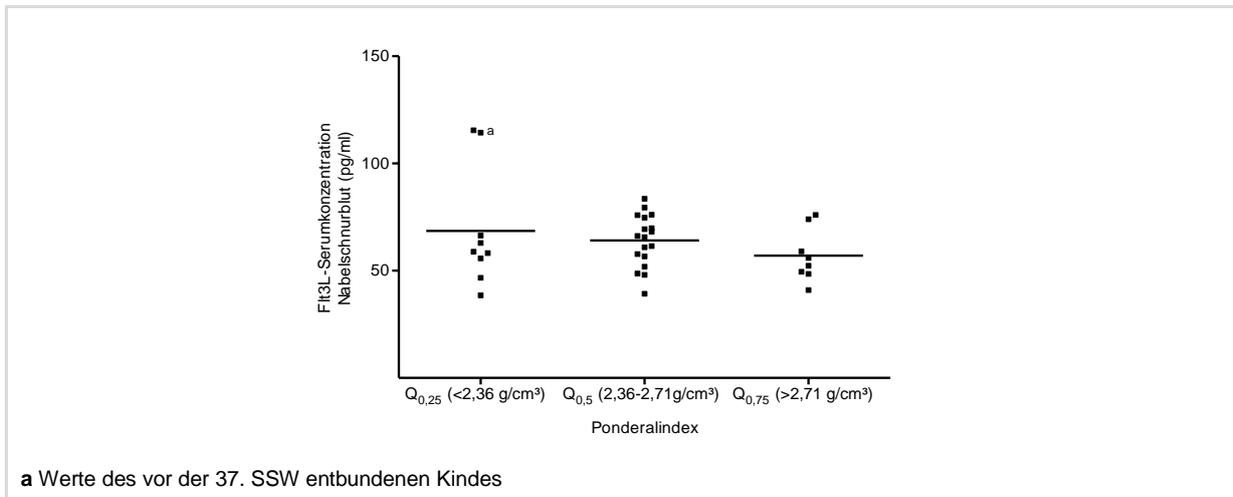


Abbildung 18 Die Flt3L-Serumkonzentration im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom kindlichen Ponderalindex Mittelwertvergleiche mittels T-Test

Der Reifegrad der hämatopoetischen Stammzellen in Abhängigkeit vom Gestationsalter und vom kindlichen kindlichen Ponderalindex

Um zu untersuchen, ob sich der angedeutete Einfluss des Gestationsalter und des kindlichen Ponderalindex auf die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut auch im Hinblick auf die Reife der hämatopoetischen Stammzellen zeigt, wurden ebenfalls Korrelationsberechnungen durchgeführt.

Es zeigte sich hierbei weder ein Zusammenhang zum kindlichen Ponderalindex, wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, noch zum Gestationsalter (Tabelle 14), weshalb auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse verzichtet wurde.

Mit dem Ponderalindex korrelierte Zellpopulation	r ^a	p-Wert
CD45 ⁺ CD135 ⁺ gesamt	0,014	0,94
CD34 ⁻ CD133 ⁺ HSC (HSC ^{early})	0,169	0,34
CD34 ⁺ CD133 ⁺ HSC (HSC ^{mid})	0,094	0,60
CD34 ⁺ CD133 ⁻ HSC (HSC ^{late})	0,012	0,95
Verhältnis HSC ^{early} zu HSC ^{late}	0,122 ^b	0,53
Verhältnis HSC ^{mid} zu HSC ^{late}	0,029	0,87
CD34 ⁺ HSC	0,025	0,89
CD45 ⁺ CD135 ⁺ CD34 ⁺ HSC	-0,131	0,46
CD45 ^{dim} CD135 ⁺ HSC	-0,151 ^b	0,39
CD45 ^{dim} CD38 ⁺ HSC	-0,016 ^b	0,93
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁺ HSC	0,097	0,59
CD45 ^{dim} CD38 ⁻ HSC	-0,133	0,45
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁻ HSC	0,118 ^b	0,51

a Korrelationen nach Pearson, wenn nicht b

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

Tabelle 13 Zusammenhang zwischen kindlichem Ponderalindex und den Frequenzen der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen (N=34)

Mit dem Gestationsalter korrelierte Zellpopulation	r ^a	p-Wert
CD45 ⁺ CD135 ⁺ gesamt	-0,162	0,36
CD34 ⁻ CD133 ⁺ HSC (HSC ^{early})	0,163	0,30
CD34 ⁺ CD133 ⁺ HSC (HSC ^{mid})	-0,222	0,21
CD34 ⁺ CD133 ⁻ HSC (HSC ^{late})	-0,226	0,20
Verhältnis HSC ^{early} zu HSC ^{late}	0,173 ^b	0,34
Verhältnis HSC ^{mid} zu HSC ^{late}	0,012	0,95
CD34 ⁺ HSC	-0,016	0,93
CD45 ⁺ CD135 ⁺ CD34 ⁺ HSC	-0,033	0,85
CD45 ^{dim} CD135 ⁺ HSC	-0,110 ^b	0,54
CD45 ^{dim} CD38 ⁺ HSC	-0,081 ^b	0,65
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁺ HSC	0,037	0,84
CD45 ^{dim} CD38 ⁻ HSC	0,081	0,65
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁻ HSC	-0,100 ^b	0,57

a Korrelationen nach Pearson, wenn nicht b

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

Tabelle 14 Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und den Frequenzen der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen (N=34)

3.6 Der Einfluss mütterlicher Faktoren auf den Flt3L und die Reife des kindlichen Immunsystems

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sowohl die Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft als auch jene im Nabelschnurblut und die Reife des kindlichen Immunsystems durch verschiedene mütterliche Faktoren beeinflusst werden. Hierbei wurden zum einen Parameter wie das mütterliche Alter, der mütterliche BMI und die Gewichtszunahme in der Schwangerschaft betrachtet und zum anderen der Einfluss des mütterlichen Stresses in der Schwangerschaft untersucht.

Der Einfluss mütterlicher Faktoren auf die mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft

Um den Einfluss des mütterlichen Alters, des mütterlichen BMIs und der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft auf die mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen zu untersuchen, wurden Korrelationsberechnungen durchgeführt.

Hierbei ergab sich eine positive, nicht signifikante Korrelation zwischen den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen in der 36. Schwangerschaftswoche und der prozentual zum Ausgangsgewicht bestimmten mütterlichen Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, wie Abbildung 19 verdeutlicht.

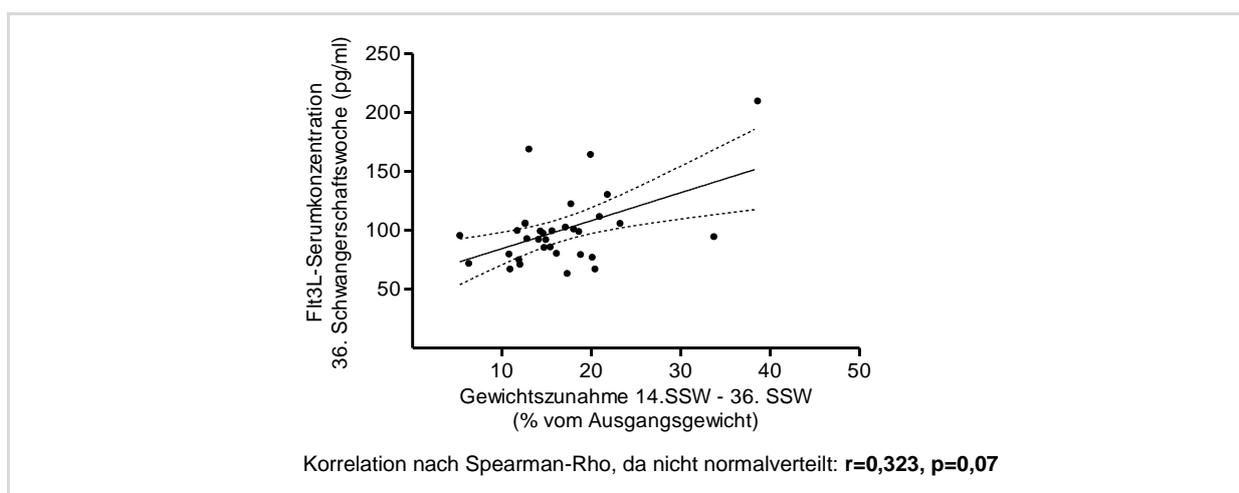


Abbildung 19 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen in der 36. SSW und der prozentual zum Ausgangsgewicht berechneten Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, $((\text{Gewicht } 36. \text{ SSW} - \text{Gewicht } 14. \text{ SSW}) / \text{Gewicht } 14. \text{ SSW})$.

Es zeigte sich weder eine Korrelation zwischen den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft und dem mütterlichen Alter noch dem mütterlichen BMI zu den entsprechenden Zeitpunkten, weshalb auf eine graphische Darstellung zu Gunsten der Übersichtlichkeit verzichtet wurde. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 14.

	Flt3L-Serumkonzentration, Zeitpunkt (N)	r^a	p-Wert
Mütterliches Alter			
	14. Schwangerschaftswoche (34)	0,195	0,27
	24. Schwangerschaftswoche (32)	0,225	0,22
	36. Schwangerschaftswoche (34)	0,225 ^b	0,20
Mütterlicher BMI^c			
14. SSW	14. Schwangerschaftswoche (34)	-0,020	0,91
24. SSW	24. Schwangerschaftswoche (31)	0,100	0,59
36. SSW	36. Schwangerschaftswoche (33)	-0,091 ^b	0,62

a Korrelation nach Pearson, wenn nicht b

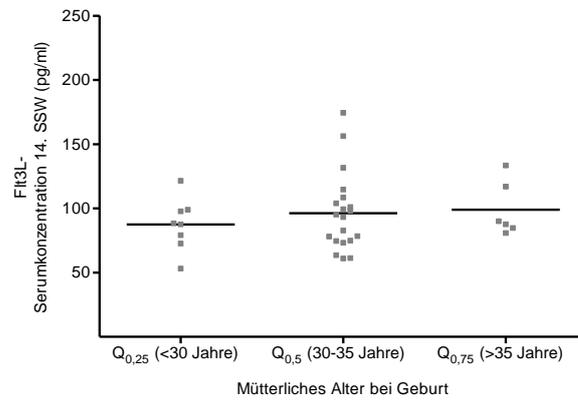
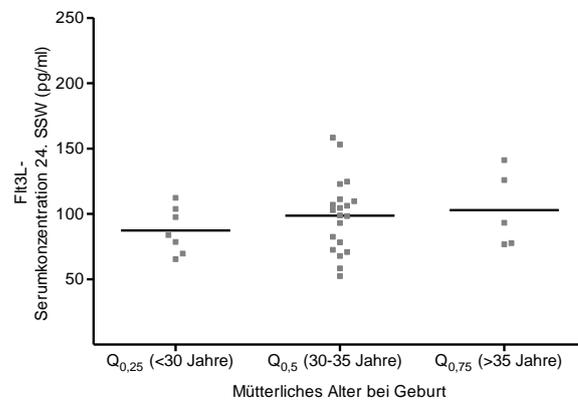
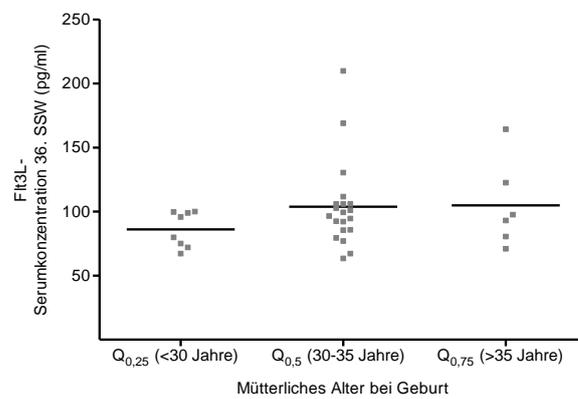
b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

c BMI, kg/m²

Tabelle 14 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen (pg/ml) in der Schwangerschaft und dem mütterlichen Alter sowie dem mütterlichen BMI in der Schwangerschaft

Da eine Linearität im Hinblick auf einen potenziellen Einfluss des mütterlichen Alters nicht zu vermuten ist, wurde zudem ein Gruppenvergleich angestellt. Bezüglich des Alters erfolgte die Einteilung der Gruppen in Quartile. Die Grenzwerte sind den folgenden Abbildungen zu entnehmen.

In den verschiedenen Altersgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft, wie Abbildung 20 A-C verdeutlicht.

A**B****C**

Gruppenvergleich mittels T-Test.

Abbildung 20 Flt3L-Serumkonzentrationen in der 14. (A), 24. (B) und 36. Schwangerschaftswoche (C) in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter.

Der Einfluss mütterlicher Faktoren auf die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut

Um nun den Einfluss mütterlicher Faktoren auf die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut zu untersuchen, wurden Korrelationen zwischen eben diesen, dem mütterlichen Alter, dem mütterlichen BMI und der prozentualen Gewichtszunahme in der Schwangerschaft berechnet.

Es zeigten sich keine Korrelationen zwischen den einzelnen Faktoren. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 15.

Flt3L-Serumkonzentration Nabelschnurblut Korrelierte mütterliche Einflussgrößen	Korrelationskoeffizient r^b (N)	p-Wert
Mütterliches Alter	0,218 (35)	0,21
Mütterlicher BMI^a		
14. SSW	-0,146 (35)	0,40
24. SSW	-0,150 (34)	0,40
36. SSW	-0,180 (34)	0,31
%Gewichtszunahme^c	-0,028 (34)	0,88

a BMI, kg/m²

b Korrelationen nach Pearson

c % Gewichtszunahme, Gewichtszunahme prozentual zum Ausgangsgewicht (Gewicht 36.SSW-Gewicht 14. SSW)

Tabelle 15 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und dem mütterlichen Alter, dem mütterlichen BMI und der prozentual zum Ausgangsgewicht berechneten mütterlichen Gewichtszunahme in der Schwangerschaft

Da im Hinblick auf einen möglichen Einfluss des mütterlichen Alters auf die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut keine lineare Beziehung vermutet wurde, erfolgte eine Gruppeneinteilung der Stichprobe. Da es sich lediglich um eine kleine Stichprobe handelte, wurde auch hier auf eine Einteilung in Quartile zurückgegriffen. Die sich so ergebenden Grenzwerte für die Gruppeneinteilung sind der folgenden Abbildung zu entnehmen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut zwischen den verschiedenen mütterlichen Altersgruppen gezeigt werden, was Abbildung 21 veranschaulicht.

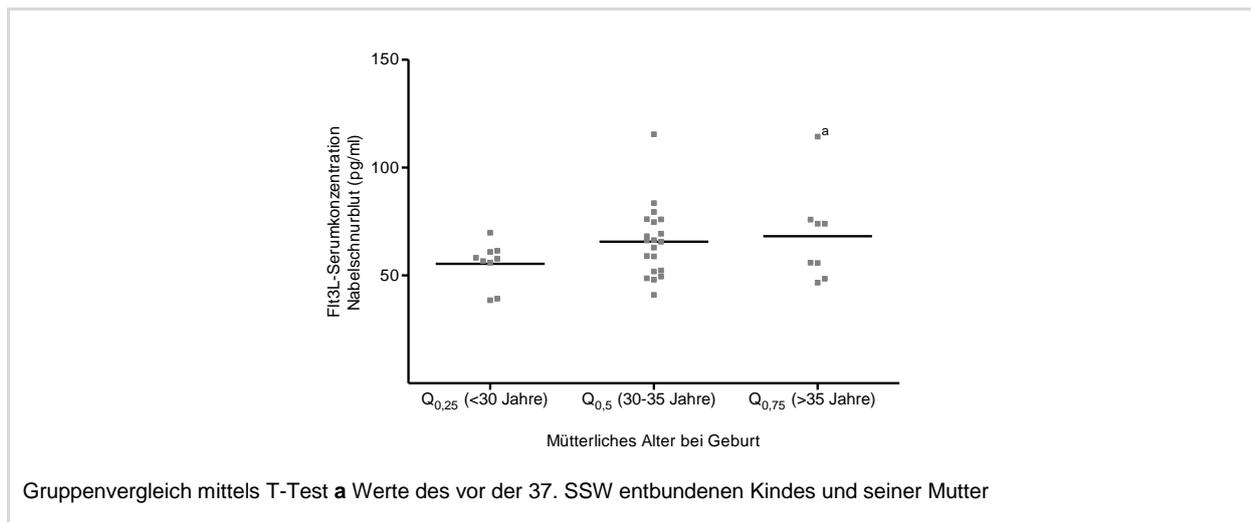


Abbildung 21 Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter.

Der Einfluss der mütterlichen Gewichtszunahme in der Schwangerschaft auf die hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut

Da eine positive Korrelation zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen der 36. Schwangerschaftswoche und der prozentual zum Ausgangsgewicht berechneten Gewichtszunahme in der Schwangerschaft gezeigt wurde, wurde nun der Zusammenhang zwischen der Gewichtszunahme und den hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut mittels Korrelationsberechnungen untersucht.

Diese ergaben eine signifikant positive Korrelation zwischen der mütterlichen Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, prozentual zum Ausgangsgewicht berechnet, und den HSC^{early}, wie Abbildung 22 A zu entnehmen ist. Außerdem korrelierte die Gewichtszunahme in der Schwangerschaft schwach negativ mit den CD45^{dim}CD38⁻ hämatopoetischen Stammzellen, was Abbildung 22 B zeigt.

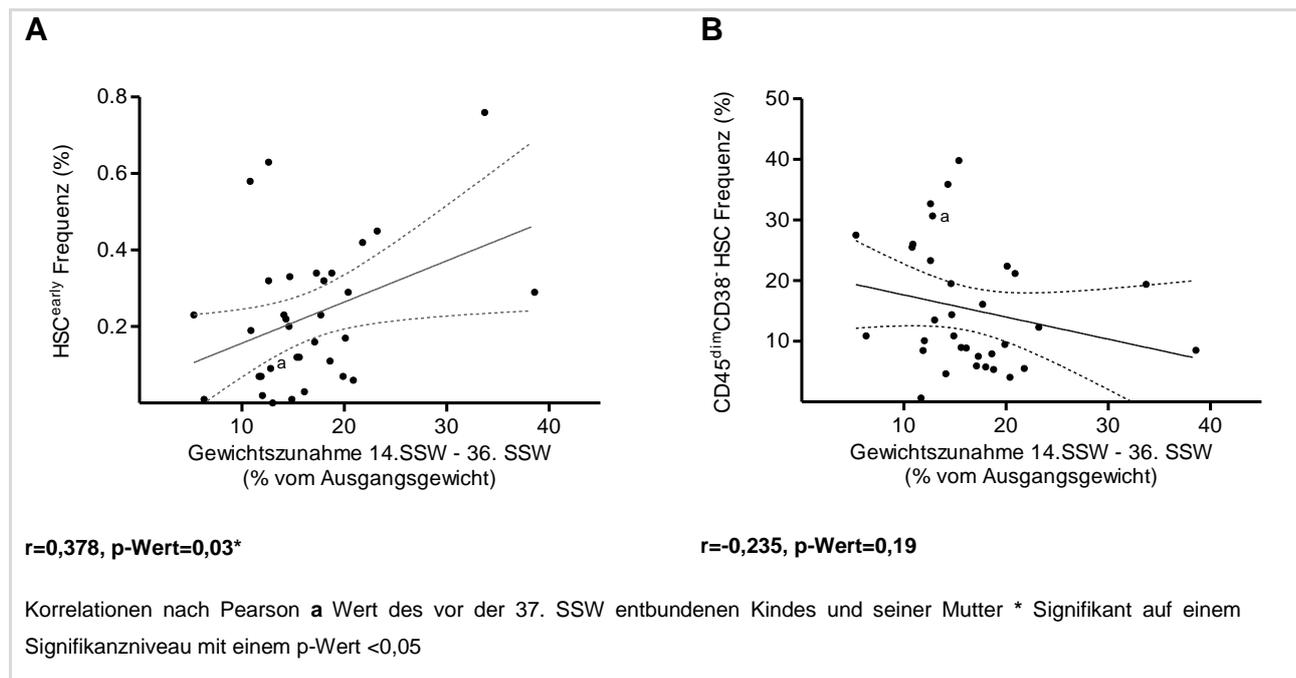


Abbildung 22 Zusammenhang zwischen der prozentual zum Ausgangsgewicht bestimmten Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und den Frequenzen der CD34⁺CD133⁺ (HSC^{early}) (A) bzw. den CD45^{dim}CD38⁺ hämatopoetischen Stammzellen (B).

Weitere Korrelationen zeigten sich nicht, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 16. Die Werte der bereits graphisch dargestellten Korrelationen sind für eine bessere Vergleichbarkeit ebenfalls in die Tabelle aufgenommen worden, auch wenn sich hieraus eine Doppelnennung ergibt.

Mit der prozentualen Gewichtszunahme korrelierte Zellpopulation	r ^a	p-Wert
CD45 ⁺ CD135 ⁺ gesamt	-0,069	0,70
CD34 ⁻ CD133 ⁺ HSC (HSC ^{early})	0,378	0,03
CD34 ⁺ CD133 ⁺ HSC (HSC ^{mid})	-0,026	0,89
CD34 ⁺ CD133 ⁻ HSC (HSC ^{late})	0,049	0,79
Verhältnis HSC ^{early} zu HSC ^{late}	0,164	0,36
Verhältnis HSC ^{mid} zu HSC ^{late}	-0,055	0,76
CD34 ⁺ HSC	0,074	0,68
CD45 ⁺ CD135 ⁺ CD34 ⁺ HSC	-0,204	0,26
CD45 ^{dim} CD135 ⁺ HSC	-0,047 ^b	0,80
CD45 ^{dim} CD38 ⁺ HSC	0,070	0,70
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁺ HSC	0,098	0,59
CD45 ^{dim} CD38 ⁻ HSC	-0,235	0,19
CD133 ⁺ CD135 ⁺ CD38 ⁻ HSC	-0,039 ^b	0,83

a Korrelationen nach Pearson, wenn nicht b

b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

Tabelle 16 Zusammenhang zwischen der prozentual zum Ausgangsgewicht bestimmten Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und den Frequenzen der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen (N=33)

Der Einfluss des in der Schwangerschaft wahrgenommenen mütterlichen Stresses auf den Flt3L und die kindlichen hämatopoetischen Stammzellen

Um den Einfluss des mütterlichen Stresses zu verschiedenen Zeitpunkten in der Schwangerschaft sowohl auf den mütterlichen als auch den kindlichen Flt3L und das kindliche Immunsystem zu untersuchen, wurde der wahrgenommene mütterliche Stress anhand des Stress-CAT Fragebogens in der 14., 24. und 36. Schwangerschaftswoche erhoben. Die berechneten Scores wurden anschließend mit den genannten Parametern korreliert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

Die mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen in der Schwangerschaft in Abhängigkeit vom mütterlichen Stress

Es zeigten sich keine Korrelationen zwischen den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen und dem wahrgenommenen Stress in der Schwangerschaft, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 17.

Flt3L-Serumkonzentrationen und korrelierter Mütterlicher Stress	r^a (N)	p-Wert
Stress-CAT		
Flt3L 14. SSW und Stress-CAT-Score 14. SSW	-0,171 (33)	0,34
Flt3L 24. SSW und Stress-CAT-Score 14. SSW	-0,113 (31)	0,54
Flt3L 24. SSW und Stress-CAT-Score 24. SSW	0,058 (32)	0,75
Flt3L 36. SSW und Stress-CAT-Score 14. SSW	0,012 ^b (33)	0,95
Flt3L 36. SSW und Stress-CAT-Score 24. SSW	0,040 ^b (34)	0,82
Flt3L 36. SSW und Stress-CAT-Score 36. SSW	0,053 ^b (34)	0,77

a Korrelation nach Pearson, wenn nicht b

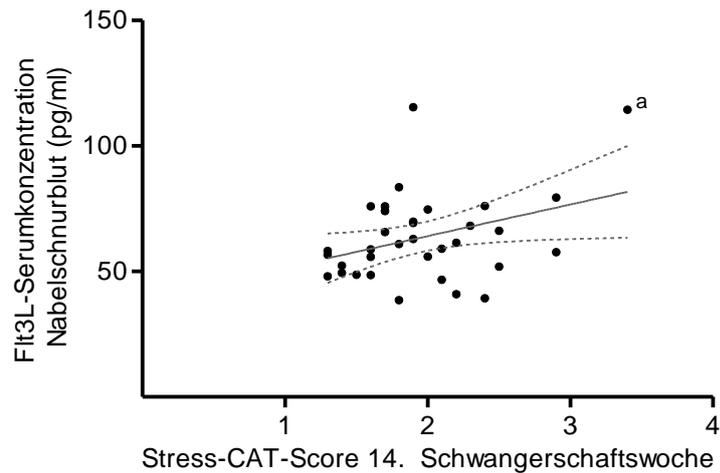
b Korrelationen nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt

Tabelle 17 Zusammenhang der Flt3L-Serumkonzentrationen (pg/ml) in der Schwangerschaft mit dem erlebten mütterlichen Stress in der Schwangerschaft

Der Einfluss des in der Schwangerschaft wahrgenommenen mütterlichen Stresses auf die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut

Der wahrgenommene Stress (Stress-CAT Score) in der 14. Schwangerschaftswoche korrelierte signifikant positiv mit den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut, wie Abbildung 23 zu entnehmen ist.

Zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und den verschiedenen Stress-Scores in der 24. und 36. Schwangerschaftswoche zeigten sich keine Korrelationen, weshalb auf weitere graphische Darstellung verzichtet wurden und die Ergebnisse lediglich in Tabelle 18 dargestellt sind.



Korrelation nach Pearson: $r=0,354$, $p\text{-Wert}=0,04^*$

a Werte des vor der 37. SSW entbundenen Kindes und seiner Mutter * Signifikant auf einem Signifikanzniveau mit einem $p\text{-Wert}<0,05$

Abbildung 23 Zusammenhang zwischen den Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut und dem Stress-CAT-Score in der 14. Schwangerschaftswoche.

Flt3L-Serumkonzentrationen Nabelschnurblut korreliert mit mütterlichem Stress	r^a (N)	p-Wert
Stress-CAT		
24. SSW	0,129 (35)	0,46
36. SSW	0,210 (35)	0,23

a Korrelation nach Pearson

Tabelle 18 Korrelationen der Flt3L-Serumkonzentrationen (pg/ml) im Nabelschnurblut mit dem wahrgenommenen bzw. erlebten mütterlichen Stress in der 24. und 36. Schwangerschaftswoche

Da für die Einteilung der Stress-Scores in gestresste und nicht gestresste Individuen keine festgelegten Grenzwerte existieren, wurde hier zusätzlich eine Einteilung in Quartile vorgenommen, um zu untersuchen, ob sich die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut von Kindern mit stark und weniger stark gestressten Müttern unterscheiden. Die Grenzwerte, die nun die Gruppeneinteilung definieren, sind Abbildung 24 zu entnehmen.

Es zeigte sich ein marginal signifikanter Unterschied der Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut zwischen der niedrig (Stress-CAT-Score 14. Schwangerschaftswoche) und der mäßig gestressten Gruppe (Stress-CAT-Score 14. Schwangerschaftswoche), sowie zwischen der niedrig (Stress-CAT-Score 14.

Schwangerschaftswoche) und der stark gestressten Gruppe (Stress-CAT-Score 14. Schwangerschaftswoche), wie in Abbildung 24 dargestellt ist.

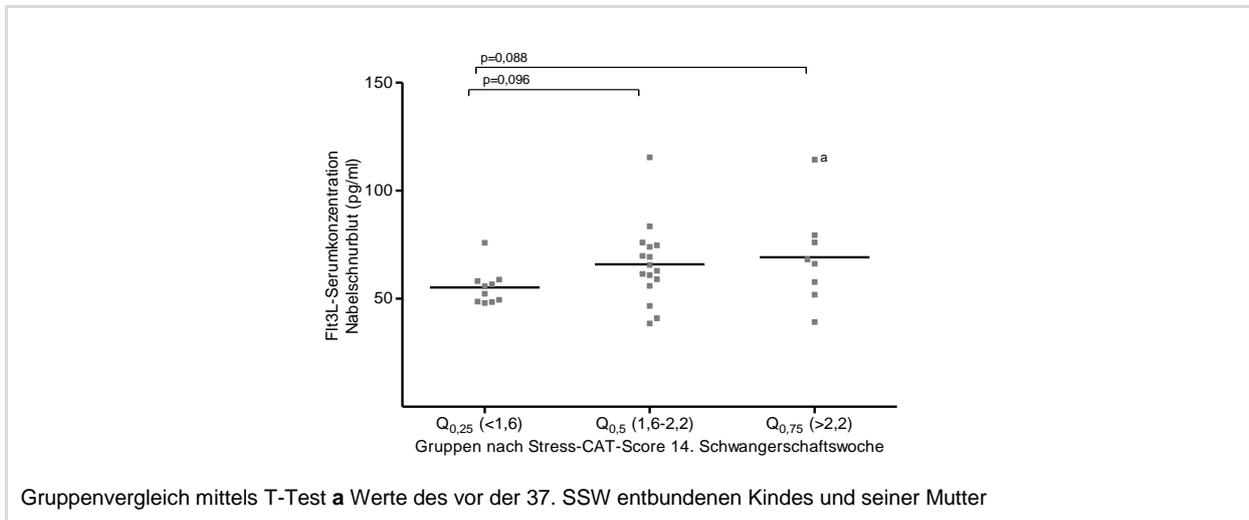


Abbildung 24 Die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom mütterlichen Stress in der 14. Schwangerschaftswoche (Stress-CAT-Score).

Es konnte darüber hinaus kein signifikanter Unterschied der Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut in den verschiedenen Stress-Gruppen in der 24. und 36. Schwangerschaftswoche (Stress-CAT-Score 24. und 36. Schwangerschaftswoche) gezeigt werden (Abbildung 25 A und B).

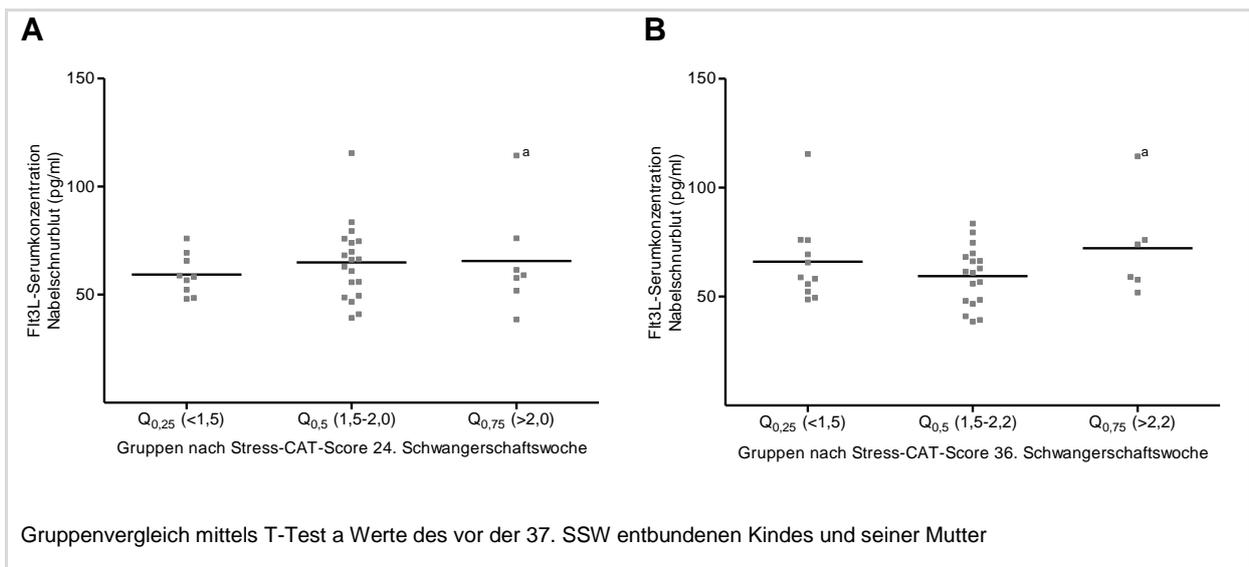
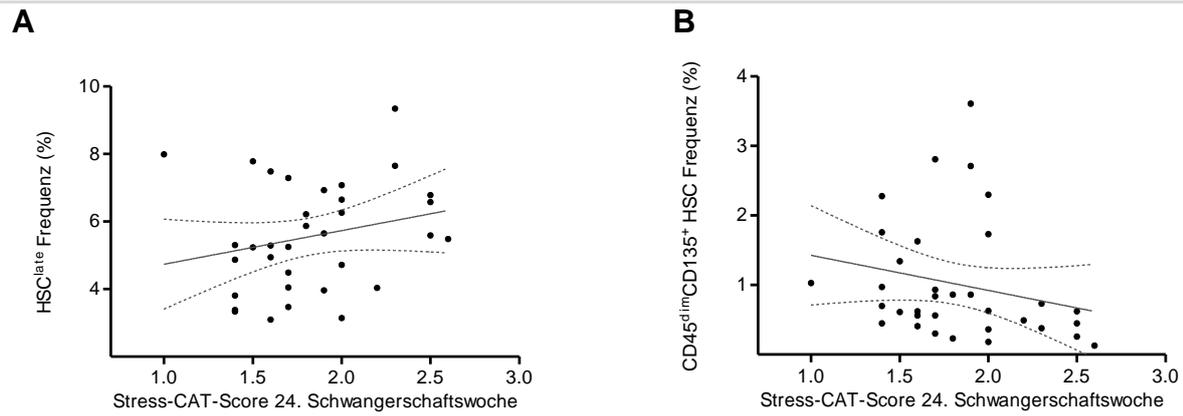


Abbildung 25 Die Flt3L-Serumkonzentrationen im Nabelschnurblut in Abhängigkeit vom mütterlichen Stress (Stress-CAT-Score) in der 24. (A) und 36. Schwangerschaftswoche (B).

Der Einfluss des mütterlichen Stresses in der Schwangerschaft auf die Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen im Nabelschnurblut

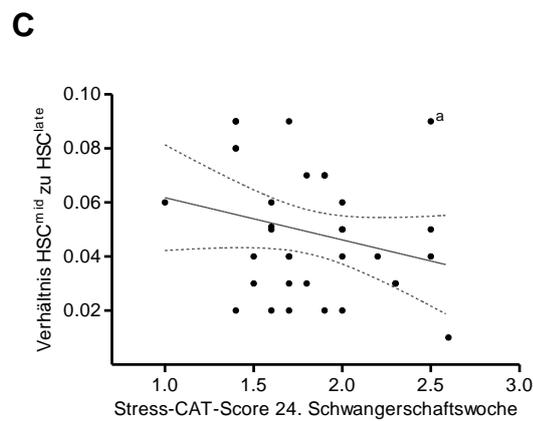
Um abschließend den Einfluss des in der Schwangerschaft wahrgenommenen mütterlichen Stresses auf die Reife der hämatopoetischen Stammzellsubpopulationen zu untersuchen, wurden Korrelationsberechnungen mit den oben genannten Scores des Stress-CAT in der 14., 24. und 36. Schwangerschaftswoche mit den Subpopulationen der hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt.

Es zeigte sich hierbei eine schwach positive Korrelation zwischen dem Stress-CAT-Score in der 24. Schwangerschaftswoche und den CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (Abbildung 26 A) und eine signifikant negative Korrelation mit den CD45^{dim}CD135⁺ hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut (Abbildung 26 B). Schwach negativ korrelierten der Stress-CAT-Score in der 24. Schwangerschaftswoche mit dem Verhältnis der CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) und der CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (Abbildung 26 C). Der Stress-CAT-Score in der 36. Schwangerschaftswoche korrelierte negativ, jedoch nicht signifikant, mit den CD45^{dim}CD135⁺ hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut (Abbildung 26 D) und schwach negativ mit dem Verhältnis der CD34⁻CD133⁺ (HSC^{early}) und CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) (Abbildung 26 E).

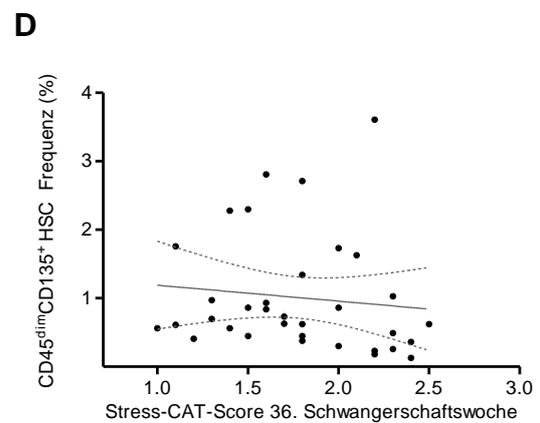


Korrelation nach Pearson: $r=0,238$, $p\text{-Wert}=0,18$

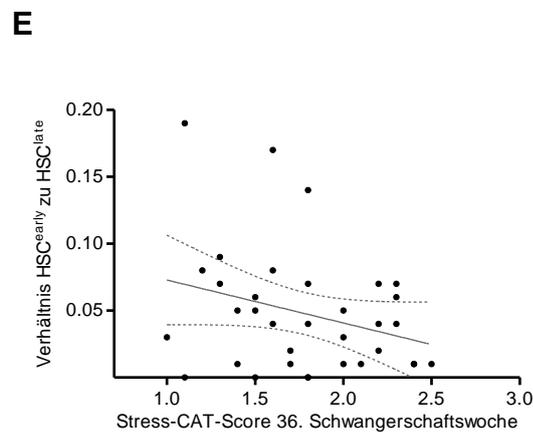
Korrelation nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt: $r=-0,355$, $p\text{-Wert}=0,04$



Korrelation nach Pearson: $r=-0,267$, $p\text{-Wert}=0,13$



Korrelation nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt: $r=-0,280$, $p=0,11$



Korrelation nach Spearman-Rho, da nicht normalverteilt: $r=-0,235$, $p=0,18$

Abbildung 26 Zusammenhang zwischen dem mütterlichem Stress in der 24. Schwangerschaftswoche und den $CD34^+CD133^-$ (HSC^{late}) (A), den $CD45^{dim}CD135^+$ hämatopoetischen Stammzellen (B) und dem Verhältnis der $CD34^+CD133^+$ (HSC^{mid}) und $CD34^+CD133^-$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) im Nabelschnurblut (C), dem mütterlichen Stress in der 36. Schwangerschaftswoche und den $CD45^{dim}CD135^+$ hämatopoetischen Stammzellen (D) bzw. mit dem Verhältnis der $CD34^+CD133^+$ (HSC^{early}) und $CD34^+CD133^-$ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) im Nabelschnurblut (E).

4. Diskussion

Das kindliche Immunsystem entwickelt sich bereits früh in der Schwangerschaft (Ygberg und Nilsson 2012) und steht schon während dieser Zeit unter dem Einfluss äußerer Umstände. Wichtig nicht nur für die Entwicklung und Regulation der Hämatopoese sondern auch des Immunsystems und der Immunantwort sind der hämatopoetische Wachstumsfaktor Flt3L und sein Rezeptor (Antonysamy und Thomson 2000, Weisel et al. 2009). Forschungsarbeiten zum Flt3L in der Schwangerschaft und zum Zeitpunkt der Geburt sind jedoch rar, weshalb in der vorliegenden Arbeit eben jener Aspekt untersucht wurde. Nicht nur die Beziehung von mütterlichem und kindlichem Flt3L zueinander, sondern auch zu den Immunzellen im Nabelschnurblut wurde beleuchtet. Gleichsam wurden potenzielle Einflussfaktoren auf den Flt3L untersucht.

Die Flt3L-Konzentrationen wurden mittels ELISA im Blut von 35 Studienteilnehmerinnen zu drei Zeitpunkten in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut ihrer Kinder bestimmt. Die mütterlichen Serumkonzentrationen des Flt3L lagen hierbei während der gesamten Schwangerschaft signifikant höher als jene Konzentrationen im Nabelschnurblut. Die mütterlichen Werte im Verlauf der Schwangerschaft unterschieden sich hingegen nicht signifikant zu den verschiedenen Zeitpunkten. Gleichwohl korrelierten die Konzentrationen der einzelnen Messzeitpunkte aber positiv miteinander. Auch die mütterlichen und kindlichen Werte korrelierten schwach positiv miteinander, wobei jedoch hier keine Signifikanz erreicht wurde. In der Literatur finden sich bisher noch keine Arbeiten, in denen der Flt3L während der gesamten Schwangerschaft untersucht wurde. Die Arbeit von Gonzalez et al. betrachtet allerdings den mütterlichen Flt3L kurz nach Geburt und jenen im Nabelschnurblut. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten sich dort weit höhere Plasmakonzentrationen des Flt3L bei reif geborenen Kindern als bei den dazugehörigen Müttern (Gonzalez et al. 2009). Inwieweit diese abweichenden Ergebnisse durch unterschiedliches Probenmaterial (Plasma versus Serum) oder Untersuchungsabläufe bedingt sind oder unterschiedliche Charakteristika der Studienpopulation hierfür eine Rolle spielen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Puchner et al. verglichen zudem die Konzentrationen des Rezeptors Flt3 im mütterlichen Blut vor Geburt und im Nabelschnurblut (Malamitsi-Puchner et al. 2005). Die mittleren Konzentrationen

des mütterlichen Flt3-Rezeptors waren höher als jene im Nabelschnurblut, wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant war (Malamitsi-Puchner et al. 2005). Die Ergebnisse stehen jedoch in Einklang mit den Verhältnissen der Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit. Höhere mütterliche Flt3L-Konzentrationen lassen sich zum einen durch die in der Schwangerschaft gesteigerte mütterliche Hämatopoese erklären (El-Badri und Groer 2008). Zum anderen werden hier die veränderten immunologischen Anforderungen an den mütterlichen Körper in der Schwangerschaft deutlich. Die für eine erfolgreiche Schwangerschaft notwendige Immuntoleranz gegenüber dem Fetus wird unter anderem durch regulatorische T-Zellen gewährleistet (Aluvihare et al. 2004, Aluvihare et al. 2005, Arck und Hecher 2013). Diese wiederum werden durch den Flt3L indirekt über dendritische Zellen reguliert (Karsunky et al. 2003, Klein et al. 2013). In der Literatur finden sich keine vergleichenden Daten zu den Flt3L-Konzentrationen im Blut schwangerer und nicht schwangerer Frauen. Gonzales et al. ermittelten jedoch im Plasma gesunder Probanden niedrigere Flt3L-Konzentrationen als bei Frauen kurz nach Entbindung (Gonzalez et al. 2009), was das Vorangegangene im Hinblick auf die hämatopoetischen und immunologischen Veränderungen in der Schwangerschaft, einhergehend mit einem erhöhten Bedarf an Flt3L, unterstreicht. Differierende Angaben zu mittleren Flt3L-Serum- bzw. Plasmakonzentrationen gesunder Individuen in der Literatur und im Herstellermanual des in der vorliegenden Arbeit verwendeten ELISAs (Lyman et al. 1995, Gonzalez et al. 2009, R&D Systems 2010) lassen insgesamt auf eine gewisse interindividuelle Variabilität der Werte schließen, was sich auch anhand der Messungen der vorliegenden Arbeit nachvollziehen lässt. Wenn man bei den schwach positiven Korrelationen der mütterlichen Flt3L-Konzentrationen in der Schwangerschaft mit den Werten im Nabelschnurblut davon ausginge, dass hier eine ein- oder gegenseitige Beeinflussung vorläge, hieße das, dass höhere mütterliche Werte ebenso höhere Werte im Nabelschnurblut bedingen. Ob sich eine solche Beeinflussung auch in der Reife des kindlichen Immunsystems zum Zeitpunkt der Geburt niederschlägt, wurde im Anschluss anhand durchflusszytometrischer Analysen der Zellen im Nabelschnurblut untersucht. Hierfür wurden Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen und regulatorischer T-Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle von den übrigen Zellen abgegrenzt. Zudem wurden die Zellen in undifferenzierte und differenziertere Stadien, reife und unreifere Entwicklungsstufen unterteilt (Takahata et al. 2004, Basford et al. 2010, D'Alessio et

al. 2011). Wie in Anbetracht der fast ausschließlich aus eutrophen, reifgeborenen Kindern bestehenden Studienpopulation zu erwarten war, zeigte sich bei den Analysen ein Überwiegen der reiferen CD34⁺CD133⁻ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}) gegenüber den weniger reifen CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) und CD34⁻CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{early}). Eine Expression des Flt3-Rezeptors CD135 fand sich vorrangig auf differenzierten hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{late}), aber auch auf den weniger differenzierten Stammzellen (HSC^{mid}). Beiden Subpopulationen gemein ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD34. Das Vorhandensein von CD34 wurde in der Literatur bereits als Voraussetzung für eine Expression von CD135 postuliert (Small et al. 1994), wenn auch gleichsam bekannt ist, dass die Expression von CD135 nicht auf CD34⁺ Zellen beschränkt ist (Rappold et al. 1997). In der Zusammensetzung der regulatorischen T-Zellen zeigte sich ebenfalls eine für das Immunsystem des Neugeborenen typische Konstellation. Die FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen, eingeteilt in naive und - über eine Zwischenstufe - ausgereifte Zellen, unterscheiden sich in dem Ausmaß ihrer suppressiven Aktivität (Schaier et al. 2012). Wie zu erwarten war, bestand der Hauptanteil dieser regulatorischen T-Zellen aus naiven regulatorischen T-Zellen. Die reiferen aktiven Zellen zeigten sich anteilig in geringstem Ausmaß. Die Ergebnisse entsprechen diesbezüglich also ebenfalls den in der Literatur zu findenden Beschreibungen des regulatorischen T-Zell-Pools im Nabelschnurblut im Vergleich zu jenem im adulten peripheren Blut (Wing et al. 2002, Takahata et al. 2004). Im nächsten Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit nun die Beziehung des Flt3L zu den Immunzellen im Nabelschnurblut untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der kindliche Flt3L im Nabelschnurblut und die CD34⁺CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC^{mid}) in einem positiven Zusammenhang zueinander stehen. Ein negativer Zusammenhang bestand hingegen zu den CD34⁻CD133⁺ Zellen (HSC^{early}), wobei hier jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Das Verhältnis der CD34⁺CD133⁺ (HSC^{mid}) zu den CD34⁺CD133⁻ (HSC^{late}) hämatopoetischen Stammzellen stand in einem positiven Zusammenhang zu den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut, wobei auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Auch, wenn ein Teil der gezeigten Zusammenhänge nur angedeutet erscheint, so mag es dennoch durchaus denkbar sein, anhand der Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut Rückschlüsse auf das Profil der hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut ziehen zu können. Höhere Konzentrationen des Flt3L scheinen auf

höhere Frequenzen weiter differenzierter hämatopoetischer Stammzellen und zugleich niedrigere Frequenzen früher Entwicklungsstadien schließen zu lassen. So kann die funktionelle Bedeutung des Flt3L als hämatopoetischer Wachstumsfaktor (Lyman et al. 1994, Hannum et al. 1994) auch im Zellprofil des Nabelschnurblutes nachvollzogen werden. Der stimulative Effekt des Flt3L auf CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen und seine Funktion als Regulator der Hämatopoese (Lyman et al. 1993, Lyman et al. 1994, Small et al. 1994, Wodnar-Filipowicz 2003) findet sich in den vorab beschriebenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit angedeutet. Die fehlenden Zusammenhänge zwischen den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut und den übrigen beispielsweise anhand des Flt3-Rezeptors CD135 differenzierten Subpopulationen erinnern an die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen der vielseitigen Effekte des Flt3L, die jedoch unabhängig vom Ausmaß der Expression des Rezeptors sind (Shah et al. 1996, Aurrant-Schleinitz et al. 1999). Darüber hinaus ist hier auch zu beachten, dass ein Einfluss des Flt3L auf sämtliche Zellpopulationen ohne kostimulierende Faktoren, wie sie in der Literatur beschrieben sind (Petzer et al. 1996, Rusten et al. 1996, Lyman und Jacobsen 1998, Robinson et al. 2000), nicht denkbar ist und sich direkte Zusammenhänge in vivo deshalb mitunter nur schwer visualisieren lassen. Weitergehende Studien in dieser Richtung könnten hier möglicherweise ein deutlicheres Bild zeichnen. Im Hinblick auf die verschiedenen Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen zeigten sich keinerlei Zusammenhänge zum kindlichen Flt3L. Der in der Literatur beschriebene Einfluss des Flt3L auf die regulatorischen T-Zellen (Swee et al. 2009, Klein et al. 2013) spiegelte sich folglich nicht direkt im Zellprofil des Nabelschnurblutes wider. Zum einen spielt hier vermutlich die indirekte über dendritische Zellen vermittelte Beziehung (Darrasse-Jeze et al. 2009) eine Rolle, welche einen Zusammenhang von kindlichem Flt3L und regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut in dieser Stichprobe nicht offenbart. Zum anderen mag eine Beeinflussung der kindlichen regulatorischen T-Zellen auch schon zu einem früheren Zeitpunkt geschehen. Um dies zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Zusammenhänge der einzelnen Zellpopulationen im Nabelschnurblut zu den mütterlichen Flt3L-Konzentrationen untersucht. Tatsächlich zeigten sich im Gegensatz zum kindlichen Flt3L bei den Werten in der Schwangerschaft Zusammenhänge zu den regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut. Die naiven regulatorischen T-Zellen korrelierten mit den mütterlichen Flt3L-Serumkonzentrationen aller

Erhebungszeitpunkte tendenziell negativ. Ein positiver Zusammenhang zeigte sich dagegen mit den reiferen Subpopulationen. Höhere Flt3L-Konzentrationen in der Schwangerschaft scheinen sich folglich im Nabelschnurblut in einer geringeren Zahl naiver regulatorischer T-Zellen widerzuspiegeln. Dies deutet den Einfluss des Flt3L auf die T-Zellentwicklung und seinen stimulierenden Effekt auf regulatorische T-Zellen an (Wodnar-Filipowicz 2003, Klein et al. 2013). Auch sein Einfluss auf die Aktivität der regulatorischen T-Zellen und damit die Immunantwort, wie beispielsweise im Mausmodell anhand verschiedener Krankheitsmodelle bereits untersucht wurde (Edwan et al. 2004, Svensson et al. 2013), scheint hier deutlich zu werden. Weitergedacht könnte dies wiederum ein Zeichen dafür sein, dass Unterschiede in der Zusammensetzung der regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut, die auf das Risiko für die Entwicklung bestimmter Erkrankungen im Verlauf des Kindesalters hindeuten können und die in der Literatur bereits vielfach untersucht wurden (Haddeland et al. 2005, Hinz et al. 2012), nach diesen Ergebnissen bereits durch die Flt3L-Konzentrationen in der Schwangerschaft angekündigt und beeinflusst werden. Inwiefern die mütterlichen Flt3L-Konzentrationen auch auf die Zusammensetzung der kindlichen hämatopoetischen Stammzellen schließen lassen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Vergleich zu den regulatorischen T-Zellen waren die Ergebnisse hier jedoch wenig eindeutig. Zwar zeigten sich negative Zusammenhänge zwischen den Flt3L-Konzentrationen in der 14. SSW und den gesamten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen sowie den undifferenzierten CD45^{dim}CD34⁺CD38⁻ Zellen. Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Ein positiver jedoch ebenfalls nicht signifikanter Zusammenhang bestand zwischen den undifferenzierten CD45^{dim}CD135⁺ hämatopoetischen Stammzellen. Bei den Werten der 24. und 36. SSW zeigten sich diese Beziehungen jedoch nicht. Die hämatopoetischen Stammzellen, die sowohl CD133 als auch CD135 exprimieren, zeigten hingegen zu allen Zeitpunkten während der Schwangerschaft tendenziell einen positiven Zusammenhang mit den mütterlichen Flt3L-Konzentrationen. Ob bei diesen lediglich angedeuteten Zusammenhängen auf eine Beeinflussung der kindlichen Stammzellen durch den mütterlichen Flt3L geschlossen werden kann, müsste anhand einer größeren Studienpopulation weitergehend untersucht werden, um hier einen zufälligen Effekt auszuschließen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben vielfältige Zusammenhänge zwischen dem Flt3L und den Zellen im Nabelschnurblut aufgezeigt. Weitergehend wurden deshalb potenzielle Einflussfaktoren auf den Flt3L untersucht. Am deutlichsten zeigte sich hierbei ein Einfluss des Gestationsalters auf die Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut. Je höher das Gestationsalter bei Geburt war, desto geringer waren die Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut. Auch in der Arbeit von Gonzales et al. wurden im Plasma von Frühgeborenen höhere Konzentrationen des Flt3L im Vergleich zu reif geborenen Kindern beschrieben (Gonzalez et al. 2009). Bei Puchner et al. hingegen zeigten sich, trotz vergleichbarer Zusammensetzung der Studienpopulation, keine Korrelationen zum Gestationsalter (Malamitsi-Puchner et al. 2005). Eine Abnahme des Flt3L mit steigendem Gestationsalter ginge in Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Abnahme zirkulierender hämatopoetischer Stammzellen im Verlauf der physiologischen fetalen Entwicklung (Bizzarro et al. 2007, Wen et al. 2012). Da der Anteil frühgeborener Kinder an der Studienpopulation nicht ausreichend groß war, konnte diesbezüglich kein Gruppenvergleich durchgeführt werden. Weiterführende Studien könnten an eben diesem Punkt ansetzen. Als weiterer Einflussfaktor auf die Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut wurde der kindliche Ponderalindex untersucht. Dieser Index stellt ein relatives Maß für die körperlichen Maße des Neugeborenen dar. Wie ein niedriges Gestationsalter wird auch ein niedriger Ponderalindex mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Asthmas in Zusammenhang gebracht (Metsala et al. 2008). Ein Zusammenhang zwischen den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut und kindlichem Ponderalindex deutete sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lediglich an. Die Vermutung, dass ein höherer Ponderalindex geringere Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut bedingen würde, stünde aber mit dem ebenfalls im Vorangegangenen erwähnten negativen Zusammenhang zum Gestationsalter in Einklang.

Neben dem Gestationsalter und dem Ponderalindex wurden auch mütterliche Einflussfaktoren auf den Flt3L untersucht. Es zeigte sich, dass in Bezug auf die mütterlichen Flt3L-Konzentrationen in der 36. SSW ein positiver, jedoch nicht signifikanter, Zusammenhang zur Gewichtszunahme in der Schwangerschaft bestand. Die in der Literatur beschriebenen Einflüsse einer exzessiven Gewichtszunahme in der Schwangerschaft auf das neonatale Outcome sind vielfältig. So zeigte sich eine übermäßige Gewichtszunahme in der Schwangerschaft nicht nur

im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen, sondern auch als negativer Einflussfaktor im Hinblick auf den Apgar-Score und den pH-Wert des Nabelschnurblutes (Nohr et al. 2008, Gaillard et al. 2013, Ferrari et al. 2014). Im Bezug auf die weitere immunologische Entwicklung des Kindes zeigten Harpsøe et al. ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Asthma bronchiale im Kindesalter (Harpsøe et al. 2013). Diesbezüglich wäre zu erwarten, dass sich eine verstärkte Gewichtszunahme auch in den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut widerspiegelt. Dieser Zusammenhang sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Auch zum mütterlichen Alter bestanden keine Zusammenhänge mit den mütterlichen oder kindlichen Flt3L-Konzentrationen. Das mütterliche Alter wurde in der Literatur vielfach als Risikofaktor für die erfolgreiche Schwangerschaft und die weitere kindliche Entwicklung diskutiert (Sherriff et al. 2001, Dik et al. 2004, Chantrapanichkul und Chawanpaiboon 2013, Xiaoli und Weiyuan 2014). Es hätte folglich nicht überrascht, wenn die Höhe der Flt3L-Konzentrationen mit dem Alter variiert hätte, was jedoch nicht der Fall war. Ein Grund hierfür könnte die homogene Alterszusammensetzung der Studienpopulation sein. Der größte Anteil der Frauen war zwischen 30 und 35 Jahren alt (n=20). 6 Teilnehmerinnen waren jünger als 30 Jahre, 8 Frauen waren zwischen 35 und 40 Jahren alt. Lediglich eine Teilnehmerin war mit 46 Jahren älter als 40 Jahre. Die jüngste Teilnehmerin war 21 Jahre alt. Um den Einfluss des Alters auf den Flt3L besser bewerten zu können, wäre in weiterführenden Studien eine Studienpopulation mit einer größeren Anzahl an Teilnehmerinnen in allen genannten Altersklassen hilfreich.

Im letzten Schritt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von während der Schwangerschaft wahrgenommenem Stress auf die Flt3L-Konzentrationen untersucht. Negative Auswirkungen von pränatalem Stress auf die Gesundheit des Kindes sind vielfach beschrieben worden (Hertzen, L. C. von 2002, Knackstedt et al. 2005, Sausenthaler et al. 2009), weshalb nun geprüft werden sollte, ob sich dies auch in den untersuchten Aspekten des kindlichen Immunsystems abzeichnet. Es zeigte sich tatsächlich ein gewisser Zusammenhang zwischen dem Flt3L im Nabelschnurblut und dem Stress in der Schwangerschaft. Es fiel auf, dass die Level des wahrgenommenen Stresses in der 14. SSW positiv mit den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut korrelierten. Folglich könnten mit steigendem Stress höhere Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut erwartet werden. Auf den

mütterlichen Flt3L schien sich der in der Schwangerschaft wahrgenommene Stress jedoch nicht messbar auszuwirken. Da sich für den kindlichen Flt3L in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang mit Subpopulationen der hämatopoetischen Stammzellen zeigte, wurde nun ebenfalls die Abhängigkeit dieser Zellen von pränatalem Stress untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine höhere Stresswahrnehmung in der 24. SSW und 36. SSW tendenziell mit höheren Frequenzen differenzierterer Stammzellen (HSC^{late}) im Vergleich zu weniger differenzierten (HSC^{early} ; HSC^{mid}) einherging. Diese Ergebnisse erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau. Gleichsam ergab sich, dass ein höherer Stress zu diesen Zeitpunkten mit weniger undifferenzierten $CD45^{dim}CD135^{+}$ hämatopoetischen Stammzellen im Nabelschnurblut einherging. Auch wenn die Ergebnisse nur andeutungsweise in eine Richtung zeigten, so kann dennoch davon ausgegangen werden, dass sich pränataler Stress über verschiedene Mechanismen zu allen Zeitpunkten in der Schwangerschaft auf das Immunsystem des Kindes auswirken kann. Diese Beeinflussung zeigte sich auch in Bezug auf den Flt3L.

Einfluss der verwendeten Methoden auf die Ergebnisse der Arbeit

Der Vergleich der Studienpopulation mit der Originalpopulation sowie mit den im Jahre 2012 erfassten Hamburger Geburten (EQS Hamburg Landesgeschäftsstelle 2013) zeigte, dass es sich bei der Studienpopulation um eine repräsentative Stichprobe der Neugeborenen handelt. Es ist folglich wahrscheinlich, dass die gezeigten Zusammenhänge auch im Hinblick auf die Vergleichspopulationen Gültigkeit haben mögen. Auch hinsichtlich der mütterlichen Eigenschaften unterschied sich die vorliegende Studienpopulation von der Originalpopulation abgesehen von kleinen Unterschieden nicht wesentlich. Die Ergebnisse mögen folglich auch auf die umfassendere Originalpopulation übertragbar sein. Der Vergleich mit den Eigenschaften der Frauen, deren Geburten im Jahr 2012 in Hamburg erfasst wurden (EQS Hamburg Landesgeschäftsstelle 2013), zeigte hingegen größere Unterschiede auf. Die Differenzen beider Populationen bezüglich Alterszusammensetzung, Herkunft, Berufstätigkeit und Beziehungsstatus beispielsweise mögen zum einen durch die geringe Fallzahl in der Studienpopulation bedingt sein. Zum anderen sind sie aber auch Ausdruck eines sehr selektiven Patientenkollektivs freiwilliger Studienteilnehmerinnen in der Studienpopulation. Dies hat zur Folge, dass die Ergebnisse, möchte man sie auf eine größere Kohorte wie

beispielsweise die gesamten Hamburger Geburten übertragen, als nur bedingt repräsentativ angesehen werden können. In weiterführenden Studien sollten die Tendenzen, die sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigen, in größeren Stichproben untersucht werden. So wäre auch eine größere Varianz hinsichtlich untersuchter Merkmale wie dem mütterlichen Alter oder dem Gestationsalter gewährleistet. Eine größere Stichprobe könnte zusätzlich die Interpretation der bisher oft nur angedeuteten Zusammenhänge erleichtern. Da die weitere Einteilung der Studienpopulation in Untergruppen, wie sie für die Gruppenvergleiche notwendig war, die Problematik der geringen Stichprobengröße zusätzlich verstärkte und Vergleiche wie beispielsweise der von früh- und reifgeborenen Kindern aufgrund dessen entfallen mussten, könnte auch hier eine größere Studienpopulation hilfreich sein. So wären beispielsweise exaktere Aussagen zum bereits angedeuteten Zusammenhang zwischen dem Flt3L im Nabelschnurblut und dem Gestationsalter möglich. Zusätzlich könnten für die Beurteilung des Einflusses von pränatalem Stress auf den Flt3L in Schwangerschaft und Nabelschnurblut begleitende Messungen des Stresshormons Cortisol eine gewisse Objektivierung des Stressses gewährleisten und so hilfreich für die Beurteilung eines bestehenden Zusammenhangs sein.

Resümee und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte den hämatopoetischen Wachstumsfaktor Flt3L in der Schwangerschaft und im Nabelschnurblut im Hinblick auf seine Beziehung zum neonatalen Immunsystem. Beispielhaft hierfür wurden die unterschiedlichen Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen und regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei deutete sich zum einen ein Zusammenhang zwischen kindlichem Flt3L im Nabelschnurblut und unterschiedlich differenzierten Stammzellen an. Zum anderen bestanden Zusammenhänge zwischen den mütterlichen Flt3L-Konzentrationen in der Schwangerschaft und einzelnen Subpopulationen sowohl der hämatopoetischen Stammzellen als auch der regulatorischen T-Zellen. Hier schien sich folglich ein Einfluss von kindlichem und mütterlichem Flt3L auf die Ausreifung des kindlichen Immunsystems abzuzeichnen. Der mütterliche und der kindliche Flt3L schienen außerdem, wenn auch nur angedeutet in den Ergebnissen sichtbar, zueinander in Beziehung zu stehen. Der kindliche Flt3L im Nabelschnurblut zeigte sich abhängig vom Gestationsalter und vom kindlichen Ponderalindex. Der mütterliche Flt3L

hingegen schien durch die Gewichtszunahme in der Schwangerschaft beeinflusst zu werden. Die Ergebnisse zeigten zudem einen Einfluss von wahrgenommenen mütterlichem Stress, welcher in der 14. SSW gemessen wurde und den Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut. Die gesamten Zusammenhänge zwischen mütterlichem und kindlichem Flt3L und den Zellpopulationen im Nabelschnurblut sowie die Einflussfaktoren auf den Flt3L sind in Abbildung 27 noch einmal stark vereinfacht zusammengefasst.

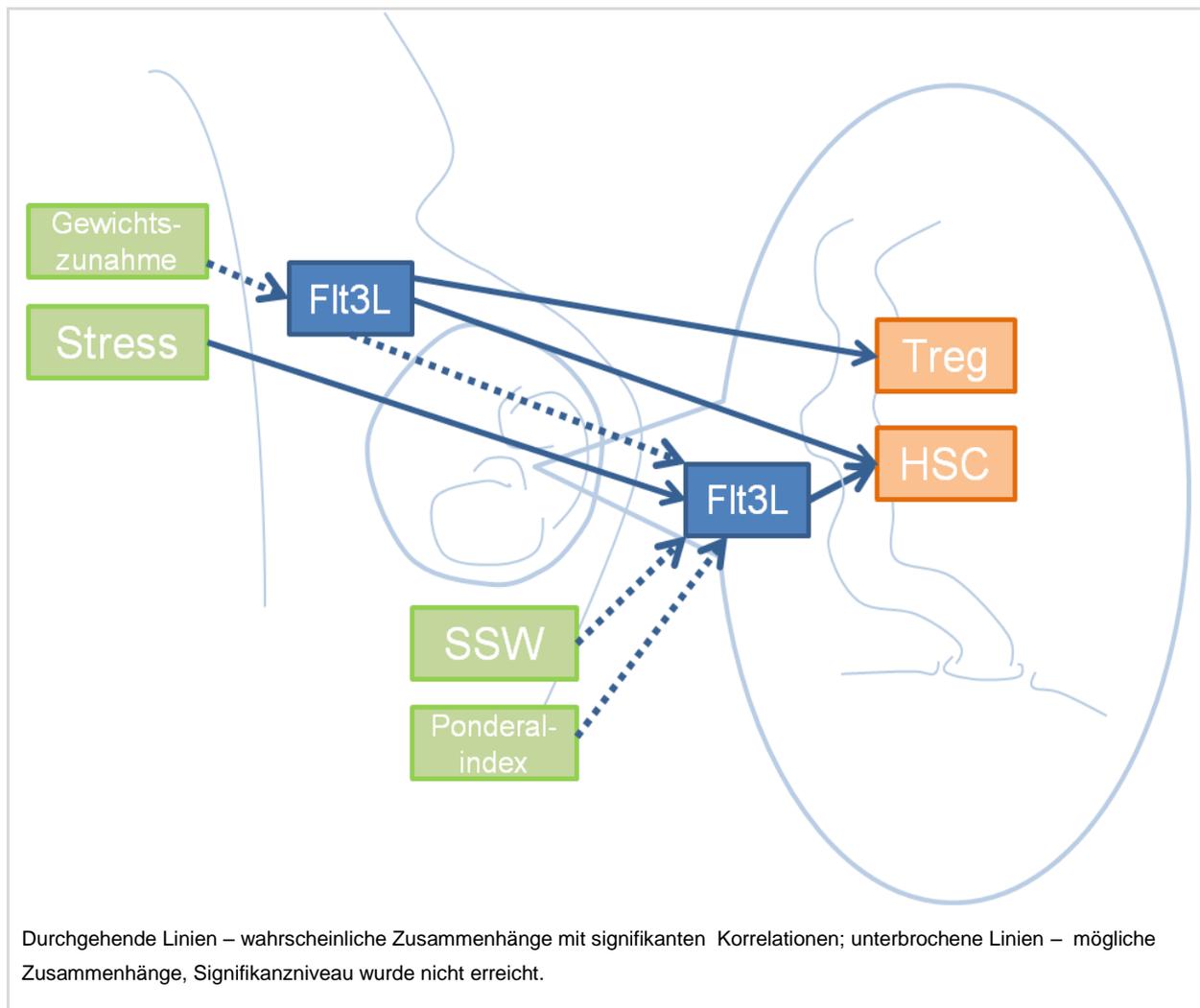


Abbildung 27 Stark vereinfachte Darstellung der Zusammenhänge zwischen mütterlichem und kindlichem Flt3L und den Zellpopulationen im Nabelschnurblut sowie den Einflussfaktoren auf den Flt3L

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es möglich ist, nicht nur mit dem Flt3L im Nabelschnurblut auf die Zusammensetzung beziehungsweise Ausdifferenzierung der Immunzellen eines Neugeborenen zu schließen. Bereits die Bestimmung in der Schwangerschaft könnte beispielsweise Auskunft über das Verhältnis der verschiedenen regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut geben.

Ginge man davon aus, dass sich die gezeigten Zusammenhänge in größer angelegten Studien verifizieren ließen, so wären durch die Bestimmung des Flt3L in der Schwangerschaft bereits frühzeitig prognostische Aussagen zur Reife und Funktionalität des kindlichen Immunsystems zum Zeitpunkt der Geburt möglich. Setzt man gleichzeitig voraus, dass es möglich ist, anhand des Zellprofils im Nabelschnurblut auf das Risiko für bestimmte Erkrankungen zu schließen, wie es in vielen Forschungsarbeiten bereits diskutiert wurde (Hagendorens et al. 2004, Haddeland et al. 2005, Smith et al. 2008, Hinz et al. 2012), ergäbe sich eine Möglichkeit, frühzeitig risikobehaftete Konstellationen zu erkennen und bestenfalls positiv zu beeinflussen. Um beurteilen zu können, ob dem Flt3L tatsächlich ein prognostischer Wert in Bezug auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems und das Risiko für Krankheiten wie beispielsweise Allergien und Asthma zukommt, müsste die der Arbeit zugrundeliegende Geburtskohorte im Verlauf weiter begleitet und im Hinblick auf die gesundheitliche Entwicklung untersucht werden. Eine Bedeutsamkeit des Flt3L für die Früherkennung von immunologischen Gesundheitsrisiken böte frühzeitig die Möglichkeit Einflussfaktoren, die beispielsweise das Risiko für atopische Erkrankungen erhöhen (Metsala et al. 2008, Sausenthaler et al. 2009, Martino 2011) zu vermeiden und präventive Interventionen zur Risikoreduktion zu ergreifen. So könnte bereits früh in der Schwangerschaft die Weichenstellung für ein gesundes kindliches Immunsystem erleichtert werden.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung des kindlichen Immunsystems beginnt bereits früh in der Schwangerschaft und dauert über diese hinaus an. Während dieser Zeit wird es fortwährend mit diversen Einflussfaktoren konfrontiert. Eine wichtige Komponente für die Entwicklung und Funktionalität des kindlichen Immunsystems ist der Wachstumsfaktor Flt3L und sein Rezeptor. Er reguliert nicht nur die Hämatopoese und damit die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen sondern hat gleichsam einen großen Stellenwert in der T-Zell-Entwicklung inne. Verschiedene Forschungsarbeiten mutmaßen darüber hinaus, dass der Flt3L und sein Rezeptor an der Pathogenese allergischer und atopischer Erkrankungen beteiligt ist und deren Verlauf beeinflusst. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss des Flt3L auf die Reife des kindlichen Immunsystems im Verlauf der Schwangerschaft und zum Zeitpunkt der Geburt. Die Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen erfolgte im Rahmen der ‚Prince-Studie‘ (Prince – Prenatal Identification of Children’s Health), die in Zusammenarbeit zwischen der Klinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin mit dem Labor für Experimentelle Feto-Maternale Medizin am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg durchgeführt wurde. Durchflusszytometrische Analysen des Nabelschnurblutes der Studienpopulation bildeten die Grundlage für die Einschätzung der Reife des kindlichen Immunsystems. Unterschiedlich ausdifferenzierte hämatopoetische Stammzellen und regulatorische T-Zellen wurden untersucht. Mütterliche und kindliche Flt3L-Serumkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Darauf folgten die statistischen Berechnungen der Zusammenhänge unter Berücksichtigung denkbarer Einflussfaktoren. In den Ergebnissen deutete sich zum einen ein Zusammenhang zwischen kindlichem Flt3L im Nabelschnurblut und unterschiedlich differenzierten Stammzellen an. Zum anderen bestanden Zusammenhänge zwischen den mütterlichen Flt3L-Konzentrationen in der Schwangerschaft und Subpopulationen der hämatopoetischen Stammzellen und der regulatorischen T-Zellen. Der mütterliche und der kindliche Flt3L schienen darüber hinaus zueinander in Beziehung zu stehen. Bezüglich der untersuchten Einflussfaktoren zeigte sich der kindliche Flt3L im Nabelschnurblut abhängig vom Gestationsalter und vom kindlichen Ponderalindex. Der mütterliche Flt3L hingegen schien durch die Gewichtszunahme in der Schwangerschaft beeinflusst zu werden. Die Ergebnisse lassen außerdem einen

Einfluss von mütterlichem Stress in der Schwangerschaft auf die Flt3L-Konzentrationen im Nabelschnurblut vermuten. Insgesamt zeichnete sich in den Ergebnissen ein Einfluss des Flt3L während der Schwangerschaft auf die Ausreifung des kindlichen Immunsystems ab. Es liegt die Vermutung nahe, dass eine Bestimmung des Flt3L in der Schwangerschaft bereits einen Ausblick auf das Zellprofil des Nabelschnurblutes und damit die Reife des kindlichen Immunsystems zum Zeitpunkt der Geburt geben könnte. Sollten sich diese Tendenzen in weiterführenden Studien bestätigen lassen, könnte gegebenenfalls schon früh in der Schwangerschaft das Risiko für die Entstehung von immunologischen Erkrankungen abgeschätzt werden und im Rahmen dessen relevante Risikofaktoren vermieden oder durch präventive Maßnahmen gegengesteuert werden.

Summary

The development of the immune system of children initiates in early pregnancy, continues until birth and lasts furthermore during childhood. During its development the immune system is constantly exposed to various influencing factors. One important component for the development and functionality of the immune system of children is the growth factor Flt3L and its receptor. Not only does it regulate haematopoiesis and thereby the differentiation of the haematopoietic stem cells, but it also plays an important role in the development of T cells. Various research works further suggest that the Flt3L and its receptor are involved in the pathogenesis of allergic and atopic diseases and that they influence their course of disease. The present work examined the influence of Flt3L on the maturation of the foetal immune system during pregnancy and at the time of birth. Recruitment of study participants took place within the ‚Prince-Studie‘ (Prince – Prenatal Identification of Children’s Health) which was carried out as a cooperation with the Department of Obstetrics and Fetal Medicine and the research group for Experimental Feto-Maternal Medicine at the University Medical Centre Hamburg-Eppendorf. Flow-cytometric analyses of cord blood samples of the study participants were performed to assess the maturation of the immune system of children. Various states of differentiated haematopoietic stem cells and regulatory T cells were analysed. Maternal and cord blood Flt3L serum concentrations were measured via ELISA. Statistical analyses were performed to examine the correlations considering possible influencing factors. The results suggest a correlation between Flt3L in cord blood and varied differentiated stem cells. Also correlations between maternal Flt3L serum concentrations in pregnancy and subpopulations of haematopoietic stem cells and regulatory T cells have been recognized. Maternal and children’s Flt3L further seemed to correlate with each other. Concerning the influencing factors, Flt3L in cord blood appeared to depend on gestational age and children’s Ponderal Index. Besides, maternal Flt3L seemed to be influenced by weight gain in pregnancy. The results also hypothesize an influence of maternal stress experience in pregnancy on Flt3L concentrations in cord blood. In summary the results suggest an influence of the Flt3L on the maturation of the immune system of children during pregnancy. It seems likely that measuring Flt3L in pregnancy could present an outlook on the cell profiles in cord blood and therefore on the maturity of the immune system of children at birth. Could this idea be confirmed by further studies, the risk for developing

immunologic diseases might be estimated in early pregnancy already and subsequently relevant risk factors might be avoided or preventive measures initiated.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABF – Alltagsbelastungsfragebogen

BMI – Body Mass Index

CD – Cluster of Differentiation

CLP – common lymphoid progenitor

CMP – common myeloid progenitor

CRH – Corticotropin-releasing Hormone

CSF-1 - Monozytenkolonien-stimulierender Faktor

EDTA - Ethylendiamintetraacetat

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FBS – fetales Rinderserum

FCS – Flow Cytometry Standard

FESB – Fragebogenskalen zur Erfassung der subjektiven Belastung

FITC - Fluorescein Isothiocyanat

Flt3L – Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand

FoxP3 – Forkhead Box Protein P3

FSC – Forward Scatter

GM-CSF – Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GMP – myelomonocytic progenitor

H₂O_{dest} – destilliertes Wasser

HBV – Hepatitis-B-Virus

HIV – Humanes Immundefizienz-Virus

HSC – Hämatopoetische Stammzelle

LT-HSC – long term HSC

MEP – megakaryotic/erythroid progenitor

MPP – multipotent progenitor

n-3PUFA – n-3 mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Omega-3-Fettsäuren)

NSB - Nabelschnurblut

PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS – phosphatgepufferte Salzlösung

Pro-DC – Progenitor dendritic cell

Pro-NK – Progenitor Natural Killer cell

PSQ – Perceived Stress Questionnaire

PSS – Perceived Stress Scale

Rpm – Umdrehungen pro Minute

SCF - Stammzellfaktor

SD - Standardabweichung

SGA – Small for Gestational Age

SSC – Side Scatter

ST-HSC – short term HSC

Stress-CAT – Computer adaptiver Test zur Erfassung von Stress

SSW – Schwangerschaftswoche

TICS – Trier Inventory for the Assessment of Chronic Stress

Treg – regulatorische T-Zelle

7. Literaturverzeichnis

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J (2014) The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med*; 6(237): 237ra65.

Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S (2004) Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*; 4(7): 553–564.

Agrawal DK, Hopfenspirger MT, Chavez J (2001) Flt3 ligand: a novel cytokine prevents allergic asthma in a mouse model. *Int Immunopharmacol*; 1: 2081–2089.

Alshami HA, Kadasne AR, Khalfan M, Iqbal SZ, Mirghani HM (2011) Pregnancy outcome in late maternal age in a high-income developing country. *Arch Gynecol Obstet*; 284: 1113–1116.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*; 5(3): 266–271.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2005) Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med*; 83: 88–96.

Antonysamy MA, Thomson AW (2000) Flt3 Ligand (FL) and its influence on immune reactivity. *Cytokine*; 12(2): 87–100.

Arck P, Solano ME, Walecki M, Meinhardt A (2014) The immune privilege of testis and gravid uterus: Same difference? *Mol Cell Endocrinol*; 382: 509–520.

Arck PC, Hansen PJ, Jericevic BM, Piccinni M, Szekeres-Bartho J (2007) Progesterone During Pregnancy: Endocrine-Immune Cross Talk in Mammalian Species and the Role of Stress. *Am J Reprod Immunol*; 58: 268–279.

Arck PC, Hecher K (2013) Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med*; 19(5): 548–556.

Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Westman P, Kekomäki R (2004) Birthweight of full-term infants is associated with cord blood CD34+ cell concentration. *Acta Paediatrica*; 93: 1323–1329.

Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, Williams H (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*; 368: 733–743.

Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spänel-Borowski K, Wolff W, Würzinger LJ, Zilch H (2010) *Anatomie*. Thieme, Stuttgart.

Aurran-Schleinitz T, Imbert A, Humeau L, Bardin F, Charbord P, Chabannon C (1999) Early progenitor cells from human mobilized peripheral blood express low levels of the flt3 receptor, but exhibit various biological responses to flt3-L. *Br J Haematol*; 106: 357–367.

Bach JF (2002) The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *N Engl J Med*; 347(12): 911–920.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001) CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol*; 167: 1245–1253.

Ballen KK, Wilson M, Wu J, Ceredona AM, Hsieh C, Stewart FM, Popovsky MA (2001) Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplant*; 27: 7–14.

Barr RD, Whang-Peng J, Perry S (1975) Hemopoietic Stem Cells in Human Peripheral Blood. *Science*; 190: 284–285.

Basford C, Forraz N, McGuckin C (2010) Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometry *Nat Protoc*; 5(7): 1337–1346.

Belle, T. V. van, Juntti T, Liao J, Herrath MG von (2010) Pre-existing autoimmunity determines type 1 diabetes outcome after Flt3-ligand treatment. *J Autoimmun*; 34(4): 445–452.

Birg F, Courcoul M, Rosnet O, Bardin F, Pebusque M, Marchetto S, Tabilio A, Mannoni P, Birnbaum D (1992) Expression of the FMS/KIT-Like Gene FLT3 in Human Acute Leukemias of the Myeloid and Lymphoid Lineages. *Blood*; 80(10): 2584–2593.

Bizzarro MJ, Bhandari V, Krause DS, Smith BR, Gross I (2007) Circulating stem cells in extremely preterm neonates. *Acta Paediatrica*; 96: 521–525.

Bloom W, Bartelmez CW (1940) Hematopoiesis in young human embryos. *Am J Anatomy*; 67: 21–53.

Boney CM (2005) Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity and Gestational Diabetes Mellitus. *PEDIATRICS*; 115(3): e290–296.

Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*; 110(4): 1225–1232.

Broxmeyer HE (2008) Chemokines in hematopoiesis *Curr Opin Hematol*; 15: 49–58.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 3828–3832.

Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M, Wagner J, Vadhan-Raj S, Benninger L, Rubinstein P (1992) Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Nat Acad Sci USA*; 89: 4109–4113.

Cantani A (2008) *Pediatric Allergy, Asthma and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Chantrapanichkul P, Chawanpaiboon S (2013) Adverse pregnancy outcomes in cases involving extremely young maternal age. *Int J Gynaecol Obstet*; 120: 160–164.

Charbord P, Tavian M, Humeau L, Peault B (1996) Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood*; 87(10): 4109–4119.

Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, Kogevinas M, Sunyer J (2008) Mediterranean diet in pregnancy is protective for wheeze and atopy in childhood. *Thorax*; 63(6): 507–513.

Chung EK, Miller RL, Wilson MT, McGeady SJ, Culhane JF (2007) Antenatal risk factors, cytokines and the development of atopic disease in early childhood. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*; 92(1): F68–73.

Clement LT, Vink PE, Bradley GE (1990) Novel immunoregulatory functions of phenotypically distinct subpopulations of CD4⁺ cells in the human neonate. *J Immunol*; 145(1): 102–108.

Cumano A, Godin I (2007) Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu Rev Immunol*; 25: 745–785.

D'Alessio F, Mirabelli P, Gorrese M, Scalia G, Gemei M, Mariotti E, Di Noto R, Martinelli P, Fortunato G, Paladini D, Del Vecchio L (2011) Polychromatic flow cytometry analysis of CD34⁺ hematopoietic stem cells in cryopreserved early preterm human cord blood samples. *Cytometry Part A*; 79A: 14–24.

Darrasse-Jeze G, Deroubaix S, Mouquet H, Victora GD, Eisenreich T, Yao K, Masilamani RF, Dustin ML, Rudensky A, Liu K, Nussenzweig MC (2009) Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med*; 206(9): 1853–1862.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J-, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*; 204(6): 1257–1265.

Dexter TM, Spooner E (1987) Growth and Differentiation in the Hemopoietic System. *Ann Rev Cell Biol*; 3: 423–441.

Dik N, Tate RB, Manfreda J, Anthonisen NR (2004) Risk of Physician-Diagnosed Asthma in the First 6 Years of Life. *Chest*; 126(4): 1147–1153.

Edwan JH, Perry G, Talmadge JE, Agrawal DK (2004) Flt-3 Ligand Reverses Late Allergic Response and Airway Hyper-Responsiveness in a Mouse Model of Allergic Inflammation. *J Immunol*; 172: 5016–5023.

Edwan JH, Talmadge JE, Agrawal DK (2005) Treatment with Flt3 ligand plasmid reverses allergic airway inflammation in ovalbumin-sensitized and -challenged mice. *Int Immunopharmacol*; 5: 345–357.

Ekström S, Magnusson J, Kull I, Lind T, Almquist C, Melén E, Bergström A (2014) Maternal BMI in early pregnancy and offspring asthma, rhinitis and eczema up to 16 years of age. *Clin Exp Allergy*; 45(1): 283–291.

El-Badri NS, Groer M (2008) The effect of pregnancy on production of maternal endogenous hematopoietic stem cells. *Biosci Hypotheses*; 1(2): 100–102.

EQS Hamburg Landesgeschäftsstelle (2013) Jahresauswertung 2012 Geburtshilfe 16/1. *Hamburg Gesamt*.

EURODIAB ACE Study Group (2000) Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet*; 355: 873–876.

Ferguson A, Dimich-Ward H, Becker A, Watson W, DyBuncio A, Carlsten C, Chan-Yeung M (2009) Elevated cord blood IgE is associated with recurrent wheeze and atopy at 7 yrs in a high risk cohort. *Pediatr Allergy Immunol*; 20: 710–713.

Fernandes R, Kusel M, Cyr M, Sehmi R, Holt K, Holt B, Kebabze T, Johnston SL, Sly P, Denburg JA, Holt P (2008) Cord blood hemopoietic progenitor profiles predict acute respiratory symptoms in infancy. *Pediatr Allergy Immunol*; 19: 239–247.

Ferrari N, Mallmann P, Brockmeier K, Strüder HK, Graf C (2014) Secular trends in pregnancy weight gain in German women and their influences on foetal outcome: a hospital-based study. *BMC Pregn Childbirth*; 14(228): 1–8.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY (2005) Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity*; 22: 329–341.

Gaillard R, Durmuş B, Hofman A, Mackenbach JP, Steegers EAP, Jaddoe VVW (2013) Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Obesity*; 21(5): 1046–1055.

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL (2008) Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *N Engl J Med*; 359(1): 61–73.

Godfrey WR (2005) Cord blood CD4+CD25+-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*; 105: 750–758.

Gonzalez S, Amat L, Azqueta C, Madrigal J, Laïlla J, Garcia J, Querol S (2009) Factors modulating circulation of hematopoietic progenitor cells in cord blood and neonates *Cytotherapy*; 11(1): 35–42.

Håberg SE, Stigum H, London SJ, Nystad W, Nafstad P (2009) Maternal obesity in pregnancy and respiratory health in early childhood. *Paediatr Perinat Epidemiol*; 23: 352–362.

Haddad R (2004) Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood*; 104(13): 3918–3926.

Haddeland U, Karstensen AB, Farkas L, Bo KO, Pirhonen J, Karlsson M, Kvavik W, Brandtzaeg P, Nakstad B (2005) Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonates with hereditary allergy risk. *Pediatr Allergy Immunol*; 16: 104–112.

Hagendorens MM, Ebo DG, Bridts CH, Van de Water L, De Clerck LS, Stevens WJ (2004) Prenatal exposure to house dust mite allergen (Der p 1), cord blood T cell phenotype and cytokine production and atopic dermatitis during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol*; 15: 308–315.

Hales CN, Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*; 35: 595–601.

Hannum C, Culpepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Kastelein R, Bazan JF, Hudak S, Wagner J, Mattson J, Luh J, Duda G, Martina N, Peterson D, Menon S, Shanafelt A, Muench M, Kelner G, Namikawa R, Rennick D, Roncarolo M, Zlotnik A, Rosnet O, Dubreuil P, Birnbaum D, Lee F (1994) Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*; 368(14): 643–648.

Harpsøe MC, Basit S, Bager P, Wohlfahrt J, Benn CS, Nøhr EA, Linneberg A, Jess T (2013) Maternal obesity, gestational weight gain, and risk of asthma and atopic disease in offspring: A study within the Danish National Birth Cohort. *J Allergy Clin Immunol*; 131(4): 1033–1040.

Hartwig IR, Sly PD, Schmidt LA, Lieshout RJ van, Bienenstock J, Holt PG, Arck PC (2014) Prenatal adverse life events increase the risk for atopic diseases in children, which is enhanced in the absence of a maternal atopic predisposition. *J Allergy Clin Immunol*; 134(1): 160–169.e7.

Haynes BF, Hale LB (1998) The Human Thymus. A Chimeric Organ Comprised of Central and Peripheral Lymphoid Components. *Immunol Res*; 18(2): 61–78.

Haynes BF, Heinly CS (1995) Early Human T Cell Development: Analysis of the Human Thymus at the Time of Initial Entry of Hematopoietic Stem Cells into the Fetal Thymic Microenvironment. *J Exp Med*; 181: 1445–1458.

Hertzen LC von (2002) Maternal stress and T-cell differentiation of the developing immune system: Possible implications for the development of asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*; 109: 923–928.

Hinz D, Bauer M, Roder S, Olek S, Huehn J, Sack U, Borte M, Simon JC, Lehmann I, Herberth G (2012) Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year. *Allergy*; 67: 380–389.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH (2001) Identification and Functional Characterization of Human CD4⁺ CD25⁺ T Cells with Regulatory Properties Isolated from Peripheral Blood. *J Exp Med*; 193(11): 1285–1294.

Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG (2003) Flt3 Ligand Regulates Dendritic Cell Development from Flt3⁺ Lymphoid and Myeloid-committed Progenitors to Flt3⁺ Dendritic Cells In Vivo. *J Exp Med*; 198(2): 305–313.

Klein O, Ebert LM, Zanker D, Woods K, Tan BS, Fucikova J, Behren A, Davis ID, Maraskovsky E, Chen W, Cebon J (2013) Flt3 ligand expands CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in human subjects *Eur J Immunol*; 43: 533–539.

Knackstedt MK, Hamelmann E, Arck PC (2005) Mothers in Stress: Consequences for the Offspring. *Am J Reprod Immunol*; 54: 63–69.

Kocalevent R, Rose M, Becker J, Walter OB, Fliege H, Bjorner JB, Kleiber D, Klapp BF (2009) An evaluation of patient-reported outcomes found computerized adaptive testing was efficient in assessing stress perception. *J Clin Epidemiol*; 62: 278–287e3.

Kumar R, Story RE, Pongracic JA, Hong X, Arguelles L, Wang G, Kuptsova-Clarkson N, Pearson C, Ortiz K, Bonzagni A, Apollon S, Fu L, Bauchner H, Wang X (2010) Maternal Pre-Pregnancy Obesity and Recurrent Wheezing in Early Childhood. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*; 23(3): 183–190.

Levy O (2007) Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*; 7(5): 379–390.

Lowe A, Bråbäck L, Ekeus C, Hjern A, Forsberg B (2011) Maternal obesity during pregnancy as a risk for early-life asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 128(5): 1107–1109.e2.

Lyman SD, Jacobsen SE (1998) c-kit Ligand and Flt3 Ligand: Stem/Progenitor Cell Factors With Overlapping Yet Distinct Activities. *Blood*; 91(4): 1101–1134.

Lyman SD, James L, Bos TV, Vries P de, Braael K, Gliniak B, Hollingsworth LT, Picha KS, McKenna HJ, Splett RR, Fletcher FA, Maraskovsky E, Farrah T, Foxworthe D, Williams DE, Beckmann MP (1993) Molecular Cloning of a Ligand for the flt3/flk-2 Tyrosine Kinase Receptor: A Proliferative Factor for Primitive Hematopoietic Cells. *Cell*; 75: 1157–1167.

Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, Vries P de, Escobar SS, Downey H, Splett RR, Beckmann MP, McKenna HJ (1994) Cloning of the Human Homologue of the Murine flt3 Ligand: A Growth Factor for Early Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood*; 83(10): 2795–2801.

Lyman SD, Seaberg M, Hanna R, Zappone J, Brasel K, Abkowitz JL (1995) Plasma/Serum Levels of flt3 Ligand Are Low in Normal Individuals and Highly Elevated in Patients With Fanconi Anemia and Acquired Aplastic Anemia. *Blood*; 86(11): 4091–4096.

Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR (1995) Targeted Disruption of the flk2/flt3 Gene Leads to Deficiencies in Primitive Hematopoietic Progenitors. *Immunity*; 3: 147–161.

Malamitsi-Puchner A, Economou E, Boutsikou T, Nikolaou KE, Vrachnis N (2005) Neurotrophin-3 and FLT3 Tyrosine Kinase Receptor in Perinatal Life. *Mediators Inflamm*; 1: 53–56.

Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ (1996) Dramatic Increase in the Numbers of Functionally Mature Dendritic Cells in Flt3 Ligand-treated Mice: Multiple Dendritic Cell Subpopulations Identified. *J Exp Med*; 184: 1953–1962.

Marshall CJ, Moore RL, Thorogood P, Brickell PM (1999) Detailed characterization of the human aorta-gonad-mesonephros region reveals morphological polarity resembling a hematopoietic stromal layer. *Dev Dyn*; 215: 139–147.

Martino D (2011) Epigenetics and Prenatal Influences on Asthma and Allergic Airways Disease. *Chest*; 139(3): 640–647.

Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR (1991) A Receptor Tyrosine Kinase Specific to Hematopoietic Stem and Progenitor Cell-Enriched Populations Cell; 65: 1143–1152.

McCulloch EA (1983) Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982) Blood; 62(1): 1–13.

McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Hubbard R (2002) The Importance of Prenatal Exposures on the Development of Allergic Disease. A Birth Cohort Study Using the West Midlands General Practice Database. Am J Respir Crit Care Med; 166: 827–832.

Metsala J, Kilkkinen A, Kaila M, Tapanainen H, Klaukka T, Gissler M, Virtanen SM (2008) Perinatal Factors and the Risk of Asthma in Childhood -- A Population-based Register Study in Finland. Am J Epidemiol; 168(2): 170–178.

Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzarot D, Testa U, Marinucci M, Peschle C (1986) Human Embryonic Hemopoiesis. Kinetics of Progenitors and Precursors Underlying the Yolk Sac -> Liver Transition. J Clin Invest; 78: 51–60.

Mukhopadhyay D, Weaver L, Tobin R, Henderson S, Beeram M, Newell-Rogers MK, Perger L (2014) Intrauterine growth restriction and prematurity influence regulatory T cell development in newborns. J Pediatr Surg; 49: 727–732.

Murphy KP, Travers P, Walport M (2009) Janeway Immunologie Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg.

Nakamori Y, Liu B, Ohishi K, Suzuki K, Ino K, Matsumoto T, Masuya M, Nishikawa H, Shiku H, Hamada H, Katayama N (2012) Human bone marrow stromal cells simultaneously support B and T/NK lineage development from human haematopoietic progenitors: a principal role for flt3 ligand in lymphopoiesis. Br J Haematol; 157: 674–686.

Nakamura K, Sheps S, Arck PC (2008) Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. J Assist Reprod Genet; 25: 47–62.

Nohr EA, Vaeth M, Baker JL, Sørensen TIA, Olsen J, Rasmussen KM (2008) Combined associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with the outcome of pregnancy. Am J Clin Nutr; 87: 1750–1759.

Ogawa M, Porter PN, Nakahata T (1983) Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretive review). *Blood*; 61(5): 823–829.

Palmer AC (2011) Nutritionally Mediated Programming of the Developing Immune System. *Adv Nutr*; 2: 377–395.

Parcells BW, Ikeda AK, Simms-Waldrip T, Moore TB (2006) FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells*; 24: 1174–1184.

Parker VJ, Douglas AJ (2010) Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects. *J Reprod Immunol*; 85: 86–92.

Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(1): 11842–11849.

Peters JL, Cohen S, Staudenmayer J, Hosen J, Platts-Mills TA, Wright RJ (2012) Prenatal negative life events increases cord blood IgE: interactions with dust mite allergen and maternal atopy. *Allergy*; 67: 545–551.

Petzer AL, Zandstra PW, Piretyl YJM, Eaves CJ (1996) Differential Cytokine Effects on Primitive (CD34+CD38⁻) Human Hematopoietic Cells: Novel Responses to Flt3-Ligand and Thrombopoietin. *J Exp Med*; 183: 2551–2558.

R&D Systems, Inc 20101–15 Manual zum Quantikine Human Flt-3/Flk-2 Ligand ELISA.

Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino AC, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Bühring HJ (1997) Functional and Phenotypic Characterization of Cord Blood and Bone Marrow Subsets Expressing FLT3 (CD135) Receptor Tyrosine Kinase. *Blood*; 90(1): 111–125.

Reece P, Thanendran A, Crawford L, Tulic MK, Thabane L, Prescott SL, Sehmi R, Denburg JA (2011) Maternal allergy modulates cord blood hematopoietic progenitor Toll-like receptor expression and function. *J Allergy Clin Immunol*; 127(2): 447–453.

Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV (1998) Shifts in the TH1/TH2 Balance during Human Pregnancy Correlate with Apoptotic Changes. *Biochem Biophys Res Commun*; 245(3): 933–938.

Res P, Spits H (1999) Development stages in the human thymus. *Semin Immunol*; 11(1): 39–46.

Robinson S, Mosley RL, Parajuli P, Pisarev V, Sublet J, Ulrich A, Talmadge J (2000) Comparison of the Hematopoietic Activity of flt-3 Ligand and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Acting Alone or in Combination. *J Hematother Stem Cell Res*; 9(5): 711–720.

Rong-Hwa J, Shu-Hui W, Ming-Hwang S, Bor-Luen C (2008) Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood. *Pediatr Transplantation*; 12(8): 868–873.

Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D (1991) Isolation and Chromosomal Localization of a Novel FMS-like Tyrosine Kinase Gene. *Genomics*; 9: 380–385.

Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, Birg F, Birnbaum D (1993) Human FLT3/FLK2 gene: cDNA Cloning and Expression in Hematopoietic Cells. *Blood*; 82(4): 1110–1119.

Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE (1996) The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood*; 87(4): 1317–1325.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*; 10: 490–500.

Sausenthaler S, Rzehak P, Chen CM, Arck PC, Bockelbrink A, Schäfer T, Schaaf B, Borte M, Herbarth O, Krämer U, Berg A von, Wichmann HE, Heinrich J (2009) Stress-Related Maternal Factors During Pregnancy in Relation to Childhood Eczema: Results From the LISA Study. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 19(6): 481–487.

Schaaf CP, Zschocke J (2013) *Basiswissen Humangenetik* Springer, Berlin, Heidelberg.

Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, Steinborn A, Gregson A (2012) DRhigh+CD45RA- Tregs Potentially Affect the Suppressive Activity of the Total Treg Pool in Renal Transplant Patients. *PLoS ONE*; 7(3): e34208.

Schaub B, Liu J, Höppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, Illi S, Mutius E von (2008a) Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol*; 121(6): 1491–1499.e13.

Schaub B, Liu J, Höppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, Wieczorek G, Illi S, Mutius E von (2009) Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*; 123(4): 774–782.e5.

Schaub B, Liu J, Schleich I, Höppler S, Sattler C, Mutius E von (2008b) Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. *Allergy*; 63: 1438–1447.

Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF (2012) Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation *FASEB J*; 26(6): 2253–2276.

Schmitz R, Thamm M, Ellert U, Kalcklößch M, Schlaud M (2014) Verbreitung häufiger Allergien bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Ergebnisse der KiGGS-Studie – Erste Folgebefragung (KiGGS Welle 1) *Bundesgesundheitsbl.*; 57(7): 771–778.

Schütt C, Bröker B (2011) *Grundwissen Immunologie Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.*

Selye H (1998) A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; 10(2): 230–231.

Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM (1996) Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood*; 87(9): 3563–3570.

Sherriff A, Peters TJ, Henderson J, Strachan D (2001) Risk factor associations with wheezing patterns in children followed longitudinally from birth to 3 1/2 years. *Int J Epidemiol*; 30: 1473–1484.

Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Shahina A (1994) STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 459–463.

Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL (2008) Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4+CD25+CD127lo/- regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol*; 121(6): 1460–1466.e7.

Solano ME, Jago C, Pincus MK, Arck PC (2011) Highway to health; or How prenatal factors determine disease risks in the later life of the offspring. *J Reprod Immunol*; 90: 3–8.

- Speer CP, Gahr M (2013) Pädiatrie. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Vermus H (2001) The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Steinborn A, Engst M, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Meuer S, Sohn C (2010) Small for gestational age (SGA) neonates show reduced suppressive activity of their regulatory T cells. *Clin Immunol*; 134: 188–197.
- Svensson MN, Andersson SEM, Erlandsson MC, Jonsson IM, Ekwall AKH, Andersson KME, Nilsson A, Bian L, Brisslert M, Bokarewa MI, Ashour HM (2013) Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand Controls Formation of Regulatory T Cells in Autoimmune Arthritis. *PLoS ONE*; 8(1): e54884 1–12.
- Swee LK, Bosco N, Malissen B, Ceredig R, Rolink A (2009) Expansion of peripheral naturally occurring T regulatory cells by Fms-like tyrosine kinase 3 ligand treatment. *Blood*; 113(25): 6277–6287.
- Szyf M (2009) Early life, the epigenome and human health. *Acta Paediatrica*; 98: 1082–1084.
- Tabachnick BG, Fidell LS (2007) Using multivariate statistics. Pearson/Allyn and Bacon, Boston.
- Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Sasaki Y, Matsui K, Asano H, Kaneko K, Sonoda Y (2014) CD133 is a positive marker for a distinct class of primitive human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. *Leukemia*; 28(6): 1308–1315.
- Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T (2004) CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol*; 32: 622–629.
- Tavian M, Coulombel L, Luton D, Clemente HS, Dieterlen-Lievre F, Péault B (1996) Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*; 87(1): 67–72.
- Tavian M, Hallais MF, Péault B (1999) Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Developmental Cell*; 126: 793–803.

Tavian M, Robin C, Coulombel L, Péault B (2001) The Human Embryo, but Not Its Yolk Sac, Generates Lympho-Myeloid Stem Cells: Mapping Multipotent Hematopoietic Cell Fate in Intraembryonic Mesoderm. *Immunity*; 15: 487–495.

Tobón GJ, Renaudineau Y, Hillion S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Youinou P, Pers JO (2010) The Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, a Mediator of B Cell Survival, Is Also a Marker of Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum*; 62(11): 3447–3456.

Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. *Cell*; 61: 203–212.

Upham JW, Hayes LM, Lundahl J, Sehmi R, Denburg JA (1999) Reduced expression of hemopoietic cytokine receptors on cord blood progenitor cells in neonates at risk for atopy. *J Allergy Clin Immunol*; 104(2): 370–375.

Vollstedt S, Franchini M, Hefti HP, Odermatt B, O'Keeffe M, Alber G, Glanzmann B, Riesen M, Ackermann M, Suter M (2003) Flt3 Ligand-treated Neonatal Mice Have Increased Innate Immunity Against Intracellular Pathogens and Efficiently Control Virus Infections. *J Exp Med*; 197(5): 575–584.

Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E, Kanz L, Möhle R (2009) Regulation of FLT3 and its ligand in normal hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*; 88: 203–211.

Wen S, Zhao WL, Lin PY, Yang KL (2012) Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units *Transfusion Apheresis Sci*; 46: 39–45.

Whartenby KA, Calabresi PA, McCadden E, Nguyen B, Kardian D, Wang T, Mosse C, Pardoll DM, Small D (2005) Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102(46): 16741–16746.

Whitaker RC, Dietz WH (1998) Role of the prenatal environment in the development of obesity. *J Pediatr Surg*; 132(5): 768–776.

Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A (2002) Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunol Lett*; 106: 190–199.

Wodnar-Filipowicz A (2003) Flt3 Ligand: Role in Control of Hematopoietic and Immune Functions of the Bone Marrow. *News Physiol Sci*; 18: 247–251.

Wright RJ, Visness CM, Calatroni A, Grayson MH, Gold DR, Sandel MT, Lee-Parritz A, Wood RA, Kattan M, Bloomberg GR, Burger M, Togias A, Witter FR, Sperling RS, Sadovsky Y, Gern JE (2010) Prenatal Maternal Stress and Cord Blood Innate and Adaptive Cytokine Responses in an Inner-City Cohort. *Am J Respir Crit Care Med*; 182: 25–33.

Xiaoli L, Weiyuan Z (2014) Effect of maternal age on pregnancy: a retrospective cohort study. *Chin Med J*; 127(12): 2241–2246.

Ygberg S, Nilsson A (2012) The developing immune system - from foetus to toddler *Acta Paediatrica*; 101: 120–127.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Hierbei möchte ich zuallererst Frau Prof. Dr. Arck für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas für meine Dissertation danken. Durch die Mitarbeit in ihrem Team und ihre beständige Unterstützung erhielt ich zahlreiche Einblicke in die Forschungsarbeit und die Möglichkeit mich in vielen verschiedenen Bereichen einzubringen und weiterzuentwickeln. Von ihrer überaus hilfreichen Betreuung meiner Arbeit profitierte ich sehr, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. Isabel Hartwig für ihre Geduld und die wertvolle Unterstützung bei den statistischen Analysen zu dieser Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe für Experimentelle Feto-Maternale Medizin möchte ich für die herzliche Aufnahme in das Team danken und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Laborarbeit, allen voran Agnes Wieczorek und Thomas Andreas.

Dem klinischen Team der ‚Prince-Studie‘ möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, insbesondere Gudula Hansen, die als Studienkoordinatorin mit ihrem Engagement und ihrer Tatkraft in großem Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Frau Eva Ludwigs möchte ich für die zahlreichen gemeinsamen Stunden im Labor danken, die durch die stets gewinnbringenden Gespräche, die gegenseitige Motivation und die Unmengen an konsumiertem Kaffee den Grundstein für eine Freundschaft legten.

Meiner Familie möchte ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen danken, die diese Arbeit erst ermöglichte, für ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihre Bestärkung. Meinen Freunden danke ich für viele aufmunternde Worte, ihren Rat und Beistand.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: