Aus der Abteilung für Laboratoriumsmedizin
und Molekulare Diagnostik
Zentrallaboratorium
der Universitätsklinik Giessen und Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

Beeinflussung der Allergieentstehung durch genetische und umweltbedingte Faktoren im Mausmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Guido Wölk

aus der Freien Hansestadt Bremen

Marburg 2005

I. Einleitung

1.1 Immunität und Immunsystem.....2
1.2 Die Rolle der T-Zell Zytokine: Das T_H1/T_H2-Konzept..... 4
1.3 Schritte der allergischen Reaktion.....8
1.4 Genese allergischer Erkrankungen..... 9
1.5 Schwangerschaft als T_H2-Phänomen..... 12
1.6 Immunologie der Maus.....15
Fragestellungen..... 17

II. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Versuchstiere.....18
2.1.2 Aktive Sensibilisierung gegen Ovalbumin.....18
2.1.3 Exposition gegen B-Lactoglobulin.....20
2.1.4 Kontrollgruppen..... 20

2.2 *Vorgehen am Tier*

2.2.1 Serumgewinnung.....20
2.2.2 Milzpräparation.....20

2.3 Behandlung der Zellen

2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation von mononukleären Milzzellen..... 21
2.3 Zellzählung in der Neubauerkammer..... 22

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Analyse der Immunglobulin- und Zytokinproduktion mit Lymphozytenkulturen..... 22
2.4.2 Analytische Durchfluβzytometrie..... 23
2.4.3 Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)..... 24
2.4.4 Enzyme Linked Immuno Sorbant Spot Assay (ELISpot)..... 29
2.4.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse..... 33

III. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Muttertiere

3.1.1 Expression der Vβ8 und Vβ6 TZR-Ketten Mutter- und Jungtieren..... 34
3.1.2 Charakterisierung der humoralen Immunantwort nach Allergenexposition in SJL-Mäusen..... 38
3.1.3 Charakterisierung der humoralen Immunantwort nach Allergenexposition in Balb/c Mäusen..... 42
3.1.4 Vergleich der allergischen Sensibilisierbarkeit von SJL- und Balb/c-Mäusen.....45

3.2 Charakterisierung der Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1

3.2.1 Maternaler Transfer von allergenspezifischen Immunglobulinen 48

3.2.2 Einfluss der pränatalen Allergenexposition auf die Gesamt-IgE Produktion in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 1 p.p. 50

3.2.3 Charakterisierung der Immundeviation in Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 1 p.p. 51

3.2.4 Produktion von Gesamt-IgE und allergenspezifischen Immunglobulinen in Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 p.p. 55

3.2.5 Injektion eines heterologen Antigens in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 p.p. 58

IV. Diskussion

4.0 Vergleich der Entwicklung des Immunsystem von Maus und Mensch 64

4.1 Charakterisierung des genetischen Phänotyps der Versuchstiere. 65

4.2 Charakterisierung der humoralen Immunantwort in SJL und Balb/c Mäusen 67

4.3 Charakterisierung der Immunantwort der Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 am Tag 1 p.p. 68

4.4 Charakterisierung der Immunantwort der Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 am Tag 28 p.p. 73

4.5 Injektion eines heterologen Antigens in Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 am Tag 28 post partum. 75

4.6 Schema zur intrauterinen Interaktion und Allergie 77

Zusammenfassung 79

Anhang

Literaturstellenverzeichnis 80
Tabellarischer Lebenslauf 92
Liste der akademischen Lehrer 94
Danksagung 95
Ehrenwörtliche Erklärung 96

I. Einleitung

Die Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen ist insbesondere in den industrialisierten Ländern zum Teil dramatisch angestiegen. Während vor 100 Jahren der Begriff Allergie noch unbekannt war, änderte sich die Prävalenz im Laufe des 20. Jahrhunderts dramatisch. Weltweit, vor allem in Ländern mit westlichem Lebensstil, ist eine Zunahme von Asthma- und Allergieerkrankungen zu verzeichnen (Whincup et al., 1993; Strachan et al. 1997, Latvala et al. 2005, Allen-Ramey et al. 2005). Diese mündeten in ein immenses gesundheitliches und sozio-ökonomisches Problem, da auch Begleiterkrankungen wie Schlafstörungen (Craig et al., 2004) oder durch Tubenventilationsstörungen hervorgerufene Hörbeeinträchtigungen (Settipane 1999) auftreten. Insbesondere bei Kindern mit allergischen Erkrankungen konnte eine Beeinträchtigung in den Schulleistungen festgestellt werden (Simons et al., 1997). Schon aus diesem Grunde wurde die Erforschung der Allergieentstehung und -Therapie vorangetrieben. Hinzu kommen die Kosten, die allergische Erkrankungen weltweit verursachen. Allein die allergische Rhinitis verursacht in den USA Kosten von schätzungsweise 1.2 Milliarden US-Dollar pro Jahr (Weiss KB et al., 2000).

Obwohl schon sehr früh bekannt war, dass Eiweiße in der Plazenta übertragen werden (Ascoli A, 1902), wurden diese Ergebnisse nicht in Zusammenhang mit Allergie gestellt. Eine Hypothese zur Übertragung der Hyperreagibilität von der Mutter auf die Nachkommen wurde erstmals 1927 von Ratner et al. aufgestellt. Mit der Entdeckung des Immunglobulins IgE 1967 (Johansson et al. 1967) wurde ein weiterer Meilenstein der Immunologieforschung erreicht. Weitere Subklassen und die Zytokine folgten wenige Jahre später. Diese Entdeckungen ermöglichten erst eine grundlegende Erforschung des Immunsystems. Unter anderem konzentrierten sich Forschungsansätze auf die Entwicklung des Immunsystems im menschlichen Organismus und damit auf die Schwangerschaft als immunologisches Phänomen (Brami C 1985).

Es wurde in vielen Studien gezeigt, dass sich in der Zeit der Schwangerschaft entscheidende Prozesse zwischen Mutter und Kind mit der Plazenta und Amnionflüssigkeit als Grenzzonen abspielen. Als Konsequenz wurde nun erforscht, inwieweit Störungen in dieser Periode des Lebens einen Einfluss auf die Entwicklung späterer Erkrankungen haben könnten (Jones CA et al., 2000). Aktuell steht insbesondere die Rolle der Umweltfaktoren während der Schwangerschaft im Mittelpunkt der Forschung. Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass Eiweiße aus der Umwelt die Plazenta überwinden können (Holloway JA et al., 2000; Uthoff H et al., 2003). Insbesondere Lipopolysaccharide scheinen einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems zu haben (Wegmann M et al., 2005). In der beschriebenen Entwicklung steht auch das Themengebiet dieser Arbeit, in der die unterschiedlichen Einflüsse von Umweltfaktoren während der Schwangerschaft sowie die genetischen Einflüsse auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen untersucht wurden.
Zum Verständnis der Thematik sind Kenntnisse der fundamentalen Prozesse des Immunsystems notwendig. In den folgenden Absätzen werden diese dargestellt.

1.1 *Immunität & Immunsystem*

Man unterscheidet zwischen angeborener und erworbener Immunität. Die angeborene Immunität ist phylogenetisch älter und umfasst epitheliale Barrieren, Komplementsysteme, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Die erworbene Immunität ist höher entwickelt und umfasst verschiedene Lymphozyten und Antikörper. Besonders an dieser Immunität ist die Fähigkeit, Antigene spezifisch zu erkennen und ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen.
Die Zellklassen der erworbenen Immunität unterscheiden sich in Aufbau und Funktion. B-Lymphozyten sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind, Antikörper zu produzieren. Sie differenzieren sich zu diesem Zweck zu Plasmazellen. T-Lymphozyten werden in T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen oder CD_4^+-Zellen) und zytotoxische T-Zellen (CD_8^+-Zellen) eingeteilt. T-Zellen bilden keine Antikörper, sie erkennen Proteine, die ihnen von akzessorischen

Zellen (antigenpräsentierenden Zellen, APZ) präsentiert werden. Als Antwort auf Antigen-Stimulation sezernieren T-Helfer-Zellen Proteine, so genannte Zytokine, die stimulierend auf die Funktion von T- und B-Zellen wirken. Zytotoxische Zellen lysieren Zellen, die fremde Proteine produzieren, zum Beispiel von Viren befallene Zellen. Die Antwort der erworbenen Immunität lässt sich in drei Abschnitte einteilen:

Die Erkennung von Antigenen, die Aktivierung von Lymphozyten und die Effektorphase. Jedes Individuum besitzt zahlreiche, klonal entstandene Lymphozyten. Jeder Klon ist fähig, ein bestimmtes Antigen zu erkennen und darauf zu reagieren. Tritt ein Antigen in den Organismus ein, wird ein bestimmter Lymphozytenklon aktiviert (Antigenerkennung). Dieser aktiviert durch Botenstoffe wie Zytokine weitere T-Zellen und B-Zellen. Es kommt zu einer Produktion von spezifischen Antikörpern, die eine Elimination der Antigene vorantreiben (Effektorphase) Nach Apoptose der meisten aktivierten T-Zellen bleiben wenige Gedächtnis -T und B-Zellen übrig, die bei einem erneuten Auftreten des gleichen Antigens eine schnelle Immunantwort vorantreiben (siehe Abbildung 1.1).

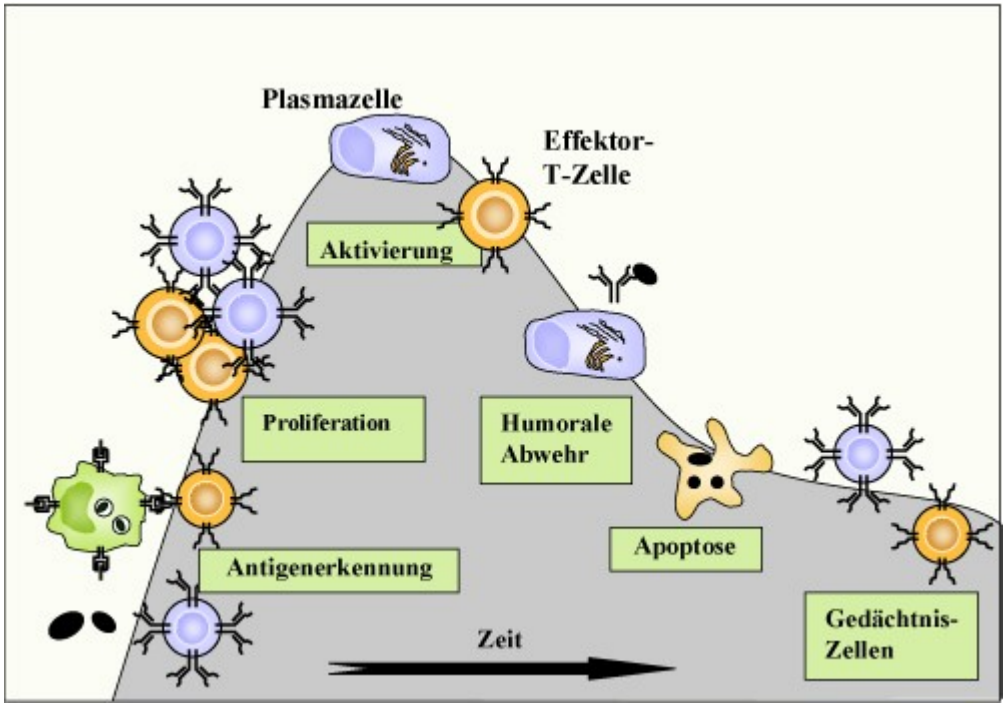


Abbildung 1.1: Phasen der erworbenen Immunantwort
Darstellung der Schritte der Immunantwort von Antigenerkennung bis Apoptose.. Überlebende Zellen bilden die Gedächtnis-Zellen. Auf der Y-Achse ist die Immunantwort in imäginären Einheiten aufgetragen. (verändert nach Abbas et al., 2000)

Diese Prozesse sind zum Verständnis der Arbeit wichtig, z.B. läuft die Bildung von spezifischem IgE, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, nach diesem Muster ab.

1.2 *Rolle der T-Zell Zytokine: Das T_H1/T_H2-Konzept*

Einen zentralen Bestandteil dieser Arbeit bildet die Interaktion von den als T_H1 und T_H2 bekannten Untergruppen der T-Lymphozyten. Grundlegende Informationen werden in diesem Absatz dargestellt.

Als Antwort auf die Präsentationen von Antigenen differenzieren sich CD_4^+ T-Helfer-Zellen in Untergruppen. Diese sind durch ein bestimmtes Spektrum an Zytokinen, und damit verbunden, bestimmten Effektorfunktionen charakterisiert (siehe Abbildung 1.2). Die am besten definierten Untergruppen der T-Helfer-Zellen sind T_H1- und T_H2-Zellen. Weitere T-Zell-Untergruppen sind in der Erforschung. Interferon-γ (IFN-γ) gilt als Signalzytokin für T_H1-Lymphozyten und IL-4 als das definierende Zytokin der T_H2-Untergruppe. Viele Immunantworten werden von einer dieser beiden T-Helfer-Zellen Populationen dominiert. Dementsprechend spricht man auch von einer T_H1- oder T_H2-Immunantwort.

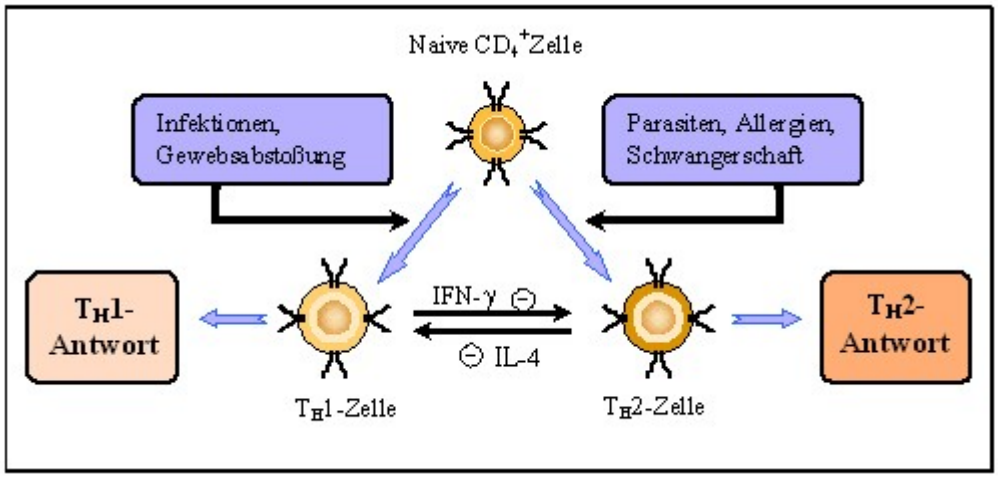


Abbildung 1.2: Differenzierungsrichtungen von T-Zellen

Naive T-Zellen können sich durch unterschiedliche Reize in T_H1- und T_H2- Zellen entwickeln, die zwei grundsätzlich verschiedene Immunantworten anstoßen. Dies geschieht über typische Zytokine wie IFN-γ (T_H1) oder IL-4 (T_H2), die die jeweils andere Antwort hemmen.

Als Resultat der spezifischen Reifung zeigen die Untergruppen Abweichungen in der Expression der unterschiedlichen Zytokinrezeptoren. Die Zytokinproduktion dieser T-Zellen spielt eine Rolle in der Effektorfunktion und beeinflusst auch die Expansion und Entwicklung der jeweiligen T-Zell Population. Beispielsweise fördert IFN-γ, ein Zytokin der T_H1-Zellen, eine weitere T_H1-Differenzierung und inhibiert eine Proliferation der T_H2-Zellen. Umgekehrt fördert IL-4, produziert von T_H2-Zellen, eine weitere T_H2-Differenzierung. Auf diese Weise amplifiziert jede Untergruppe sich selbst und reguliert die jeweils andere Untergruppe.

T_H1- und T_H2-Zellen entwickeln sich aus nativen CD_4^+ T-Lymphozyten als Vorläuferzellen. Durch Faktoren in der frühen Immunreaktion wird das Entwicklungs- und Differenzierungsmuster dieser Zellen festgelegt. Wichtigster Stimulus für eine T_H1-Entwicklung ist das Zytokin IL-12, für T_H2 wiederum IL-4. In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem die Konzentration der IL-4 Titer wie auch die Anzahl der IL-4 produzierenden Zellen bestimmt, um Informationen über die Ausprägung der Lymphozyten-Untergruppen zu erhalten.

Die Entwicklung einer T_H1-Immunantwort entsteht bei Keimen, die Makrophagen oder NK-Zellen infizieren oder aktivieren. Ein häufiges Muster ist die Produktion von IL-12 und IFN-γ. Eine Differenzierung zu T_H2-Zellen ist die Antwort auf Allergene und Helminthen. Häufig führt dies zu einer chronischen T-Zell-Stimulation.
Die obligatorische Rolle des IL-4 zur T_H2-Differenzierung wirft die Frage auf, woher der ursprüngliche Stimulus zur IL-4 Produktion kommt, wenn T_H2-Zellen die Hauptquelle der IL-4-Produktion sind. Eine mögliche Erklärung ist, dass antigenstimulierte CD_4^+-Zellen geringe Mengen des IL-4 von Anbeginn ihrer Aktivierung bilden. Schlüssel zur T_H2-Differenzierung könnte somit eine persistierende oder wiederholte T-Zell-Stimulierung mit nur geringer Entzündung oder Makrophagen-Aktivität sein.

Eine Differenzierung der T-Helferzellen wirkt sich nicht nur auf die Zytokinproduktion aus, sie ruft auch Änderungen in der Produktion bestimmter Antikörpersubklassen hervor. Diese spezifischen Subklassen sind zum Verständnis der Immunlage und damit auch dieser Arbeit wichtig und werden im folgenden näher erläutert.

Kardinalfunktion der T_H1-Zellen ist die Organisation einer phagozyten-vermittelten Abwehr von Infektionen. Von T_H1-Zellen produziertes IFN-γ stimuliert die bakterizide Aktivität der Phagozyten und die Produktion der opsonierenden und komplementbindenden Antikörper der Klasse IgG_{2a}. IL-2 aus T_H2-Zellen wirkt als deren autokriner Wachstumsfaktor und stimuliert zusammen mit IFN-γ die Proliferation und Differenzierung von CD_8^+ zytotoxischen T-Zellen, die von Bakterien oder Viren infizierte Zellen abtöten und so diese Infektionen eradizieren (siehe zu diesen Prozessen Abbildung 1.3)

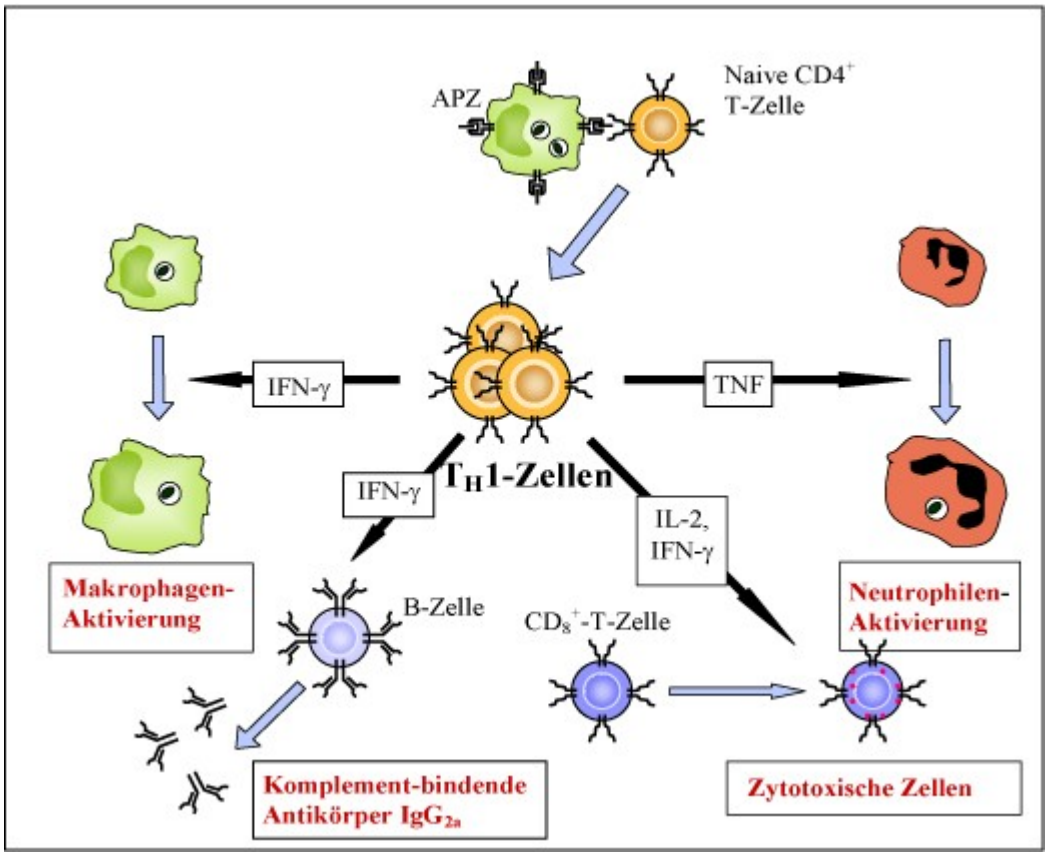


Abbildung 1.3: Effektor-Funktion der T_H1-Zellen

Zu T_H1 differenzierte T-Zellen bewirken durch IFN-γ, IL-2 und TNF verschiedene Änderungen wie Makrophagen- und Neutrophilenaktivierung, wie auch die Aktivierung zytotoxischer Zellen. Ebenfalls wird der IgG Subtyp 2a stärker ausgeprägt.APZ: antigen-präsentierende Zelle , TNF: Tumor-Nekrose-Faktor

Anhand dieses Abschnittes ist verständlich, dass in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der T_H1-Aktivität die Parameter IFN-γ und spezifisches IgG_{2a} bestimmt wurden.

Kardinalfunktionen der T_H2-Zellen sind der Aufbau von IgE- und Eosinophil- und Mastzell-vermittelten Immunreaktionen. Diese sind allergische Reaktionen im Sinne eines T_H2-Phänomens. Induziert werden diese Reaktionen durch IL-4, IL-5 und IL-13. Die genannten Zytokine bewirken einen Wechsel der Antikörperproduktion zu den T_H2-typischen Klassen IgE und IgG_1, fördern die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen, die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und antagonisieren zudem die Wirkung von IFN-γ (siehe hierzu Abbildung 1.4). Die Antikörperklassen IgE und IgG_1 fördern keine Aktivierung der Makrophagen oder des Komplementsystems.

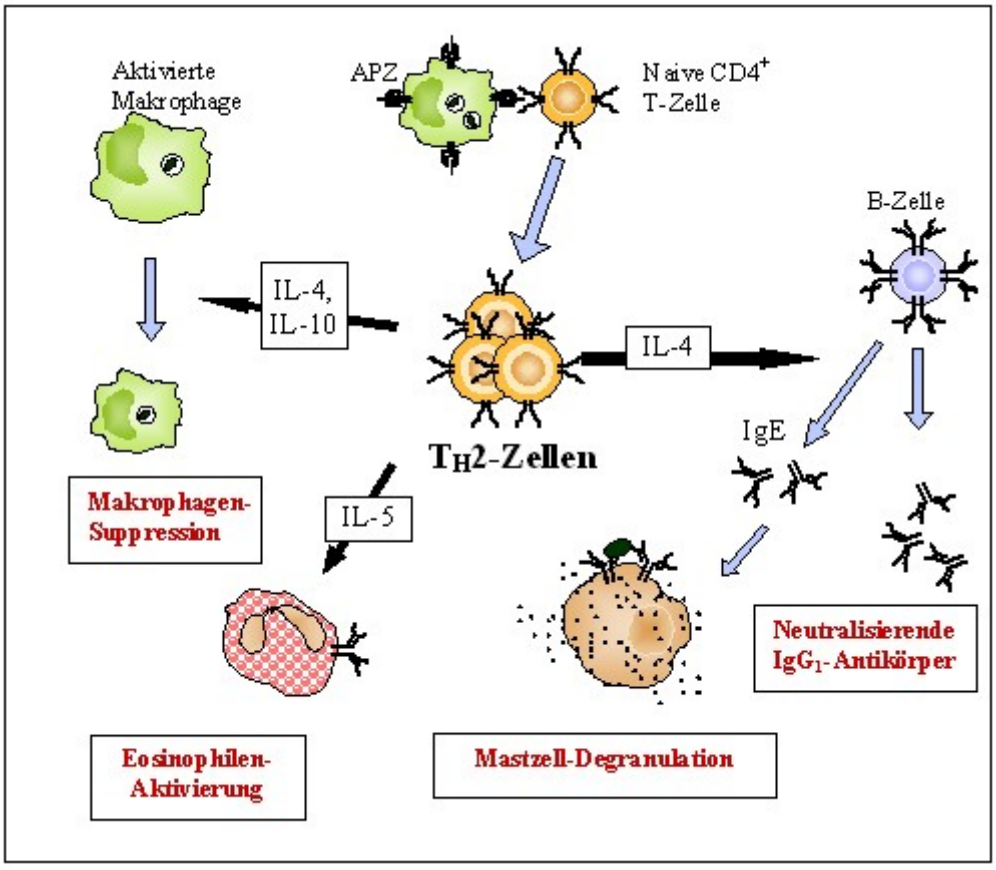


Abbildung 1.4: Effektorfunktion der T_H2-Zelle

Zum T_H2-Typ differenzierte T-Zellen bewirken durch IL-4 und IL-10 verschiedene Änderungen wie Makrophagensuppression und eine Produktion von IgE und IgG_1. In der Folge wird damit auch eine verstärkte Mastzell-Degranulation hervorgerufen. IL-5 bewirkt eine Eosinophilen-Aktivierung.. APZ: antigen-präsentierende Zelle

Zur Bestimmung einer Immundeviation im Sinne eines T_H2-Typs ist daher eine Bestimmung der Titer von IgE, spezifischem IgG_1, IL-5 und IL-4 nötig.

1.3 *Schritte der allergischen Reaktion*

In den vorigen Abschnitten wurden fundamentale Prozesse im Immunsystem dargestellt, die zum Verständnis dieser Arbeit unabdingbar sind. Auf dieser Grundlage werden in diesem Abschnitt die Muster der allergischen Reaktion besprochen. Die Vorbehandlung der Muttertiere und damit verbunden die Exposition der Jungtiere findet im folgenden seine theoretische Grundlage.
Vor dem Einsetzen einer allergischen Reaktion steht die Sensibilisierung des Immunsystems. Tritt durch Exposition gegenüber einem Allergen dieses in den Grenzzonen des Organismus (zum Beispiel Epithel oder Mukosa) auf, wird es von akzessorischen Zellen des Immunsystems wie den dendritischen Zellen aufgenommen, prozessiert und die Peptidfragmente in Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomlex Klasse II (MHC-II) präsentiert. Der Peptid-MHC II-Komplex wird vom T-Zell-Rezeptor naiver T-Zellen erkannt. Dieser besteht aus einer variablen Vα-und einer Vβ-Kette neben konstanten Anteilen und ist genetisch fixiert. Bestimmte Subtypen von Vβ-Ketten konnten mit einer Prädisposition zu allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Renz et al., 1995, Beyer et al. 1999, Ariail et al. 1998). In der vorliegenden Studie ist diese Tatsache ein entscheidender Punkt, da für die Muttertiere ein Mausstamm gewählt wurde, der einen nicht zur Allergie prädisponierenden Vβ-Subtyp besitzt (SJL). Die Nachkommen dagegen erhalten genetische Kompetenz durch den Vβ-Subtyp des Vaters (Balb/c), da dieser Mausstamm sehr zur Allergieausbildung neigt. Mehr hierzu unter dem Abschnitt Immunologie der Maus.

Ein zweites kostimulierendes Signal wird über den Kontakt des T-Zell-Oberflächenmoleküls CD28 mit Molekülen auf der antigenpräsentierenden Zelle der B7-Familie vermittelt. Daraufhin proliferiert die T-Zelle und differenziert sich in Abwesenheit einer viralen oder bakteriellen Infektion zum T_H2-Typ.

Die T_H2-Zelle produziert das für sie typische Zytokinmuster von IL-4, IL-5 und IL-13. An der B-Zelle bewirkt IL-4 einen Wechsel der Produktion von IgM- zu IgE-Antikörpern. Zudem tritt die T_H2-Zelle über das Oberflächenmolekül CD 40 mit B-Zellen in Kontakt und bewirkt damit die Produktion von antigen-spezifischem IgE. Die Wirkung der produzierten Zytokine beinhaltet eine Aktivierung und Stimulierung von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten. Diese setzen wiederum Mediatoren wie Leukotriene, Prostaglandine u.a. frei und rufen so die Gesamtreaktion des Organismus hervor. Eine weitere Proliferation und Differenzierung von T_H2-Zellen wird durch IL-4 und IL-13 begünstigt.

Von B-Zellen sezerniertes IgE bindet mit dem F_C-Teil an hochaffine $Fc_\varepsilon1$-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten sowie an niedrig-affine $Fc_\varepsilon2$-Rezeptoren auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen. Dadurch sind die Zellen allergenspezifisch sensibilisiert. Bei einer erneuten Exposition kommt es zu einer Kreuzvernetzung der membrangebundenen IgE-Moleküle und zur konsekutiven Degranulation der Zelle. Eine rapide Freisetzung vasoaktiver Mediatoren bewirkt die Symptomatik der allergischen Reaktion vom Sofort-Typ.

1.4 *Genese allergischer Erkrankungen*

Allergie ist eine Dysregulation des Immunsystems mit multifaktorieller Ursache. Genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse zählen zu den Hauptfaktoren. Da Allergien häufig innerhalb von Familien auftreten, ist ein genetischer Zusammenhang anzunehmen. Genetische Einflüsse können verschieden wirken: durch Kodierung von MHC I und II sowie des T-Zell-Rezeptors wird in den Prozess der Antigenrepräsentation und –erkennnung eingegriffen.

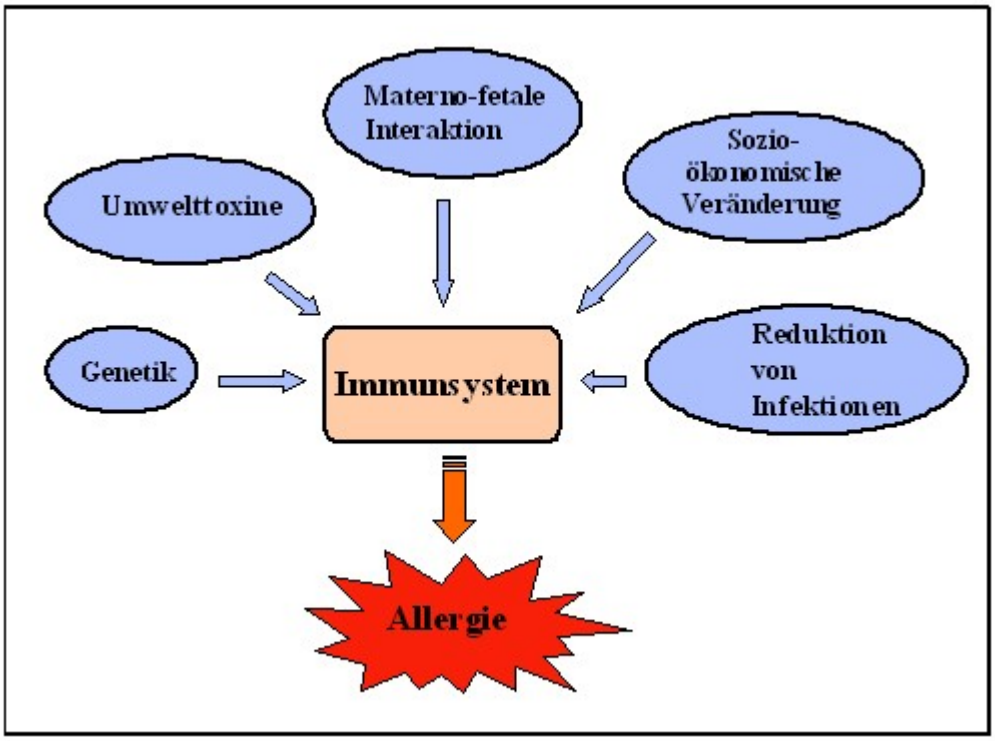


Abbildung 1.5: Multifaktorielle Genese allergischer Erkrankungen
Allergie ist eine Erkrankung des Immunsystems und damit von vielen Faktoren wie Genetik und Umweltfaktoren abhängig.

Hierzu wurde bereits auf die Vβ-Ketten des T-Zell-Rezeptors eingegangen, die eine allergische Reaktion begünstigen können. Ebenfalls ist die Zytokinantwort genetisch beeinflussbar. Kandidatengen hierfür ist z.B. der IL-4 Cluster auf Chromosom 5, der für die „allergischen" Zytokine IL-3, -4, -5,-9, und –13 kodiert. Eine Untereinheit des hochaffinen IgE Rezeptors $Fc_{\varepsilon}1$ findet sich auf Chromosom 11q. Das für IFN-γ, ein starker Suppressor der T_H2-Antwort, codierende Gen wurde auf Chromosom 12p entdeckt.

Eine allein genetische Erklärung kann den Anstieg der Allergien in den letzten 50 Jahren nicht erklären. Dass außer der Genetik zusätzliche Faktoren für die Entwicklung atopischer Erkrankungen verantwortlich sind, zeigen z.B. Studien, an monozygotischen Zwillingen (Miller et al. 2005), die keine komplette Konkordanz aufweisen. Dies allein zeigt schon, dass Allergie eine multifaktorielle Erkrankung sein muss (siehe Abbildung 1.5). Andere Studien belegen, dass atopische Erkrankungen in ländlichen Gegenden und Entwicklungsländern sehr selten sind. Es wird vermutet, dass in Entwicklungsländern parasitäre Infektionen protektiv gegenüber einer

Entwicklung von Allergie und Asthma wirken. So zeigte sich bei Kindern aus einer Kohorte, die mit Askariden befallen waren, nach erfolgreicher Therapie, eine Sensibilitätssteigerung im Hauttest gegen Hausstaub, während in der Kohorte der unbehandelten Kinder die Reagibilität des Hauttests weiter sank (Selassie et al.,2000; Bigelaar AD et al.,2004) Ein Erklärungsmechanismus für dieses Phänomen ist, dass die Oberfläche der Mastzellen mit parasitenspezifischen IgE besetzt und damit die allergenspezifischen IgE „verdünnt“ werden. Betrachtet man die entwickelte Welt, funktioniert das parasitäre Erklärungsmodell mangels Befall nicht. Andere Faktoren wie Umweltverschmutzung, Familiengröße, sozio-ökonomischer Status und Ernährungsgewohnheiten erscheinen nach Studien der west- und ostdeutschen Bevölkerung (Nikolai T et al. 1997) als entscheidend. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass neben der Genetik und den variierenden postnatalen Umwelteinflüssen bereits pränatal in utero eine Bahnung in Richtung des allergischen Phänotyps stattfinden könnte (Blumer N et al. 2005; Karmaus W et al. 2005). Der maternale allergische Phänotyp, eine Allergenexposition während der Gravidität und das uteroplazentare Milieu werden als Einflussfaktoren diskutiert. Hinweise für eine intrauterine Immundeviation sind der Nachweis von proliferativen Immunantworten und allergenspezifischem IgE im Nabelschnurblut (Sadeghnejad et al. 2004). Der sich entwickelnde Fetus ist komplexen maternalen, internen und externen Faktoren ausgesetzt. Eine Verschiebung dieser Einflussgrößen könnte zu einer frühzeitigen Immundeviation des Fetus im Sinne einer T_H2-Gewichtung in utero führen, die wiederum eine höhere Bereitschaft zur Ausbildung allergischer Erkrankung haben könnte. Daher zielt der Ansatz dieser Arbeit ganz bewusst darauf ab, Veränderungen in der Schwangerschaft im Sinne einer Allergenexposition hervorzurufen und den Effekt im späteren Leben zu analysieren.

1.5 Schwangerschaft als T_H2-Phänomen

Im Ansatz dieser Arbeit spielt die Schwangerschaft eine besondere Rolle, da zu dieser Zeit die Versuchsgruppen unterschiedlich behandelt werden. Daher ist das Verständnis der immunologischen Vorgänge während dieser Periode wichtig. Im folgenden werden die grundlegenden Prozesse erläutert.
Der Fetus weist auf seinen Zelloberflächen sowohl maternale als auch paternale Antigene auf. Damit ist er aus immunologischer Sicht ein allogener Fremdkörper, der zunächst durch das mütterliche Immunsystem abgestoßen werden müsste. Um eine Abstoßung zu verhindern, existieren verschiedene Mechanismen, die auf unterschiedlichen Ebenen die Immunantwort der Mutter aushebeln. Auf Ebene der Antigenerkennung wird das maternale Immunsystem durch die Expression unkonventioneller fetaler MHC behindert. Feten exprimieren nicht ein normales MHC wie HLA-A, -B oder -C, sondern HLA-G, welches die Bindung an maternale T-Zell-Rezeptoren erschwert. Zusätzlich erfolgt eine Maskierung der fetalen Antigene durch maternale Maskierungsantikörper. Durch strukturelle Asymmetrie sind diese Antikörper nicht in der Lage, eine Immunantwort in Gang zu setzen (Gutierrez et al. 2005, Jin et al. 2005). In der Immunregulierung zeigt sich auf plazentarer Ebene ein supprimiertes Immunsystem, das durch plazentare Immunsuppressionsfaktoren wie α-PAG und das bekannte Progesteron hervorgerufen wird (Clark DA 2005).

Einer der wichtigsten Punkte ist allerdings die Hochregulation des T_H2-Immunsystems gegenüber dem T_H1-Systems. Folge ist die Abwendung zelltoxischer Aktivität, die für eine Abstossungreaktion notwendig ist. Zugleich wird eine Produktion von Blockierungsantikörpern durch diese Verschiebung erst ermöglicht. Studien zeigen, dass T_H2-Zytokine die Schwangerschaft unterstützen (Clark et al 2005), T_H1-Zytokine wirken dagegen fetozid und können zu einem vorzeitigen Schwangerschaftsabbruch führen (Dong et al. 2005) (siehe Abbildung 1.6).

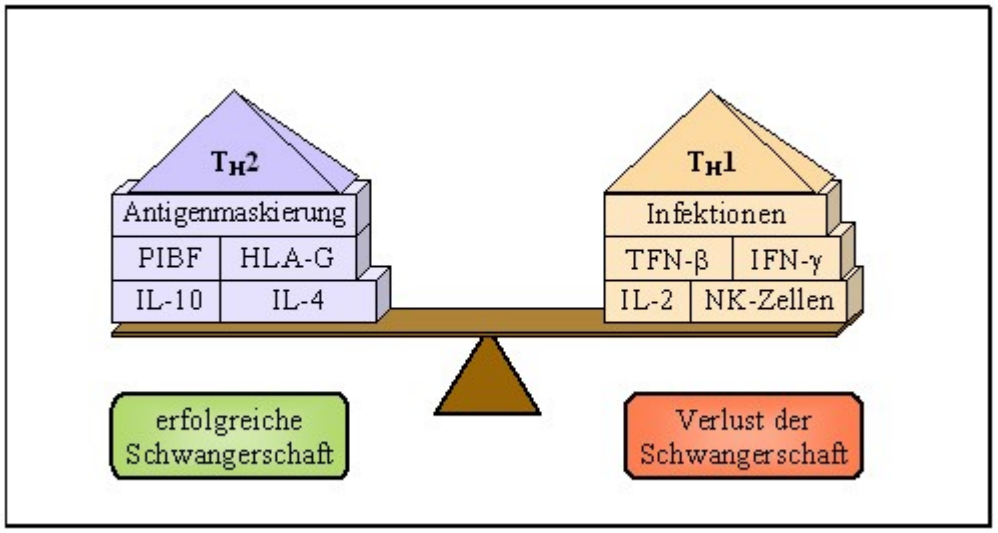


Abbildung 1.6: protektive versus toxische Faktoren in der Schwangerschaft
Im Verlauf der Schwangerschaft bildet sich ein immunologisches Milieu, das Abstoßungsreaktionen gegen den Fetus unterdrückt. Zu den protektiven Faktoren zählen unter anderem IL-4 und IL-10 wie auch das Antigenmasking. Mit Abstoßung können IL-2, IFN-γ und Infektionen im allgemeinen in Verbindung gebracht werden.

Die Folge eines T_H2-Übergewichtes ist eine Supprimierung der zytotoxischen Lymphozyten und NK-Zellen, die den Trophoblasten attackieren können und beim spontanen Abort beteiligt sind. IFN-γ inhibiert die uterine Sekretion von wachstumsstimulierenden Substanzen wie GM-CSF. IL-2 kann im plazentaren Gewebe nur in vitro nachgewiesen werden, in vivo sind anscheinend nur kleinste Mengen vorhanden. Damit könnte eine Blockade des IL-2 ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der mütterlichen Toleranz sein.

Intrauterine Umgebung und fetale Sensibilisierung

Es stellt sich die Frage, inwieweit die T_H2-Gewichtung des mütterlichen Immunsystems den Fetus beeinflusst. Studien mit atopischen Müttern haben im Nabelschnurblut erhöhte IgE-Konzentrationen belegt, welche einen Risikofaktor für spätere allergische Erkrankungen darstellten. Die erhöhte Reagibilität mononukleärer Zellen aus dem Nabelschnurblut gegenüber Allergenen wie β-Laktoblobulin (BLG) oder Ovalbumin (OVA) ist mit einem

erhöhten Risiko für das Auftreten eines atopischen Ekzems innerhalb des ersten Lebensjahres assoziiert.
Diese Zusammenhänge werfen die Frage nach dem Mechanismus der intrauterinen Allergenexposition auf. Zu fragen ist auch, warum nur einige Kinder allergische Symptome nach der Geburt aufweisen und andere nicht.

Einige Konzepte arbeiten mit der Theorie einer Übertragung plazentarer Zytokine in die fetale Zirkulation. Rein anatomisch ist es allerdings schwer vorstellbar, wie Zytokine der Dezidua und des Amnionzellen, welche relativ weit vom Fetus entfernt sind, das kindliche Immunsystem beeinflussen können. An diesem Punkt bekommt die Amnionflüssigkeit, in der der Fetus während der Schwangerschaft „schwebt", entscheidendes Gewicht. Der Weg für die Zytokine der Dezidua in die Amnionflüssigkeit ist sehr kurz, und damit durchaus wahrscheinlich.

In der Tat findet man in der Amnionflüssigkeit viele der bereits beschriebenen Zytokine (Mazzuchelli I et al., 2004, Jones CA 1997). Die Exposition des Fetus gegenüber der Amnionflüssigkeit ist vielfältig: der Fetus trinkt Amnionflüssigkeit, einer der Hauptfaktoren des mit 70% hohen Protein-Tagesumsatzes. Während des Trinkvorganges aspiriert der Fetus zudem einen Teil der Flüssigkeit. Daher sind neben der Haut und des Gastrointestinaltraktes auch die Lunge gegenüber der Amnionflüssigkeit exponiert. Auf diese Weise kann der Fetus Zytokine in immunwirksamen Dosen aufnehmen. Auf gleiche Weise könnten auch Antigene Kontakt zu fetalen Oberflächen finden. Eine Beeinflussung des fetalen Immunsystems auf diese Weise ist wahrscheinlich.

Maternaler Immunglobulintransfer

Um das Kind bis zur Reife des eigenen Immunsystems vor bestimmten Infektionen zu schützen, wird von der Mutter IgG, aber auch Zytokine, wie IL-6 und IL-8 auf das Kind übertragen. Allerdings bewirkt diese Übertragung nicht nur einen Schutz des kindlichen Organismus, sondern auch dessen Immunmodulation (Jarrett E 1983). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Übertragung von Antikörpern eine Reaktion vom Typ I hemmt (Victor J et

al., 2003) Daher hat die Bestimmung der Antikörper im Rahmen der intrauterinen Sensibilisierung einen besonderen Stellenwert. Der größte Anteil des maternofetalen IgG-Transportes findet nach der 22. Schwangerschaftswoche statt. Im humanen System wird mütterliches IgG durch die Plazenta direkt in das Blut des Feten transportiert. Bewerkstelligt wird der Transport über einen spezifischen IgG-Rezeptor, der im humanen System in der Plazenta, bei Nagetieren im Darm lokalisiert ist. Bei Nagetieren dient dieser spezifische Rezeptor der postnatalen IgG-Aufnahme bis dieser Rezeptor nicht mehr exprimiert wird (sogenannte „ gut closure“) (MacKenzie et al. 1984). Ein pränataler IgG-Transfer findet bei Nagetieren über den Dottersack statt.

1.6 *Immunologie der Maus*

Viele der hier vorgestellten Erkenntnisse über die immunoregulatorischen Prozesse stammen aus der Analyse des murinen Immunsystems. Die Rolle der T-Helfer-Zellen bei der allergischen Sensibilisierung und deren damit verbundene Einteilung in T_H1- und T_H2-Phänotyp wurden zuerst aus Untersuchungen an der Maus gewonnen. Obwohl sich einige Mediatoren und Immunglobuline von der humanen Struktur unterscheiden, zeigten Analysen des humanen Immunsystems, dass die wesentlichen immunologischen Mechanismen der allergischen Reaktion bei Maus und Mensch weitgehend identisch sind.

Zur Durchführung weiterführender Analysen der Pathomechanismen sind in vivo Modelle unverzichtbar. Aufgrund einfacher Handhabung bietet sich das Mausmodell an. Als Modell wurden die Balb/c und die SJL Maus gewählt. Mit dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) wurden bisher wichtige Mechanismen der Immunpathogenese der allergischen Erkrankung im murinen System gewonnen.

Unterschiedliche Immunkapazitäten der Mausstämme

In der vorliegenden Studie wurden genetisch unterschiedliche Mausstämme benutzt, um eine genetisch fixierte Disposition zur Ausbildung allergischer Reaktionen mit in die Untersuchungen einfließen zu lassen. In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen hierzu vorgestellt.

Die unterschiedlichen Maus-Inzuchtstämme zeigen ein stark unterschiedliches Ansprechen auf allergene Substanzen (Holt PG et al., 1981). In Studien wurden Mausstämme bezüglich ihres Verhaltens gegenüber Ovalbumin in zwei Kategorien eingeteilt: starke Immunantworten wurden als „high-responder“ bezeichnet, schwache Immunantworten entsprechend als „low-responder“. Beispielhaft steht der Mausstamm Balb/c für einen high-responder und der Stamm SJL für einen low-responder.

Weiterführende Studien (Mori A et al. 1990) zeigten, dass der Unterschied zwischen high- und low-responder grundsätzlich mit einer erhöhten bzw. verminderten Fähigkeit der IL-4 Produktion einhergeht. IL-4 gilt als das entscheidende T_H2-Zytokin. Mehr auf Rezeptoren gerichtete Studien (Renz 1992, Diele et al. 1994, Herz U et al., 1999) zeigten eine Abhängigkeit der Immunantwort von den V_β- Subketten des T-Zell-Rezeptors. Hier zeigt insbesondere die Untergruppe $V_\beta8$ eine besondere Neigung zur Ausprägung von allergischen Reaktionsmustern. Diese fehlt zum Beispiel in SJL-Mäusen. Durch Transfer-Experimente mit $V_\beta8^{+/+}$ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass nach deren Übertragung auch SJL-Mäuse zu einer starken allergischen Reaktion in der Lage sind (Herz U et al., 1999).

Für die vorliegende Studie wurden Tiere der Inzucht-Stämme SJL und Balb/c gewählt. Der Stamm SJL zeigt keine $V_\beta8$- Subketten und zeigt damit keine allergischen Reaktionen, während der Stamm Balb/c $V_\beta8$- Subketten besitzt. und somit auch eher allergische Reaktionen ausbildet. Die Muttertiere entsprangen dem Stamm SJL, die Vatertiere dem Stamm Balb/c. Durch Verpaarung wurden Jungtiere F_1(SJL x Balb/c) gekreuzt, die durch die genetische Kompetenz gegen das Modellallergen OVA reagieren. Diese wuchsen in dem intrauterinen Milieu des SJL-Muttertieres, eines non-responders auf. Mit dieser besonderen Konstellation sollten die folgenden Fragen beantwortet werden.

Fragestellungen:

Mit obigem Ansatz wurden folgende Fragen untersucht:

- *Hängt die Entwicklung einer allergischen Reaktion zu einem späteren Zeitpunkt im Leben von der maternalen Immunität ab ?*

- *Ist dieser allergische Phänotyp durch bestimmte T-Zell-Subtypen in den Muttertieren und/oder Jungtieren determiniert ?*

- *Welche Rolle spielt die pränatale Allergen-Exposition bei der Entstehung von Allergien im Kind ?*

II. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden 6 bis 8 Wochen alte Mäuse von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Es handelte sich um Mäuse der Inzuchtstämme SJL und Balb/c. Die Tiere erhielten ovalbumin-freies Futter und Wasser ad libidum. Zur Verpaarung saßen in einem Käfig zwei Weibchen und ein Männchen. Kurz vor der Geburt der Jungtiere wurde das Männchen in einen Einzelkäfig umgesetzt. Die Jungtiere wurden im Alter von ca. 20 Tagen von der Mutter abgesetzt und die Weibchen von den Männchen getrennt.

2.1.2 Aktive Sensibilisierung gegen Ovalbumin

Chemikalien:

- Ovalbumin, OVA Grade VI — Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- Ovalbumin, OVA Grade V — Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- Aluminiumhydroxid $Al(OH)_3$ — Pierce, Rockford, Illinois, USA
- PBS-Dulbecco — Seromed. Biochrom, Berlin, D

Materialien:

- Pari-Boy® — Pari-Werke, Starnwerk, D
- Plastikkammer (20 x 20 x 15 cm^3) — Klinik Zehlendorf,Berlin, D
- Kanülen, Injektionsnadeln — Terumo Europe N.V., Leuven, B
- 1ml Spritzen — Becton Dickinson, Heidelberg, D

Sowohl SJL- als auch Balb/c-Weibchen erhielten je eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit Ovalbumin (OVA) an den Tagen 1, 14 und 28 (systemische Sensibilisierung). Eine Injektion enthielt 200 µl PBS mit 10 µg OVA (Grade VI), adsorbiert an 1,5 mg $Al(OH)_3$. Am Tag 28 wurden die Weibchen mit den nicht-sensibilisierten Balb/c-Männchen verpaart. Darauf folgte bis zur Geburt der Jungtiere jeden zweiten Tag eine Exposition gegenüber einem OVA-Aerosol (inhalative Sensibilisierung). Hierzu wurden die Mäuse für 15 min in einer 20 x 20 x 15 cm großen, abgedichteten Plastikkammer dem von einem Generator (Pari-Boy®) erzeugten Aerosol (10 µg OVA Grade V in PBS) ausgesetzt.

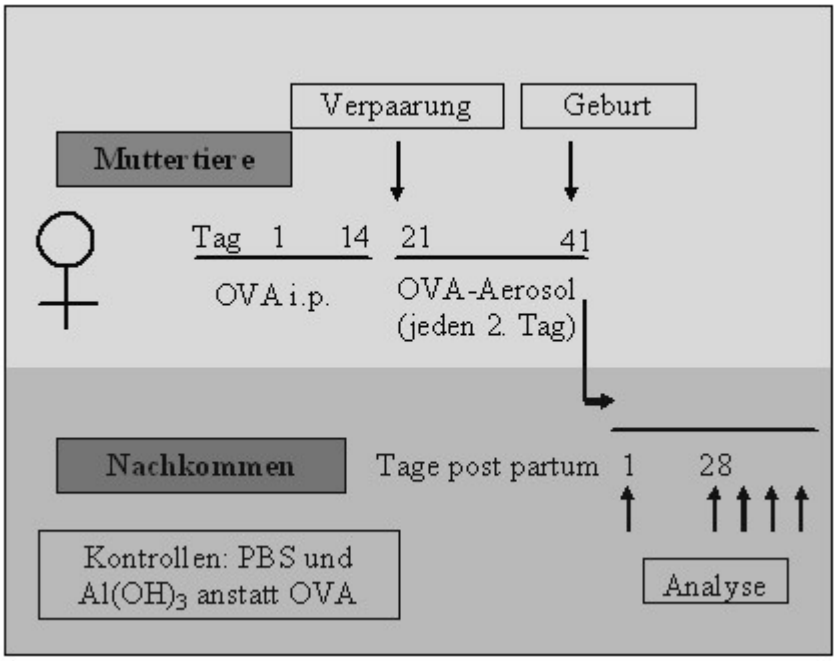


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der aktiven Sensibilisierung gegen Ovalbumin.
Vorbehandlung der Muttertiere entsprechend der Gruppenzuordnung am Tag 1,14 und 21. Verpaarung am Tag 21 Aerosolbehandlung nach Gruppenzugehörigkeit jeden 2. Tag während der Tragezeit. Analyse der Mutter- und Jungtiere am Tag1 und 28 postpartal.

2.1.3 Exposition gegen ß-Laktoglobulin

Die Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1 erhielten am 28. Tag post partum eine Injektion intraperitoneal (i.p.) ß-Laktoglobulin (BLG). Hierzu wurden 100 µl Lösung mit 10 µg BLG verabreicht.

2.1.4 Kontrollgruppen

Als Kontrollkollektiv dienten nicht sensibilisierte SJL- bzw. Balb/c-Muttertiere. Eine Gruppe der nicht-sensibilisierten Muttertiere wurde nur gegen PBS exponiert (i.p.-Injektion; PBS-Aerosol-Exposition). Die übrige Gruppe (nur SJL-Tiere) erhielt das Adjuvans $Al(OH)_3$ (i.p.-Injektion; PBS-Aerosol-Exposition). Im folgenden werden diese Gruppen mit „PBS“, bzw. mit „$Al(OH)_3$“ bezeichnet.

2.2. Vorgehen am Tier

2.2.1 Serumgewinnung

Vor der Behandlung wie auch zu den Analysezeitpunkten wurde den Tieren Blut aus der ventralen Schwanzvene entnommen. Nach Gerinnung und Zentrifugation (1200 rpm,10 min) wurde der Serumüberstand abgenommen und bis zur Analyse bei -20° C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

2.2.2 Milzpräparation

Materialien:

- 2-Propanol (70% in aqua dest.) Merck, Darmstadt, D
- Präparationsbesteck J. Schmid Laborbedarf, Berlin

Das Töten der Tiere erfolgte zum Zeitpunkt der Versuche durch zervikale Dislokation. Nach Desinfektion des Fells und der Haut mittels 70 %igem Alkohol wurde der Peritonealraum eröffnet und die Milz entnommen.

2.3 Behandlung der Zellen

2.3.1 Dichtegradienten-Zentrifugation der mononukleären Milzzellen

Chemikalien:

- Medium RPMI 1640 — Biochrom, Berlin, D
- Trennmedium Lympholyte® — Cedarlane, Hornby, Kanada
- Kulturmedium:

Medium RPMI 1640	Biochrom, Berlin, D
Glutamin [2mM]	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Streptomycin [100mg/ml]	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Penicillin [100 U/ml]	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Amphotericin B [1,25 mg/ml]	Gibco BRL, Eggenstein, D
Fetales Kälberserum (10%)	Gibco BRL, Eggenstein, D

Materialien:

- Feinmaschiges Drahtnetz — Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- Steriles Plastikmaterial Falcon — Becton Dickinson Labware, F
- Sterilbank (Lamina Air HBB 2448) — Heraeus, Berlin, D
- Brutschrank (37° C, 5 % CO_2) — Heraeus, Berlin, D
- Zentrifuge Rotina 48 RS — Hettich, Tuttlingen, D
- Cell-Dyn® — Abbott Laboratories, Illinois, USA

Aus der steril präparierten Milz wurden die Zellen mittels eines feinmaschigen Metallnetzes aus dem Verband gelöst und durch wiederholtes Resuspendieren in 2 ml Medium homogenisiert. Diese Zellsuspension wurde auf 3 ml Trennmedium geschichtet und 20 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Durch diese Dichtegradienten-Zentrifugation ließen sich

mononukleäre Zellen von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten trennen. Die mononukleären Zellen sammelten sich aufgrund ihrer Dichte in einem Interphasering an, welcher nach Ablauf der Zentrifugation mit einer Pipette abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen (10 min, 1000 rpm, RT) und in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauerkammer oder im Cell-Dyn®.

2.3.2 Zellzählung in der Neubauerkammer

Der gewonnenen Zellsuspension wurden ca. 10 µl entnommen und die Zellen mit Bromthymolblau angefärbt. Nach Auftragen in die Neubauerkammer erfolgte die Auszählung unter dem Lichtmikroskop mit einem 40er-Objektiv. Ausgezählt wurden die 4 großen Eckquadrate der Kammer. Berechnung der Zellkonzentration:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl der Quadrate}}{4 \times \text{Fläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{Zellen}/\mu\text{l}$$

Pro Eckquadrat mit einer Seitenlänge von 1 mm ergibt sich eine Fläche von 1 mm^2. Die Kammerhöhe beträgt 0,1 mm.

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Analyse der Immunglobulin- und Zytokinproduktion mit Lymphozytenkulturen

Allergenspezifische Lymphozyten können durch Stimulantien wie PMA zur Immunglobulin- und Zytokinproduktion angeregt werden. Die sezernierten Immunglobuline und Zytokine werden im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Materialien:

- 24 well Mikrotiterplatten Falcon — Becton Dickinson Labware
- Kryoröhrchen 1 ml — Nunc, Roskilde, Dänemark
- Medium RPMI 1640 — Biochrom, Berlin, D
- Stimulantien für die Zellkultur:
  - Ionomycin — Sigma Chemie München, D
  - PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) — Sigma Chemie München, D

Auf einer 24-well-Mikrotiterplatte wurden 2 x 10^6 Milzzellen/ well in Medium gebracht, mit PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (1µg/ml) stimuliert und bei 37° C, sowie 5% CO_2 Luftanteil kultiviert. Das Gesamtvolumen eines wells betrug 1 ml. Nach 24h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, in 1 ml Reaktionsgefäße überführt und bei –20° C bis zur Messung der Zytokinkonzentration aufbewahrt.

2.4.2 Analytische Durchflußzytometrie

Mit der Immunfluoreszenztechnik am Durchflußzytometer können Lymphozyten in Subpopulationen eingeteilt und qualitativ analysiert werden. Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften bilden die Grundlage zur Analyse der einzelnen Zellen. Oberflächenmoleküle der Zellmembran werden mit an Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern markiert. Eine genaue Zelltypisierung erfolgt durch Registrierung der relativen Zellgröße, der Granularität (Verhalten im Streulicht) sowie der verschiedenen Fluoreszenzfarben.

Materialien:

- FACS-Röhrchen, Falcon — Becton Dickinson Labware
- Fluorescence Cell Scaner, FACScan — Becton Dickinson Hamburg
- Cell Quest Research Software (Macintosh) — Becton Dickinson Hamburg

Färbung der Oberflächenantigene

Zum Nachweis der entsprechenden Oberflächenantigene wurden Antikörper an Fluorochrome (Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Cy5), gekoppelt. Pro Färbung wurden zwischen 10^4 – 10^7 aufgereinigte Milzzellen/ ml (siehe Material und Methoden, 1.7) eingesetzt und 100 µl der Zellsuspension mit 1 µl monoklonalem Antikörper 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Anteil an nicht-gebundenem Antikörper zu entfernen, wurden die gefärbten Zellen anschließend zweimal in 3 ml PBS gewaschen (1000 rpm, 10 min). Das erhaltene Zellpellet wurde in 100 µl PBS aufgenommen, resuspendiert und im Durchflußzytometer gemessen. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Isotypen eingesetzt.

Monoklonale Antikörper gegen Immunglobuline:
Pharmingen, Hamburg, D

anti-Maus CD 3	PE
anti-Maus CD 3	FITC
anti-Maus TCR $V_\beta 2$	FITC
anti-Maus TCR $V_\beta 6$	FITC
anti-Maus TCR $V_\beta 8$	FITC
anti-Maus H-2 K^d	PE
anti-Maus H-2 K^s	FITC

2.4.3 Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik wird zur Quantifizierung von Antigenen und Antikörpern angewendet. Mit dieser Methode wurden die Immunglobulinkonzentrationen im Maus-Serum sowie die Immunglobulin- als auch Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Prinzip und Durchführung der Zytokin-ELISA

Chemikalien:

- Natruimbicarbonat (coating puffer pH 8,2) — Serva, Heidelberg, D
- Phosphat-buffered-saline (PBS), pH 7:
  - 8 g Natriumchlorid NaCl — Merck Darmstadt, D
  - 16 g Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 — Merck Darmstadt, D
  - 0,2 g Kaliumchlorid KCl — Merck Darmstadt, D
  - 0,2 g Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 — Merck Darmstadt, D
  - auf 1l Aqua dest.
- Blockpuffer, pH 7:
  - PBS
  - 3% Bovines Serum-Albumin (BSA) — Sigma, Deisenhofen, D
- Waschpuffer, pH 7:
  - PBS
  - 0,1 % Tween 20 — Sigma, Deisenhofen, D
- Streptavidin-Peroxidase — Calbiochem, Bad Soden, D
- Verdünnungspuffer, pH 7:
  - PBS
  - 3 % BSA
  - 0,1 % Tween 20
- BM blue, POD-Substrat — Roche, CH
- Schwefelsäure H_2SO_4 2M — Merck Darmstadt, D

Materialien:

- 96-well-Mikrotiterplatten — Nunc,Wiesbaden Bieberich, D
- Schüttler IKA-Schüttler MTS 4
- Mikrotiterplatten-Washer — Tecan, Crailsheim, D
- Mikrotiterplatten-Reader Sunrise — Tecan, Crailsheim, D
- ELISA-Auswertungssoftware Magellan — Tecan, Crailsheim, D

Monoklonale Antikörper gegen Zytokine: Pharmingen, Hamburg, D

Primäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	(Ratte IgG_1)
	anti-Maus	IL-5	(Ratte IgG_1)
	anti-Maus	IFN-γ	(Ratte IgG_1)
Sekundäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	(Ratte IgG_{2a})
(biotinyliert)	anti-Maus	IL-5	(Ratte IgG_{2a})
	anti-Maus	IFN-γ	(Ratte IgG_{2a})
Standards:	rekombiniertes	IL-4	(Spez.Aktivität 10^7 U/mg)
	rekombiniertes	IL-5	(Spez.Aktivität 10^7 U/mg)
	rekombiniertes	IFN-γ	(Spez.Aktivität 10^6 U/mg)

verwendete Konzentrationen:

Primäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	1 µg/ ml
	anti-Maus	IL-5	3 µg/ ml
	anti-Maus	IFN-γ	2 µg/ ml
Sekundäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	0,25 µg/ ml
	anti-Maus	IL-5	0,50 µg/ ml
	anti-Maus	IFN-γ	1,00 µg/ ml
Standards:	rekombiniertes	IL-4	3,9-2000 pg/ ml
	rekombiniertes	IL-5	3,9-2000 pg/ ml
	rekombiniertes	IFN-γ	3,9-2000 pg/ ml
Detektionslimits:	rekombiniertes	IL-4	50 pg/ ml
	rekombiniertes	IL-5	50 pg/ ml
	rekombiniertes	IFN-γ	5 pg/ ml

Durchführung :

96-well-Mikrotiterplatten wurden mit primärem Antikörper beschichtet (gelöst in Carbonatpuffer) und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Auswaschen des Anteils an nicht gebundenem Antikörper wurden durch den Blockpuffer unspezifische Bindungen gesättigt (200 µl/well, 2h bei RT). Es wurde erneut dreimal ausgewaschen, um im Anschluss die Proben, sowie die Standardreihe (je 50 µl /well) in Doppelbestimmung auf die Platte aufzutragen. Gebundene Primärantikörper können ihre spezifischen Antigene binden und mit diesen Immunkomplexe bilden. Nach Inkubation (4° C, über Nacht) wurden nichtgebundene Antigene durch fünfmaliges Waschen aus den wells entfernt. Der zugegebene biotinylierte sekundäre Antikörper (50µl /well, 2h, RT) detektierte das durch den Primärantikörper immobilisierte Protein (Sandwich-Prinzip). Der Enzymkomplex Streptavidin-peroxidase (1:1000 verdünnt) kann an das Biotin des Sekundärantikörpers binden (50 µl/ well, 20 min, RT). Im Anschluss wurde achtmal gewaschen. Die Enzymaktivität der Streptavidinperoxidase wurde für den eigentlichen Detektionsschritt genutzt. Die Enzymgruppe setzte sein Substrat Wasserstoff in Anwesenheit von BM Blue zu Wasserstoffperoxid um. Dieses ging als Reduktionsmittel mit dem 3,3;5,5-Tetramethylbenzidin (TMB) des BM blue eine Redoxreaktion ein, welche nach etwa 15-30 min mittels 2 M Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt wurde. Durch Protonierung des TMB erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Aus der photometrisch ermittelten Extinktion (Testfilter 450 nm, Referenzfilter 490 nm) wurde anhand der Standardkurve die Konzentration der zu bestimmenden Substanz berechnet.

Immunglobulinbestimmung mittels ELISA

Zusätzliche Materialien zum Zytokin-ELISA:

- Ovalbumin (OVA), Grad VI Sigma, Deisenhofen, D
- Laborinternes Standardserum
  (Pool aus OVA-sensibilisierter Balb/c-Mäuse)

Monoklonale Antikörper gegen Immunglobuline:
Pharmingen, Hamburg, D

Primäre Antikörper:	anti-Maus IgE	(Ratte IgG1)
	anti-Maus IgG_1	(Ratte IgG1)
	anti-Maus IgG_{2a}	(Ratte IgG1)
Sekundäre Antikörper:	anti-Maus IgE-Biotin	konjugiert (Ratte IgG_{2a})
(biotinyliert)	anti-Maus IgG_1- Biotin	konjugiert (Ratte IgG_{2a})
	anti-Maus IgG_{2a} -Biotin	konjugiert (Ratte IgG_{2a})
Standards:	Standard IgE, IgG_1, IgG_{2a}	

Verdünnung der Seren der Ovalbumin exponierter Tiere

anti-Maus IgE	1 : 2 ; 1 : 100
anti-Maus IgG_1	1 : 1000 ; 1 : 10000
anti-Maus IgG_{2a}	1 : 1000 ; 1 : 5000

Die Seren der nicht OVA-exponierten Tiere wurden 1:2 verdünnt.

Detektionslimits:

anti-Maus IgE	3,900 - 1000	LU/ ml
anti-Maus IgG_1	0,031 - 31,25	LU/ ml
anti-Maus IgG_{2a}	1,950 - 500	LU/ ml

Der ELISA wurde wie bei den Zytokinen beschrieben durchgeführt. Im Unterschied zum oben beschriebenen Protokoll gab es für die OVA-spezifischen Ig keinen primären Antikörper. Stattdessen wurden die Platten mit Ovalbumin beschichtet (20 µg/ ml, 50 µl).

Qualitätsparameter der ELISA-Bewertung

- Die Spreizung der Standards der zwei niedrigsten Verdünnungsstufen sollte mindestens der dreifachen Standardabweichung des Leerwertes entsprechen, um den untersten Standard als Nachweisgrenze definieren zu können.
- Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen, der Variationskoeffizient musste unter 15 % liegen.
- In jedem ELISA wurden interne Richtigkeitskontrollen mitgeführt, um die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen ELISA-Platten zu gewährleisten.

2.4.4 Enzyme Linked Immuno Sorbant Spot Assay (ELISpot)

Die ELISpot-Technik dient zur Analyse der Frequenz zytokinproduzierender Zellen in Lymphozytenzellkulturen.

Chemikalien:

- 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) Calbiochem, Bad Soden, D
- AEC-Puffer Calbiochem, Bad Soden, D
- Streptavidin-Peroxidase Calbiochem, Bad Soden, D
- 5-bromo-4-chloro-indoyl-phosphat (BCIP) Calbiochem, Bad Soden, D
- Nitro-Blue-tetrazoliumchloride (NBT) Calbiochem, Bad Soden, D
- Streptavidin alkaline-phsphatase Calbiochem, Bad Soden, D
- Phosphat-buffered-saline (PBS) pH 7:
  8 g Natriumchlorid NaCl Merck Darmstadt, D
  16 g Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 Merck Darmstadt, D
  0,2 g Kaliumchlorid KCl Merck Darmstadt, D
  0,2 g Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 Merck Darmstadt, D
  auf 1l Aqua dest.
- Tris-hydoxyethyl-aminomethan Merck Darmstadt, D

Materialien:

- 96-well Mikrotiterplatten — Nunc, Wiesbaden-Bieberich, D
- Sterilfilter
- Lichtmikroskop — Olympus, Hamburg, D

Monoklonale Antikörper gegen Zytokine:
Pharmingen, Hamburg, D

Primäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	(Ratte IgG_1)
	anti-Maus	IL-5	(Ratte IgG_1)
	anti-Maus	IFN-γ	(Ratte IgG_1)
Sekundäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	(Ratte IgG_{2a})
(biotinyliert)	anti-Maus	IL-5	(Ratte IgG_{2a})
	anti-Maus	IFN-γ	(Ratte IgG_{2a})

verwendete Konzentrationen:

Primäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	5 µg/ ml
	anti-Maus	IL-5	5 µg/ ml
	anti-Maus	IFN-γ	5 µg/ ml
Sekundäre Antikörper:	anti-Maus	IL-4	5 µg/ ml
	anti-Maus	IL-5	5 µg/ ml
	anti-Maus	IFN-γ	5 µg/ ml

Verfahren:

Die 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit 70 % Ethanol (200 µl/ well) befüllt und 10 min inkubiert, um Mikroorganismen abzutöten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ Tween 20 erfolgte das Auftragen des primären Antikörpers (gelöst in Carbonatpuffer, 50 µl/ well). Anschließend wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag der Anteil an nichtgebundenen primären Antikörpern durch dreimaliges Waschen mit PBS/ Tween entfernt. Ungesättigte Bindungen wurden mit 3% BSA in PBS (200µl/ well, 2h bei RT) geblockt. Überschüssiges BSA wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Danach wurde eine aus Mäusemilzen gewonnene Lymphozytensuspension (siehe hierzu 1.6 – 1.9 Material und Methoden) in Kulturmedium zugegeben (500000 und 50000 Zellen in 100µl pro well). Ab diesem Zeitpunkt wurde sichergestellt, dass die Mikrotiterplatte keinerlei Erschütterungen erfuhr. Die Inkubationszeit betrug 24h bei Raumtemperatur und 5% CO_2 Luftanteil. Die in dieser Zeit von den Lymphozyten produzierten Zytokine wurden um die jeweilige Zelle herum durch den primären Antikörper in einem Immunkomplex gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zur Entfernung jeglicher Zellen und Zellbestandteile die Mikrotiterplatte viermal mit PBS/ Tween gewaschen. Nun wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper (50 µl/well) aufgetragen und 2h bei 37° C inkubiert. In dieser Zeit konnte der sekundäre Antikörper an das für diesen spezifische Antigen binden. Nicht gebundene Anteile wurden mit PBS/ Tween herausgewaschen. An das Biotin des sekundären Antikörpers bindet die Streptavidin-peroxidase, die 1:1000 verdünnt (50 µl/well) zugegeben wurde und für 1,5 h bei 37° C inkubierte. Im Anschluss wurde achtmal mit PBS gewaschen. Das Substrat der Streptavidin-peroxidase ist 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC). Dieses wurde in AEC-Puffer gelöst und durch einen Sterilfilter der Porengröße 300µm gegeben. Dabei wurde die trübbraune Flüssigkeit klar. Die so hergestellte Substratlösung wurde nun auf die Platte aufgetragen (100µl /well) und etwa 30 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Platte von jeglichen Erschütterungen freigehalten. Das Produkt der Streptavidin-Peroxidase führte zur Umwandlung des AEC mit Änderung des Löslichkeitsproduktes, was zum Ausfallen eines roten Farbstoffes führte. Da nur dort Farbstoff ausfiel, wo der Antigen-

Antikörper-Enzym-Komplex sich befand, bildeten sich mikroskopisch sichtbare Punkte. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 90 µl des Flüssigkeitsvolumens vorsichtig abgesaugt und 150 µl Aqua dest zugegeben. Die Auszählung der durch den Farbstoff gebildeten Punkte (spots) erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

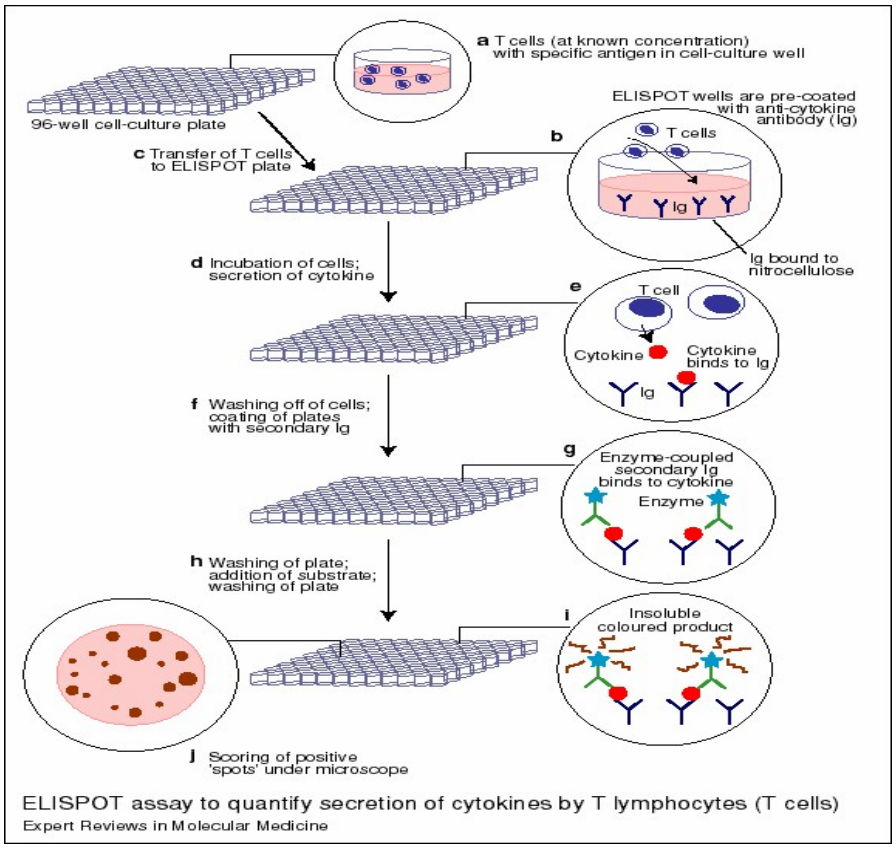


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des ELISpot-Verfahrens

*Zunächst Inkubation der T-Zellen mit Nährlösung **(a)**, gleichzeitig Benetzen der einzelnen Platten anti-Zytokin-Antikörpern.**(b)**. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die T-Zellen in die Kammern der Platten übertragen. Es erfolgt im weiteren die Inkubation, in der T-Zellen Zytokine sezernieren, die an spezifische Zytokin-Antikörper binden **(d und e)**. Im Anschluss werden die Zellen durch Waschen aus den Kammern entfernt und enzymmarkierte sekundäre Antikörper hinzugefügt **(f und g)**.*

Nach Inkubation und Entfernung der nicht gebundenen Antikörper wird die Markierungslösung in die Kammern gefüllt. Der Farbstoff fällt nur dort aus, wo Enzyme gebunden sind- also an den Orten wo vorher eine Zytokinsekretion stattgefunden hat.

Eine Variante dieses Verfahrens benutzt Streptavidin alkalische Phosphatase als Enzym und 5-bromo-4-chloro-indoyl-phosphat (BCIP)/ Nitro-Blue-tetrazoliumchloride (NBT) als Substrat. Die entstehenden spots sind hierbei braun. Wichtig war bei Anwendung dieser Variante, dass nach Zugabe des sekundären Antikörpers als Waschlösung nicht PBS, sondern Tris-buffered-saline (TBS) verwendet wurde. Das Phosphat des PBS ist ein starker Inhibitor der alkalischen Phosphatase.

Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten den ELISpot in Bezug auf die Lymphozytenkultur durchzuführen: Bei dem direkten ELISpot erfolgt direkt nach Präparation der Zellen das Auftragen auf die Mikrotiterplatte. Der indirekte ELISpot lässt die Zellen zunächst einen Tag in Kulturmedium vorinkubieren, bis der Auftrag auf die Mikrotiterplatte stattfindet. In dieser Arbeit wurde durchweg der indirekte ELISpot durchgeführt. Ein Schema als Überblick zur Durchführung findet sich unten (Abb.2.2)

2.4.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem T- Test.

III. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Muttertiere

Das Ziel dieser Arbeit war es, die maternalen Einflüsse auf die Entwicklung des fetalen Immunsystems gegen Allergene in der prä- und postnatalen Periode zu untersuchen. Um genetische und umweltbedingte Einflüsse voneinander trennen zu können, wurde die Verpaarung SJL x Balb/c gewählt. Mäuse des Stammes SJL sind bekannt als low-responder, Mäuse des Stammes Balb/c als high-responder. Der allergische Phänotyp der väterlichen Balb/c-Maus bringt die genetische Kompetenz in die Verpaarung SJL x Balb/c. Die Allergenexposition der mütterlichen SJL-Maus während der Gestationsperiode steht für umweltbedingte Einflüsse.

Weibliche SJL-Mäuse wurden gegenüber Ovalbumin (OVA) exponiert. Nach Verpaarung mit nicht-immunisierten Balb/c- Männchen wurden die Weibchen während der Tragezeit einem OVA-Aerosol ausgesetzt. Zum Vergleich der allergischen Sensibilisierbarkeit der SJL-Muttertiere mit Balb/c-Muttertieren dienten Vorexperimente.

3.1.1 Expression der $V_\beta 8$ und $V_\beta 6$ T-Zell-Rezeptor-Ketten in SJL-, Balb/c- und (SJL x Balb/c)F_1-Mäusen

Die allergische Sensibilisierung von Mäusen wird von der Zusammensetzung des T-Zell-Rezeptors (TZR) beeinflusst. Die Höhe der allergischen Sensibilisierung ist unter anderem vom Typ der vorhandenen TZR-Ketten abhängig. Insbesondere die Expression der TZR-Kette $V_\beta 8$ in Balb/c-Mäusen ist mit einer gesteigerten Sensibilisierbarkeit gegen OVA korreliert. Demgegenüber steht die TZR-Kette $V_\beta 6$, bei der bisher keine Assoziation zur allergischen Sensibilisierung gefunden wurde. Zur Charakterisierung der Mausstämme als „high-“ und „low-responder“ wurde die Expression der T-Zell-Rezeptorkette $V_\beta 8$ analysiert. $V_\beta 6$ diente als Kontrolle (Abb. 3.1).

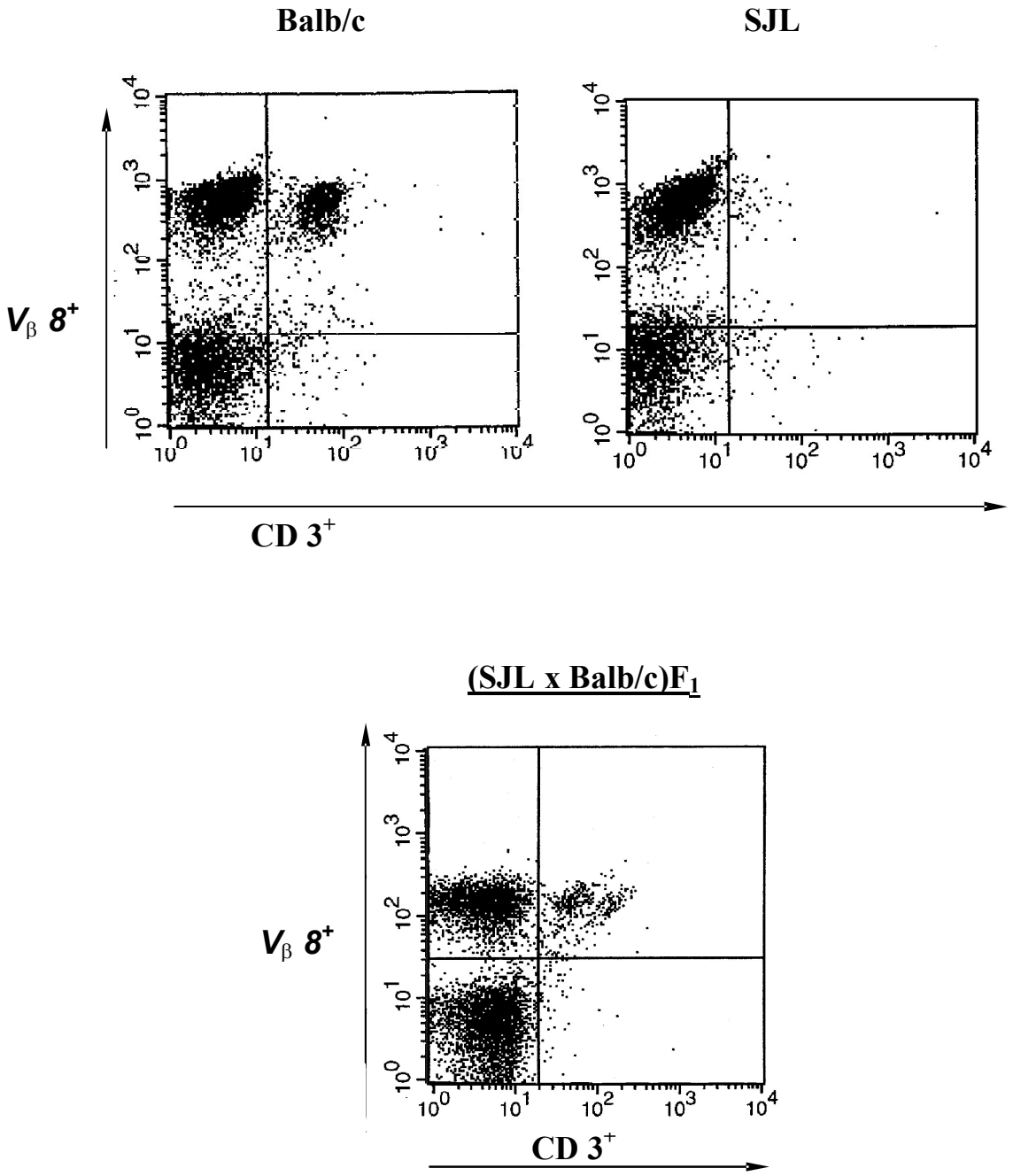


Abbildung 3.1:

Expression der Kette V_β8 in SJL- und Balb/c-Mäusen

Mononukleäre Zellen der Milz wurden mit Antikörpern gegen CD 3 und V_β8 markiert und mittels FACS-Gerät analysiert. Dargestellt ist die Frequenz V_β8-exprimierender CD 3$^+$ Zellen in den Mausstämmen SJL, Balb/c und (SJL x Balb/c)F_1.

Entscheidende Idee in dem Versuchsansatz war, dass die genetische Kompetenz durch die Männchen in die Kreuzung eingebracht wurde. Dieses galt es nachzuweisen. Es stellte sich die Frage, welcher TZR-Typ in den Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 exprimiert wird Die Analyse wurde mit mononukleären Zellen der Milz im Durchflusszytometer durchgeführt.

Eine Expression der TZR-Kette $V_\beta 8$ konnte in SJL-Mäusen nicht nachgewiesen werden. Demgegenüber steht eine Expression der TZR-Kette $V_\beta 8$ auf ca. 20% aller $CD3^+$-Zellen in Balb/c-Mäusen. Im Auftreten der TZR-Kette Vβ6 zeigten SJL- und Balb/c -Mäuse keinen Unterschied (Abb. 3.2). Der Phänotyp von SJL-Mäusen zeigt sich somit in einer nicht vorhandenen $V_\beta 8$-Expression und entspricht einem „low-responder“. Im Gegensatz dazu ist der Phänotyp einer Balb/c-Maus durch eine starke Expression von $V_\beta 8$-Ketten gekennzeichnet. Als Kontrolle diente die Expression der Kette $V_\beta 6$, in der sich die Stämme gleichen.

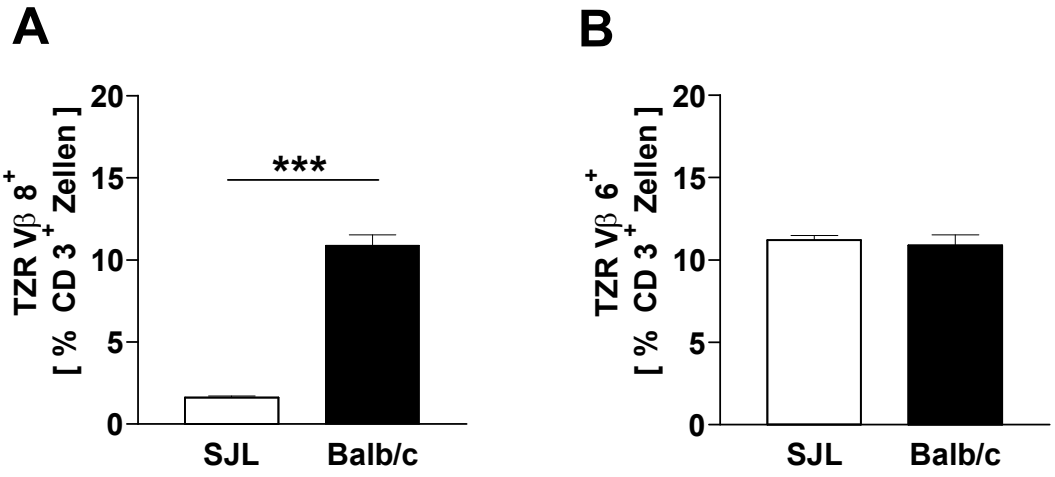


Abbildung 3.2:
Expression der TZR-Ketten $V_\beta 8$ und $V_\beta 6$ in SJL- und Balb/c-Mäusen

Mononukleäre Zellen aus der Milz wurden mit Antikörpern gegen CD 3, $V_\beta 8$ ***(A)****, und $V_\beta 6$* ***(B)*** *markiert und mittels FACS-Gerät analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil $V_\beta 8^+$ bzw. $V_\beta 6^+$ Zellen an allen CD 3^+ Zellen in SJL- und Balb/c-Mäusen. *** signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit t-test ($p < 0.05$). SJL: n = 6; Balb/c: n = 9 Tiere.*

In den Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 ließ sich in allen Versuchsgruppen eine Expression der TZR-Ketten $V_\beta 8$ und $V_\beta 6$ nachweisen (Abb. 3.3).

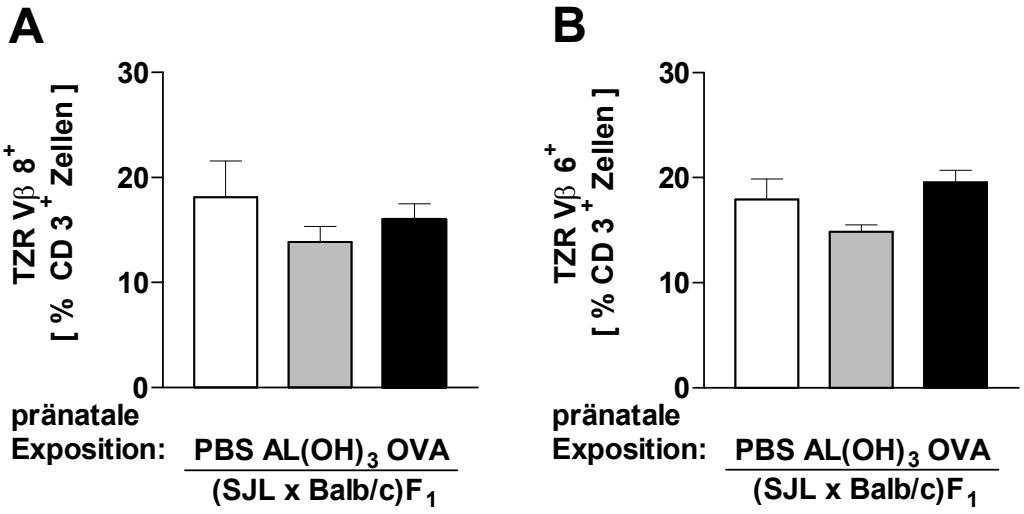


Abbildung 3.3:

Expression der T-Zell-Rezeptor-Ketten $V_\beta 8$ und $V_\beta 6$ in (SJL x Balb/c)F_1

Mononukleäre Zellen aus der Milz wurden mit Antikörpern gegen CD 3, $V_\beta 8$ (A), und $V_\beta 6$ ***(B)*** *markiert und mittels FACS-Gerät analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil $V_\beta 8^+$ bzw. $V\beta\ 6^+$ positiver Zellen an allen CD 3^+ Zellen in (SJL x Balb/c)F_1 getrennt nach pränataler Exposition. PBS: n = 7; $Al(OH)_3$: n = 9; OVA: n = 9 Tiere.*

Diese Daten zeigen, dass

- **der Phänotyp der Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 durch eine mit Balb/c-Tieren vergleichbare Vβ8-Expression gekennzeichnet und als „high-responder“ zu beschreiben ist. Die Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 exprimieren somit den Phänotyp des Balb/c-Vatertieres.**

3.1.2 Charakterisierung der humoralen Immunantwort nach Allergenexposition in SJL-Mäusen

Zunächst wurde die Immunmodulation in SJL-Mäusen nach Exposition gegenüber dem Modellallergen OVA analysiert. Eine weitere Frage war, welchen Einfluss das Adjuvans $Al(OH)_3$ alleine auf die Immunlage der Mäuse hat.

Als globaler systemischer Parameter wurde der Gesamt-IgE-Spiegel im Serum der Tiere bestimmt. Die Produktion der Immunglobuline anti-OVA IgE, -IgG_1 und -IgG_{2a} diente als Parameter einer spezifischen Immunantwort und wurde ebenfalls im Serum der Tiere bestimmt. Die Analysen fanden am Tag 1 und am Tag 41 statt und wurden mittels ELISA-Technik durchgeführt.

Bestimmung von Gesamt-IgE in SJL-Muttertieren

Am Tag 1 waren keine Unterschiede der Gesamt-IgE-Spiegel zwischen den drei Gruppen detektierbar. Am Tag 41 zeigten die Tiere der Gruppen PBS und $Al(OH)_3$ keine signifikanten Erhöhungen des Gesamt-IgE. Daher ist bei SJL-Mäusen ein Effekt der Schwangerschaft auf die Gesamt-IgE-Produktion zu verneinen. Im Gegensatz hierzu war bei den mit OVA sensibilisierten Tieren am Tag 41 eine Produktion von Gesamt-IgE vorhanden und im Vergleich zu den Versuchsgruppen PBS und $Al(OH)_3$ signifikant höher($p \leq 0,05$) (Abb.3.4).

Die Erhöhung des Gesamt-IgE-Titers in Tieren der OVA-Gruppe weist auf eine globale Aktivierung des Immunsystems hin. Ein Fehlen eines Unterschiedes in der Gesamt-IgE-Produktion zwischen der Gruppe PBS und $Al(OH)_3$ zeigt, dass die $Al(OH)_3$-Applikation per se keinen Effekt auf die Produktion von Gesamt-IgE hat.

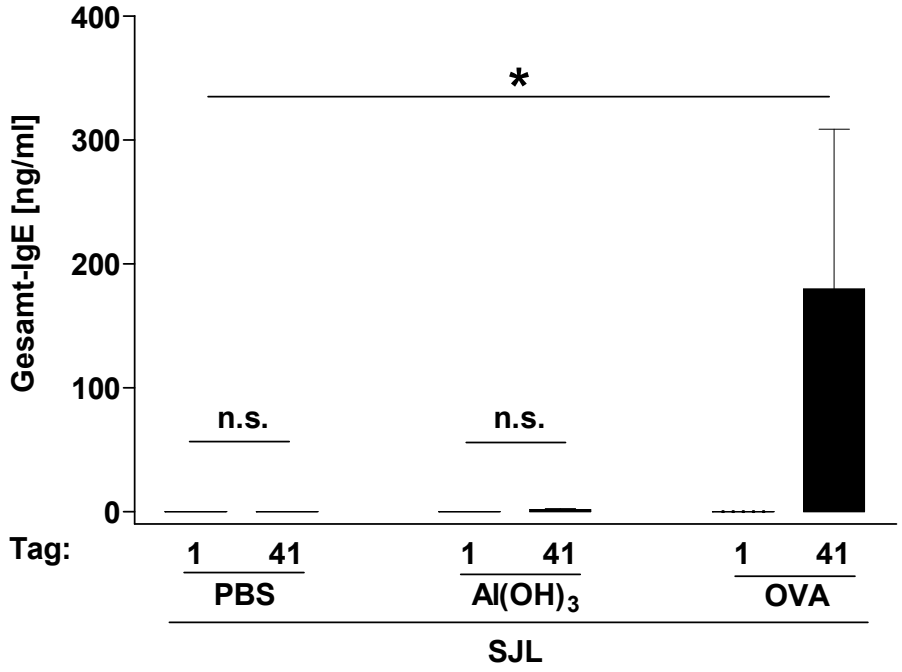


Abbildung 3.4:

Gesamt-IgE Produktion in SJL-Mäusen vor und nach Exposition

*Durch Injektion i.p. von 10µg OVA + 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS an den Tagen 1, 14 und 21 wurden SJL-Weibchen gegen OVA exponiert.. Kontrollen ($Al(OH)_3$ und PBS) wurde parallel 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS oder nur PBS allein injiziert. Nach Verpaarung mit Balb/c-Männchen jeden zweiten Tag während der Schwangerschaft Aerosol-Exposition (OVA-Versuchsgruppe: OVA; Kontrollen: PBS). Serum wurde am Tag 1 und Tag 41 gewonnen und mittels ELISA-Technik auf den Gesamt-IgE-Titer analysiert. * signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen OVA, $Al(OH)_3$ und PBS ($p < 0.05$). PBS; $Al(OH)_3$; OVA: n = 4 Tiere. n.s. = nicht signifikant*

Bestimmung der spezifischen Immunantwort in gegenüber OVA exponierten SJL-Muttertieren

Am Tag 1 wiesen die SJL-Muttertiere keine Unterschiede in den Titern der allergenspezifischen Immunglobuline anti-OVA-IgE, -IgG_1 und -IgG_{2a} auf.
Am Tag 41 waren im Serum der nicht sensibilisierten (PBS) und der mit $Al(OH)_3$ behandelten Muttertiere ebenfalls keine dieser Immunglobuline

nachweisbar. Demgegenüber wurde im Serum der mit OVA behandelten Muttertiere eine Erhöhung der Immunglobuline anti-OVA-IgG_1 und - IgG_{2a} am Tag 41 festgestellt (Abb. 3.5). OVA-spezifische IgE Antikörper waren nicht nachweisbar.

Die Erhöhung der mit der allergischen Reaktion gekoppelten allergenspezifischen Immunglobuline anti-OVA-IgG_1 und -IgG_{2a} zeigte eine Aktivierung der mit OVA behandelten SJL-Muttertiere. Allerdings war eine Produktion von allergenspezifischem IgE nicht nachweisbar. Zusammen mit den erhöhten Spiegeln von Gesamt-IgE zeigte sich eine allergische Sensibilisierung der SJL-Muttertiere

Diese Daten zeigen, dass

- **die SJL-Muttertiere nach der Exposition gegenüber Ovalbumin nicht allergisch sensibilisiert sind, da keine ovalbumin-spezifischen Antikörper gebildet wurden.**

- **das Adjuvans $Al(OH)_3$ alleine keine Veränderung der Immunlage hervorruft.**

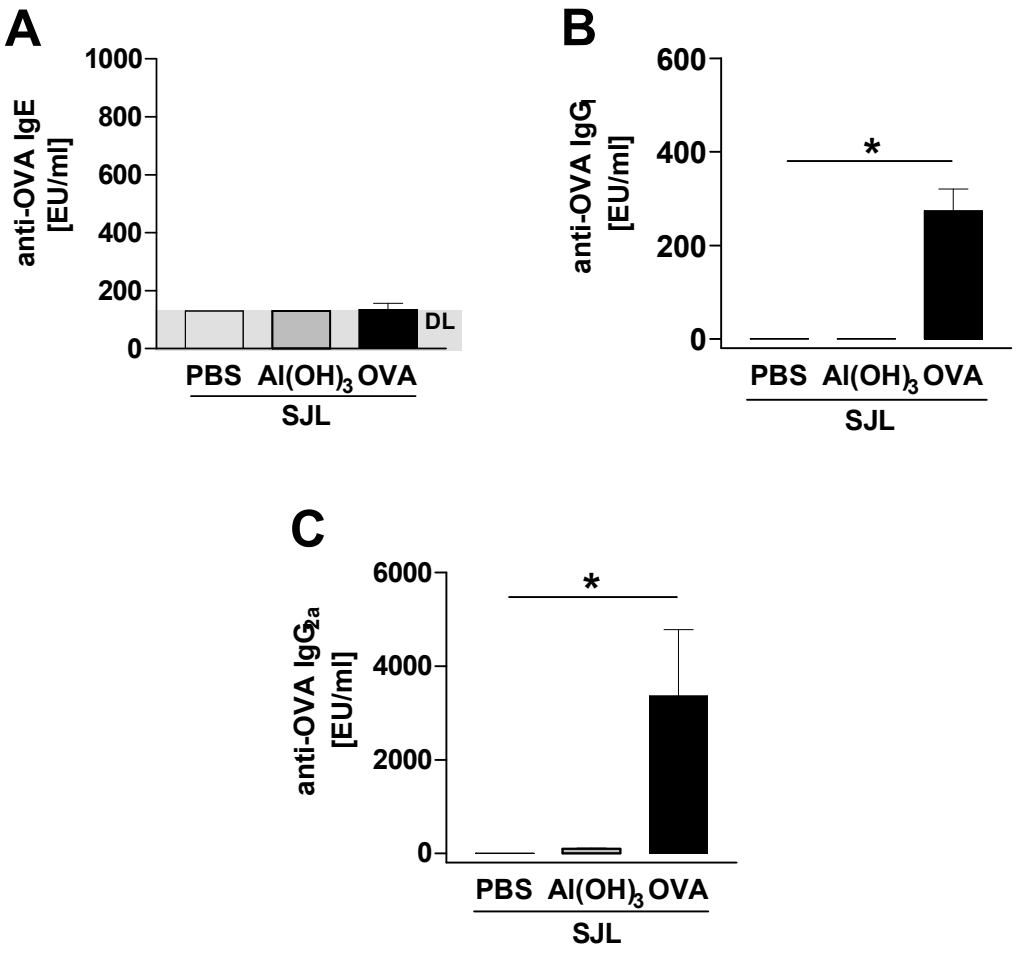


Abbildung 3.5:
Immunglobulin -Titer in SJL -Weibchen nach OVA-Exposition.

*Durch Injektion i.p. von 10µg OVA + 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS an den Tagen 1, 14 und 21 wurden SJL-Weibchen gegen OVA exponiert. Kontrollen ($Al(OH)_3$ und PBS) wurde parallel 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS oder nur PBS allein injiziert. Nach Verpaarung mit Balb/c jeden zweiten Tag während der Schwangerschaft Aerosol-Exposition (OVA-Versuchsgruppe: OVA; Kontrollen: PBS). Serum wurde am Tag 1 post partum gewonnen und mittels ELISA-Technik auf anti-OVA IgE **(A)**, anti-OVA IgG1 **(B)** und anti-OVA IgG2a **(C)** analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppe OVA und Kontrollgruppen PBS bzw. $Al(OH)_3$ in B und C (* $p < 0.05$). PBS; $Al(OH)_3$; OVA: n = 4 Tiere. DL = Detektionslimit.*

3.1.3 Charakterisierung der humoralen Immunantwort nach Allergenexposition in Balb/c-Mäusen

Um die Sensibilisierung von SJL-Mäusen beurteilen zu können, wurde die Sensibilisierung von Balb/c-Mäusen, die als „high-responder“ gelten, zum Vergleich herangezogen. Genau wie bei den SJL-Muttertieren erfolgte die Serumgewinnung am Tag 1 und 41. Im Serum wurden mit ELISA-Technik die Spiegel des unspezifischen Parameters Gesamt-IgE und die Spiegel der allergenspezifischen Immunglobuline anti-OVA-IgE, -IgG_1 und- IgG_{2a} bestimmt.

Am Tag 1 waren keine Unterschiede zwischen der Versuchsgruppe OVA und der Kontrollgruppe PBS hinsichtlich der Gesamt-IgE und Immunglobulin-Produktion festzustellen. Die mit PBS behandelten Balb/c- Weibchen zeigten eine signifikante Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels nach Schwangerschaft am Tag 41. Nach OVA-Sensibilisierung wurden am Tag 41 in Balb/c-Muttertieren ca. 20-fach höhere Gesamt-IgE-Spiegel gemessen als am Tag 1 (Abb. 3.6).

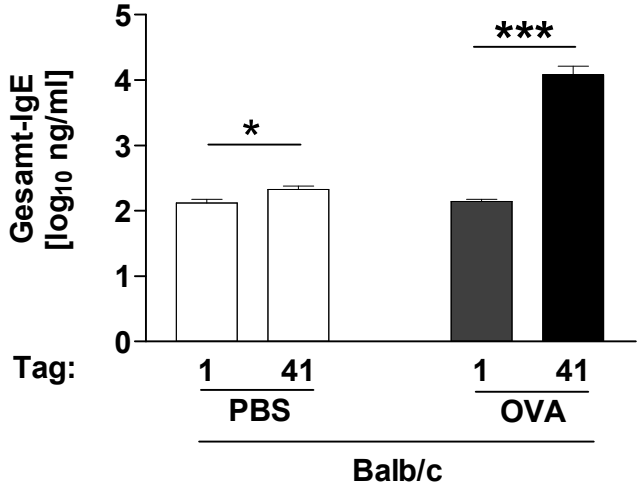


Abbildung 3.6:
Produktion von Gesamt-IgE in Balb/c-Mäusen vor und nach Exposition

Durch OVA-Injektion i.p. an den Tagen 1, 14 und 21 wurden Balb/c-Weibchen gegen OVA sensibilisiert. Kontrollen (PBS) wurde parallel nur PBS injiziert. Nach Verpaarung mit Balb/c jeden zweiten Tag während der Schwangerschaft

*Aerosol-Exposition (OVA-Versuchsgruppe: OVA; Kontrolle: PBS). Serum wurde am Tag 1 und am Tag 41 gewonnen und mittels ELISA-Technik auf den Gesamt-IgE-Titer analysiert. * signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen OVA und PBS ($p < 0.05$). PBS: n = 15; OVA: n = 10 Tiere.*

In der mit PBS behandelten Gruppe war keine Produktion von anti-OVA-IgE,- IgG_1 und - IgG_{2a} nachweisbar. Demgegenüber steht eine signifikant erhöhte Produktion dieser Immunglobuline in der mit OVA behandelten Gruppe (Abb. 3.7).

Diese Daten zeigen, dass Balb/c-Mäuse eine starke allergische Sensibilisierung gegen Ovalbumin nach Ovalbumin-Exposition aufweisen.

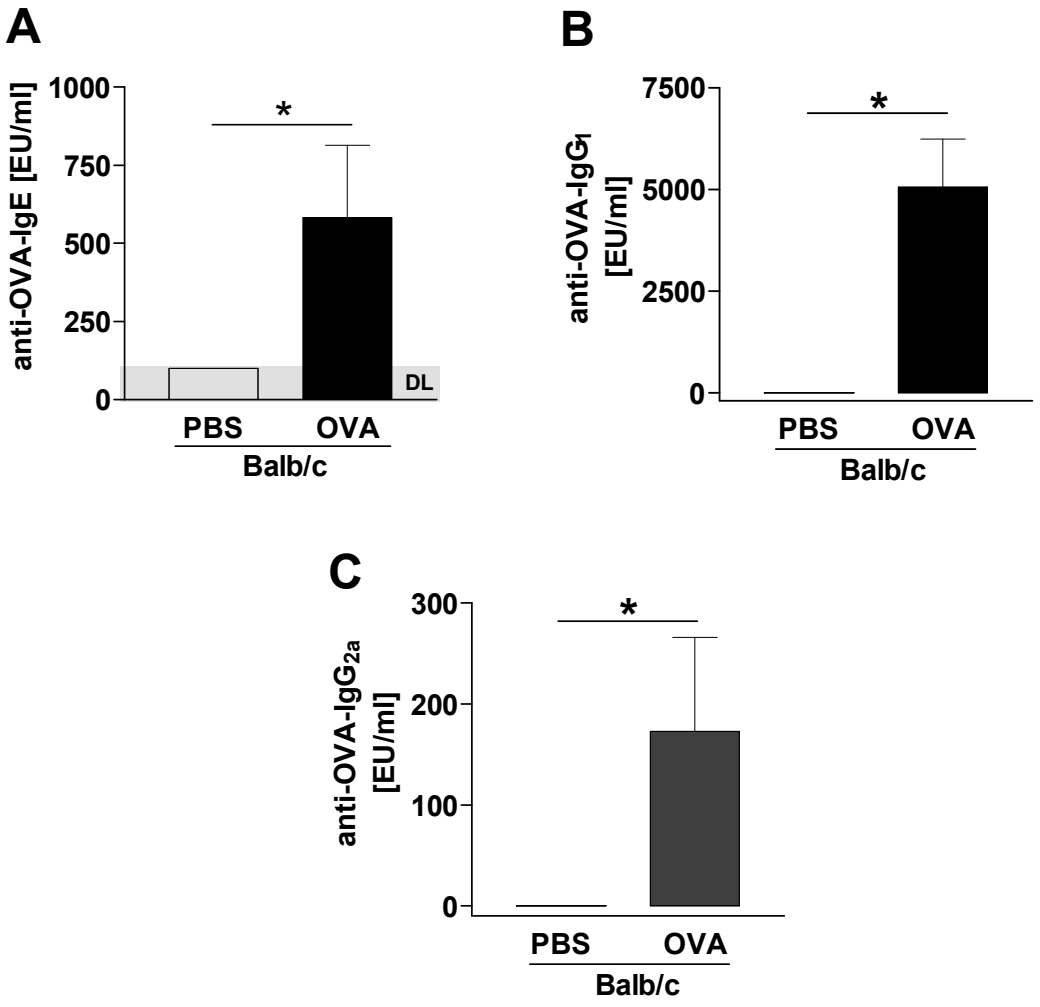


Abbildung 3.7:
Immunglobulin-Titer in Balb/c -Weibchen nach Exposition mit OVA

Durch Injektion i.p. von 10µg OVA + 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS an den Tagen 1, 14 und 21 wurden Balb/c-Weibchen gegen OVA sensibilisiert. Als Kontrolle (PBS) wurde parallel PBS injiziert. Nach Verpaarung mit Balb/c-Männchen jeden zweiten Tag während der Schwangerschaft Aerosol-Exposition (OVA-Versuchsgruppe: OVA; Kontrolle: PBS). Serum wurde am Tag 41 post partum gewonnen und mittels ELISA-Technik auf anti-OVA-IgE ***(A)****, -IgG_1* ***(B)*** *und –IgG_{2a}* ***(C)*** *analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppe OVA und Kontrollgruppe PBS (* $p < 0.05$). PBS: n = 15; OVA: n = 10 Tiere.*

3.1.4 Vergleich der allergischen Sensibilisierbarkeit von SJL- und Balb/c-Mäusen

Um eine Aussage über Immunantworten tätigen zu können, muss der genetische Hintergrund betrachtet werden. In diesem Abschnitt soll die unterschiedliche Potenz zu einer Immunantwort in den Mausstämmen SJL und Balb/c verglichen werden. In den vorangegangenen Abschnitten 1.2 und 1.3 wurden Immunantworten in SJL- und Balb/c-Mäusen zunächst zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe einander gegenübergestellt. Nun werden die SJL- und Balb/c-Weibchen der Behandlungsgruppe (OVA) direkt miteinander verglichen.

Vergleich der Gesamt-IgE-Produktion

Am Tag 1 der Sensibilisierung mit OVA war in SJL-Mäusen kein Gesamt-IgE detektierbar. Im Gegensatz dazu wiesen Balb/c-Mäuse schon zu diesem Zeitpunkt einen Gesamt-IgE-Titer von im Mittel 220 ng/ml auf (Abb. 8). Dies ist auf den genetischen Hintergrund der Balb/c-Mäuse zurückzuführen und charakterisiert diese als „high-responder“. Nach abgeschlossener Sensibilisierung am Tag 41 wurde im Serum der SJL-Mäuse ein Gesamt-IgE-Titer von im Mittel 200 ng/ml gefunden. Dies entsprach ungefähr der Höhe des Ausgangswertes der in Balb/c-Mäusen. Dagegen war der Gesamt-IgE Titer der Balb/c-Mäuse auf über 4000 ng/ml angestiegen (Abb. 3.8).

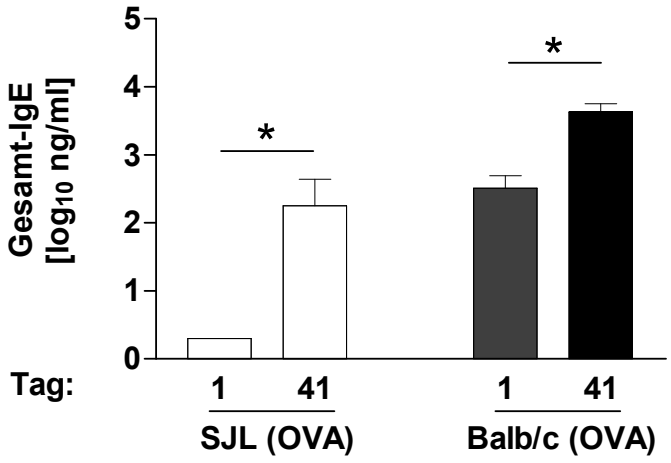


Abbildung 3.8:
Produktion von Gesamt-IgE in SJL- und Balb/c-Mäusen vor und nach Exposition

Durch Injektion i.p. von 10µg OVA + 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS an den Tagen 1, 14 und 21 wurden SJL- und Balb/c-Weibchen gegen OVA sensibilisiert. Nach Verpaarung mit Balb/c-Männchen jeden zweiten Tag während der Schwangerschaft Aerosol-Exposition. Am Tag 1 wie auch am Tag 41 wurde von SJL- und Balb/c-Mäusen Serum gewonnen und mittels ELISA-Technik auf Gesamt-IgE untersucht.

** Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe SJL und Balb/c ($p < 0.05$).*
SJL; Balb/c: n = 12

Vergleich der Produktion allergenspezifischer Immunglobuline

Vor Beginn der Exposition zeigte sich in SJL- und Balb/c- Mäusen keine Produktion von immunspezifischen Antikörpern. Nach Abschluss der Exposition gegenüber Ovalbumin zeigten sich folgende Unterschiede in der Immunglobulinproduktion zwischen SJL- und Balb/c-Mäusen:

In SJL-Tieren war keine anti-OVA-IgE Produktion nachweisbar, wohingegen Balb/c-Mäuse eine deutliche anti-OVA-IgE-Produktion hatten. Das mit einer T_H2-Reaktion gekoppelte Immunglobulin anti-OVA-IgG_1 wurde in SJL-Mäusen nur in einer 30-fach geringeren Konzentration als in Balb/c-Tieren produziert. Demgegenüber fand sich eine 15-fach höhere anti-OVA-IgG_{2a}-Konzentration in SJL-Mäusen (Abb.3.9). Anti-OVA-IgG_{2a} steht in Korrelation mit einer T_H1-Reaktion.

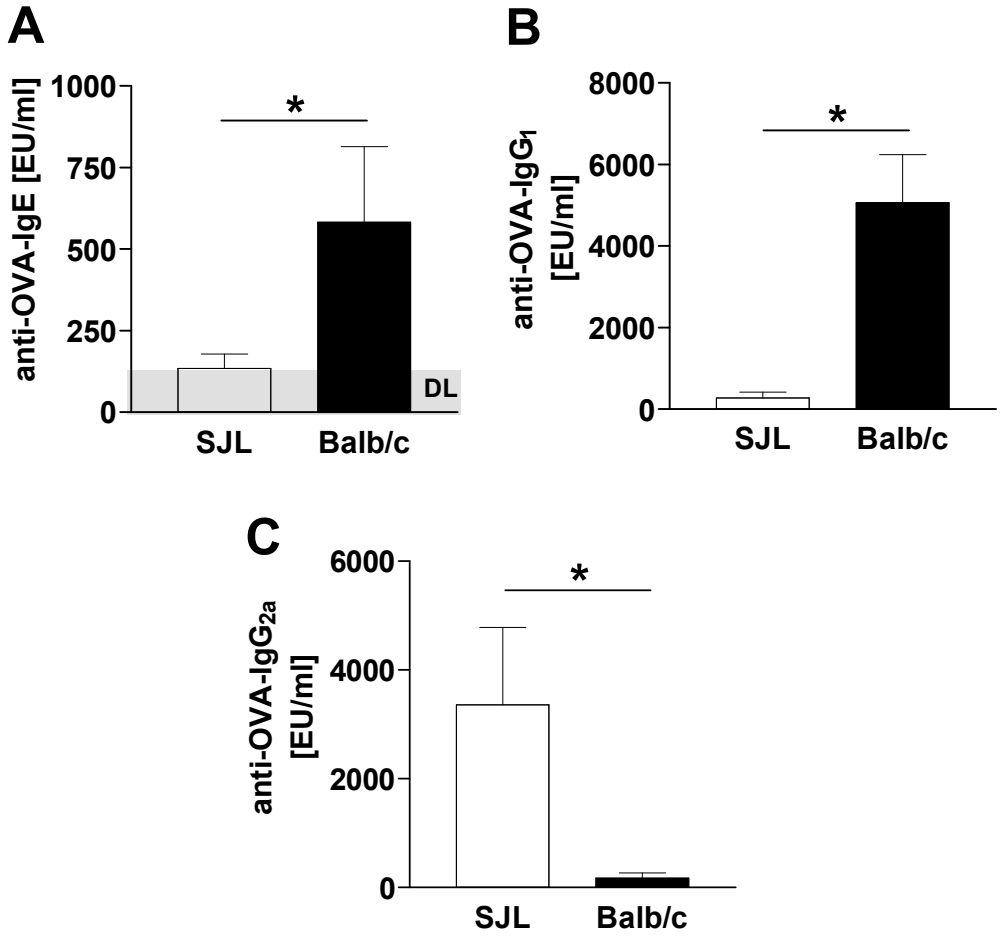


Abbildung 3.9:
Immunglobulin -Titer in SJL- und Balb/c -Weibchen nach Exposition

Durch Injektion i.p. von 10µg OVA + 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS an den Tagen 1, 14 und 21 wurden SJL-Weibchen gegen OVA sensibilisiert. Kontrollen ($Al(OH)_3$ und PBS) wurde parallel 1.5 mg $Al(OH)_3$ in PBS oder nur PBS allein injiziert. Nach Verpaarung mit Balb/c jeden zweiten Tag während der Schwangerschaft Aerosol-Exposition (OVA-Versuchsgruppe: OVA; Kontrollen: PBS). Serum wurde am Tag 1 post partum gewonnen und mittels ELISA-Technik auf anti-OVA IgE ***(A)****, anti-OVA IgG1* ***(B)*** *und anti-OVA IgG2a* ***(C)*** *analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppe OVA und Kontrollgruppen PBS bzw. $Al(OH)_3$ in B und C (* $p < 0.05$). PBS; $Al(OH)_3$; OVA: n = 4 Tiere. DL = Detektionslimit.*

Diese Daten zeigen, dass

- **mit dem gleichen Protokoll in SJL-Mäusen im Gegensatz zu Balb/c-Mäusen keine allergische Sensibilisierung hervorgerufen werden konnte.**
- **SJL-Mäuse nach dem gleichen Protokoll zur T_H1-gewichtete Immunantwort neigen, während Balb/c-Mäuse eine deutliche T_H2-Immunantwort ausbilden.**

Diese Ergebnisse sind die Basis, um den Einfluss der maternalen Sensibilisierung und des genetischen Hintergrundes in den Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 beurteilen zu können.

3.2 Charakterisierung der Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1

Um die Auswirkungen einer Allergenexposition auf nichtkompetente SJL-Muttertiere nach Verpaarung mit immunkompetenten Balb/c-Männchen zu testen, wurden die Jungtiere am Tag 1 und 28 post partum analysiert. Am Tag 28 erhielten die Jungtiere zusätzlich eine intraperitoneale Injektion mit einem zu OVA heterologen Antigen (β-Lactoglobulin). In der Folgezeit wurden wöchentlich die Immunglobulinspiegel analysiert.

3.2.1 Maternaler Transfer von allergenspezifischen Immunglobulinen

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob und in welcher Höhe das mit der allergischen Reaktion gekoppelte Immunglobulin anti-OVA-IgG_1 vom maternalen auf den fetalen Organismus übertragen wird. Dazu wurde das Serum der Mutter- und Jungtiere am Tag post partum analysiert.

In Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 der Gruppen PBS und $Al(OH)_3$ war anti-OVA-IgG_1 nicht nachweisbar. In Nachkommen der mit OVA sensibilisierten Muttertiere war anti-OVA-IgG_1 vorhanden. (Abb. 3.10) Dabei betrug die Höhe des anti-OVA-IgG_1 im Serum der Nachkommen ca. 30% des maternalen anti-OVA-IgG_1. Dies zeigt den Transfer dieses allergenspezifischen Immunglobulins.

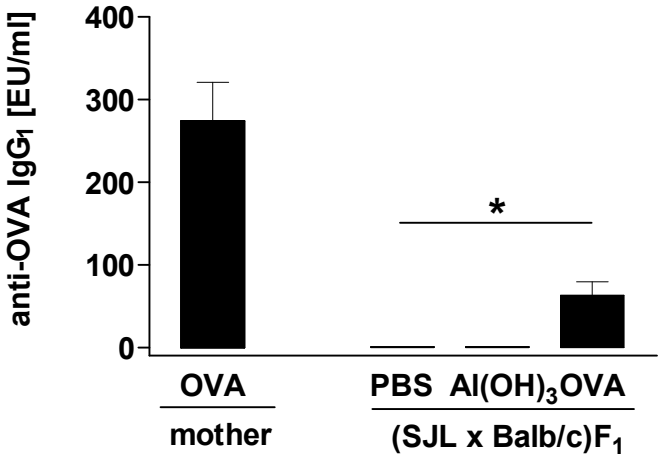


Abbildung 3.10:
Anti-OVA-IgG_1 Produktion in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 1 p.p.

*SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA sensibilisiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder $Al(OH)_3$. Verpaarung mit Balb/c-Männchen.Von den Jungtieren wurde am Tag 1 post partum Serum gewonnen und mittels ELISA-Technik analysiert. Die Seren dreier Tiere wurde jeweils gepoolt. Dargestellt ist der anti-OVA-IgG_1-Titer in sensibilisierten SJL-Muttertieren und in (SJL x Balb/c)F_1 getrennt nach Exposition der Mutter. *** Signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe OVA und den Kontrollen PBS bzw. $Al(OH)_3$ ($p < 0.05$). (SJL x Balb/c)F_1: PBS: $n = 5$; $Al(OH)_3$: $n = 4$; OVA: $n = 5$; Muttertiere: $n = 4$*

3.2.2 Einfluss der pränatalen Allergenexposition auf die Gesamt-IgE Produktion in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 1 p.p.

Um Aufschluss über die globale Aktivierung des fetalen Immunsystems zu bekommen, wurde das Serum der Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1 auf nicht plazentagängiges Gesamt-IgE analysiert. Es wurde jeweils ein Wurf pro Gruppe am Tag 1 p.p. zur Analyse herangezogen. Nach Poolen der Seren dreier Jungtiere wurde anschließend mit ELISA-Technik gemessen.

In Jungtieren der nicht exponierten Muttertiere (PBS und $Al(OH)_3$) war kein Gesamt-IgE nachweisbar. Die Gabe von $Al(OH)_3$ an die Muttertiere zeigte keinen Einfluss auf die Gesamt-IgE Titer der Jungtiere. Im Gegensatz hierzu waren die Gesamt-IgE Titer in den Nachkommen der mit OVA exponierten Muttertiere erhöht (Abb. 3.11). Der erhöhte Gesamt-IgE-Titer als globaler Parameter für eine immunologische Aktivität ist folglich auf die Exposition des Muttertieres zurückzuführen.

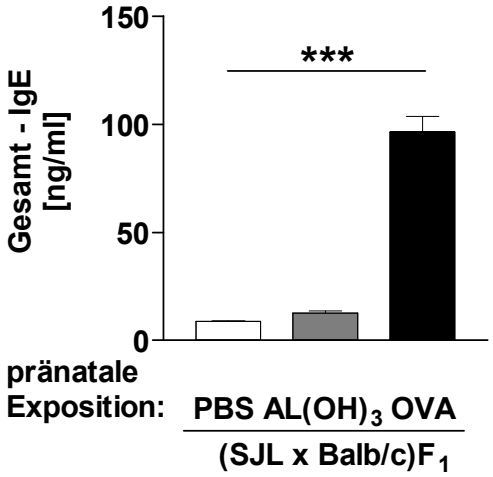


Abbildung 3.11:
Gesamt-IgE Produktion in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 1 post partum

*SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA sensibilisiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder $Al(OH)_3$. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Von den Jungtieren wurde am Tag 1 post partum Serum gewonnen und mittels ELISA-Technik analysiert. Die Seren dreier Tiere wurde jeweils gepoolt. Dargestellt ist der Gesamt-IgE-Titer in (SJL x Balb/c)F_1 getrennt nach Exposition der Mutter. *** Signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe OVA und den Kontrollen PBS bzw. $Al(OH)_3$ ($p < 0.05$). PBS: $n = 5$; $Al(OH)_3$: $n = 4$; OVA: $n = 5$.*

3.2.3 Charakterisierung der Immundeviation in Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 1 post partum

Zur weiteren Analyse der Effekte der mütterlichen Exposition wurden der T-Zell Phänotyp in den Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 anhand des Zytokinprofils charakterisiert. Es wurden die Zytokine IL-4 und IFN-γ untersucht, die als Hauptzytokine einer T_H1-Immunantwort (IFN-γ), bzw. T_H2-Immunantwort (IL-4) gelten. Das Zytokinprofil wurde mit zwei voneinander unabhängigen Methoden untersucht: zum einen die Quantität der Zytokine in Zellkulturen, zum anderen die Frequenz der zytokinproduzierenden Zellen mittels ELISpot-Technik.

3.2.3.1 Quantitative Analyse des Zytokinprofils mit Zellkultur-Technik

Mononukleäre Zellen der Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 wurden am Tag 1 post partum stimuliert und mittels ELISA auf die Zytokine IFN-γ und IL-4 untersucht.

Die Nachkommen der exponierten Tiere (OVA) zeigten im Vergleich zu den Nachkommen der nicht exponierten Tiere (PBS) eine signifikant geringe Ausschüttung von IFN-γ (Abb. 3.12). Es besteht damit ein IFN-γ Defizit in den Nachkommen der mit OVA behandelten Muttertiere. Die IL-4 Produktion zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Jungtieren der beiden Versuchsgruppen.

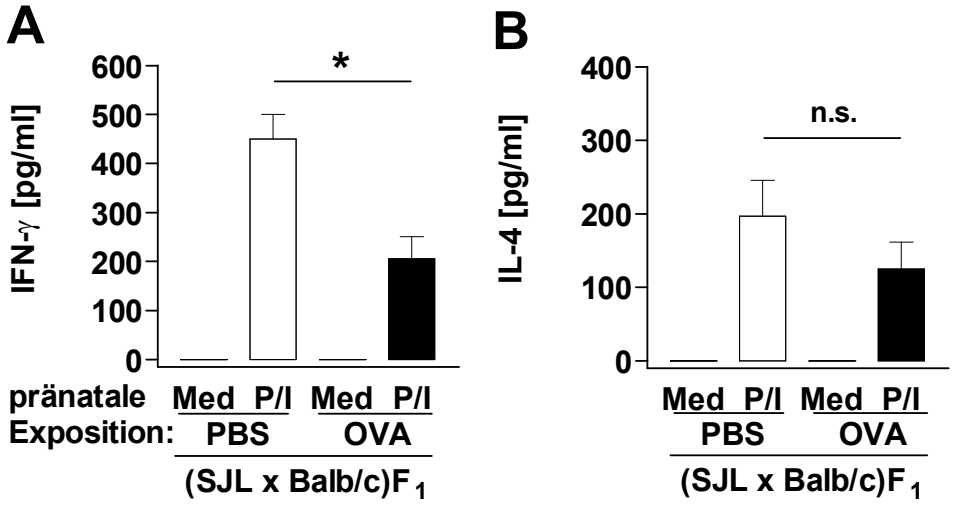


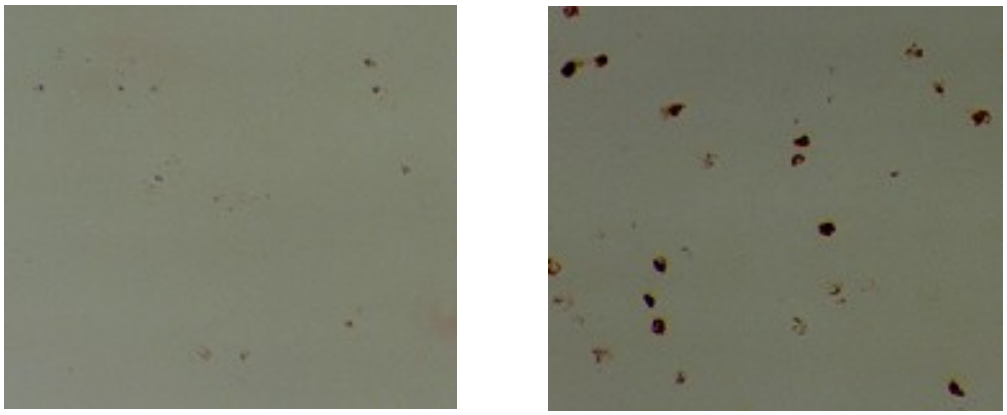
Abbildung 3.12:

Zytokinproduktion in (SJL x Balb/c)F_1 nach mitogener Stimulation am Tag 1 post partum

SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA sensibilisiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Von den Jungtieren wurden am Tag 1 post partum mononukleäre Zellen aus der Milz gewonnen und mit PMA/Ionomycin stimuliert. Zellen in Medium als Negativkontrolle Nach 24 h wurde der Überstand mit ELISA-Technik auf IFN-γ ***(A)*** *und IL-4* ***(B)*** *analysiert. Die Milzen dreier Tiere wurden gepoolt. * signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen OVA und PBS. PBS: n = 5; $Al(OH)_3$: n = 4 ; OVA: n = 5. n.s. = nicht signifikant*

3.2.3.2 Frequenzanalyse zytokinproduzierender T-Zellen den Jungtieren am Tag 1 post partum

Mononukleäre Milzzellen wurden in Zellkultur 24h mit Mitogen (PMA/Ionomycin) vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels ELISpot-Technik. Danach Auswertung mit Lichtmikroskop (Abb. 3.13).



A nicht-stimulierteZellen **B stimulierte Zellen**

Abbildung 3.13:

Detektion zytokinproduzierender Zellen mittels ELISpot-Technik

Mononukleäre Zellen der Milz wurden 24h in mit PMA und Ionomycin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf eine Platte aufgetragen, die mit Antikörpern gegen Zytokine beschichtet war. Nach einer weiteren Stimulation über 24h wurden die Zellen entfernt, ein zweiter Antikörper zugegeben und nach Zugabe von Streptavidinperoxidase mit BDPI entwickelt. Dargestellt ist das Bild eines wells mit nicht-stimulierten Zellen ***(A)*** *und mit zytokinproduzierenden Zellen nach mitogener Stimulation* ***(B)****. Vergrößerung 16x*

In beiden Gruppen waren IFN-γ produzierende Zellen nachweisbar. Bei Nachkommen sensibilisierter Muttertiere (OVA) war die Anzahl IFN-γ exprimierender T-Zellen im Mittel nur halb so hoch wie bei den Nachkommen der nicht sensibilisierten Muttertiere (PBS) (Abb 14). Folglich ist bei den Nachkommen der sensibilisierten Muttertiere ein Defizit IFN-γ -produzierender Zellen nachzuweisen.

IL-4 produzierende T-Zellen waren in beiden Gruppen in deutlich geringerer Anzahl vorhanden. Zwischen den Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abb. 3.14).

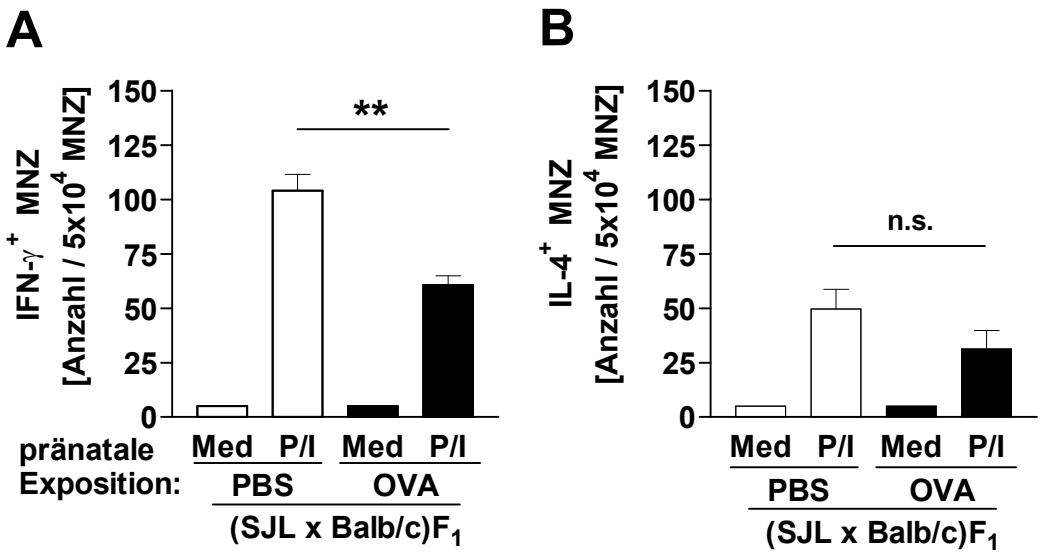


Abbildung 3.14:

Frequenz zytokinproduzierender Zellen in (SJL x Balb/c)F_1

*SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA exponiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder $Al(OH)_3$. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Von den Jungtieren wurden am Tag 1 post partum mononukleäre Zellen aus der Milz gewonnen und nach 48h Stimulation PMA/Ionomycin (P/I) mit ELISpot-Technik auf IFN-γ **(A)** und IL-4 **(B)** analysiert. Zellen in Medium ohne Stimulation als Negativ-Kontrolle. ** Signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe OVA und den Kontrollen PBS ($p < 0.05$). n.s. = nicht signifikant*

In beiden voneinander unabhängigen Methoden, der quantitativen als auch der Frequenzanalyse, zeigte sich eine signifikante Senkung der IFN-γ Kompetenz, also Senkung des IFN-γ Titers und der IFN-γ-produzierender Zellen in Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 OVA-behandelter Muttertiere. IL-4 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Diese Daten zeigen, dass die erhöhte Produktion von Gesamt-IgE in den Jungtieren der exponierten Muttertiere zum Geburtszeitpunkt trotz der genetischen Balb/c-Kompetenz nicht mit einem deutlichen T_H2-Phänotyp einhergeht, sondern mit einer T_H1-Schwäche assoziiert ist.

3.2.4 Produktion von Gesamt-IgE und allergenspezifischen Immunglobulinen in Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 post partum

Um den Langzeiteffekt der allergischen Sensibilisierung der Muttertiere auf die Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1 zu untersuchen, fand am Tag 28 post partum eine weitere Analyse der Jungtiere statt. Es wurde als globaler Parameter der allergischen Sensibilisierung Gesamt-IgE bestimmt. Als allergenspezifische Parameter dienten anti-OVA-IgE, -IgG_1 und -IgG_{2a}. Analysiert wurden die Seren der Tiere mittels ELISA-Technik.

Analyse der Gesamt-IgE Produktion

In den Nachkommen der nicht exponierten Muttertiere (PBS; $Al(OH)_3$) waren nur keine Titer von Gesamt-IgE nachweisbar. Im Gegensatz dazu wiesen die Nachkommen der OVA-exponierten Muttertiere erhöhte Gesamt-IgE Titer auf. Bei dieser Gruppe bestand zudem ein Produktionsanstieg von Gesamt-IgE in den ersten vier Lebenswochen auf Werte, die höher waren als die der Muttertiere nach Abschluss der OVA-Sensibilisierung (Abb. 3.15)

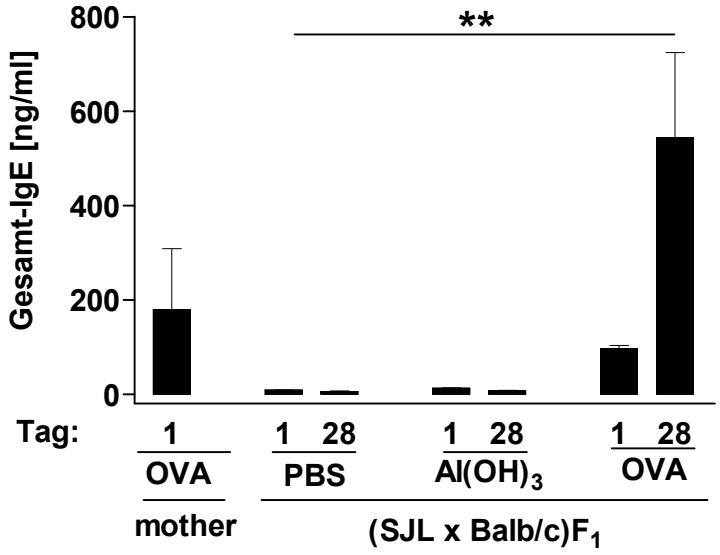


Abbildung 3.15:
Produktion von Gesamt-IgE in (SJL x Balb/c) F_1 am Tag 28 p.p.

*SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA sensibilisiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder $Al(OH)_3$. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Am Tag 28 p.p. wurde von den Jungtieren Serum gewonnen und mit ELISA-Technik auf Gesamt-IgE analysiert. Darstellung des Gesamt-IgE-Titers in Abhängigkeit des Alters und der pränatalen Exposition der Mutter. *** Signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe OVA und den Kontrollen PBS und $Al(OH)_3$ ($p < 0.05$). PBS: $n = 10$; $Al(OH)_3$: $n = 8$; OVA: $n = 10$*

Analyse der spezifischen Immunglobuline

Allergenspezifische Immunglobuline waren in den Kontrollgruppen (PBS; $Al(OH)_3$) nicht feststellbar. Demgegenüber standen signifikant erhöhte Spiegel von anti-OVA-IgG_1 und -IgG_{2a} in den Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 exponierter Muttertiere (OVA) (Abb. 3.16). Der anti-OVA IgE Titer liegt im Bereich des Detektionslimits.

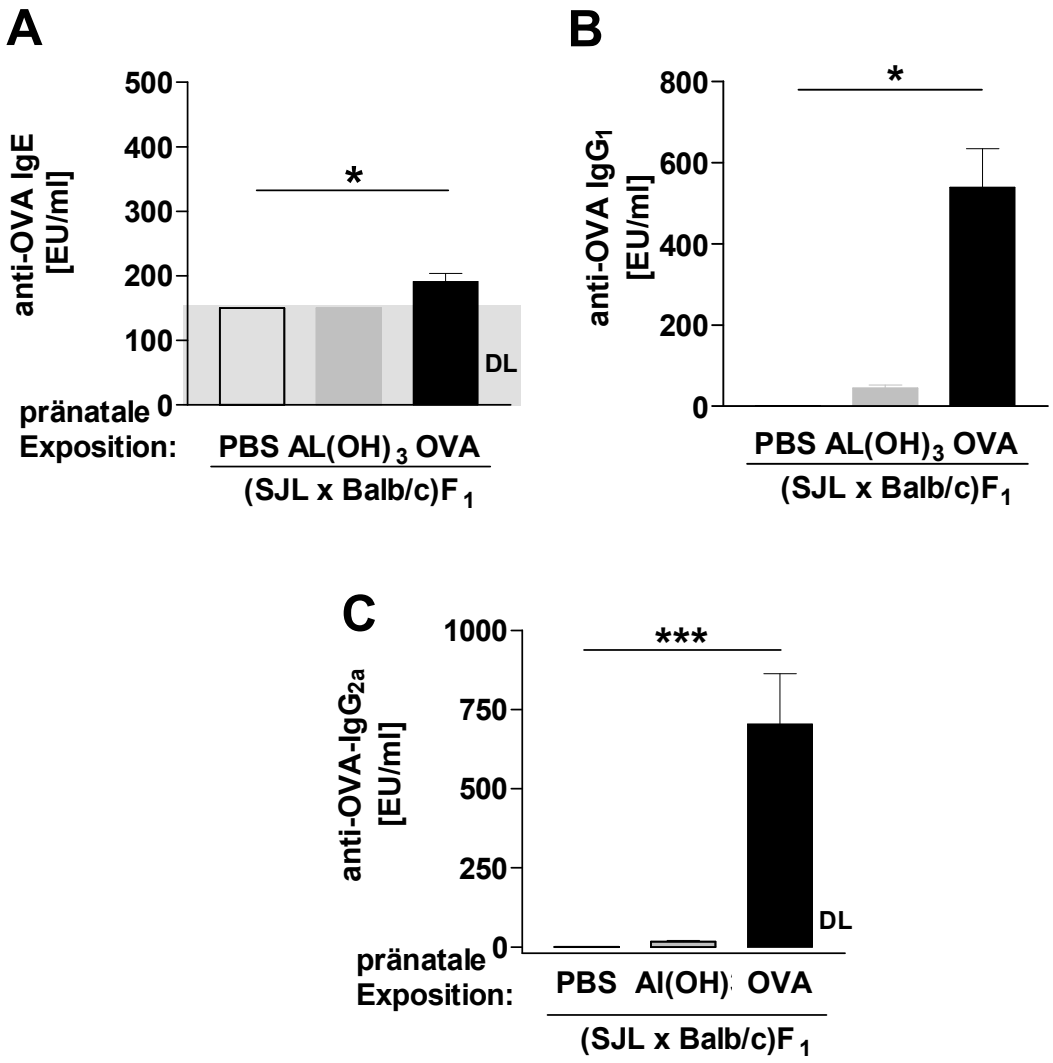


Abbildung 3.16:
Produktion antigenspezifischer Immunglobuline in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 post partum

SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA sensibilisiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder $Al(OH)_3$. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Von den Jungtieren wurde am Tag 28 post partum Serum gewonnen und mittels ELISA-Technik analysiert. Dargestellt ist der Titer von anti-OVA-IgE ***(A)****, -IgG_1* ***(B)*** *und -IgG_{2a}* ***(C)*** *in (SJL x Balb/c)F_1 getrennt nach Exposition der Mutter. *** Signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe OVA und den Kontrollen PBS bzw. $Al(OH)_3$ ($p < 0.05$). PBS: n = 5; $Al(OH)_3$: n = 7 ; OVA: n = 8. DL = Detektionslimit*

Diese Daten zeigen, dass

- **die Exposition der Muttertiere auch nach vier Wochen, also nach Beendigung der Säugephase, eine Aktivierung des Immunsystems der Jungtiere hervorruft.**
- **die Jungtiere trotz genetischer Kompetenz (Balb/c) keine T_H2-Reaktion ausbilden**

3.2.5 Injektion eines heterologen Antigens in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 post partum

Es wurde bisher gezeigt, dass in den Jungtieren (SJL x Balb/c)F_1 durch die Exposition der Muttertiere gegenüber Ovalbumin erhöhte Gesamt-IgE-Titer und eine T_H1-Schwäche induziert worden sind. Zudem wurde gezeigt, dass maternale allergenspezifische Immunglobuline plazentar auf den fetalen Organismus übertragen wurden.

Es stellte sich nun für uns die Frage, wie die Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1 unter diesen Voraussetzungen auf ein fremdes, zu OVA heterologen Antigen reagieren würden. Zur Beantwortung dieser Frage erhielten die Jungtiere aller Versuchsgruppen eine einmalige Injektion von β-Lactoglobulin (BLG) i.p. am Tag 28 post partum. Bei BLG handelt es sich um ein zu OVA heterologes Antigen. Im wöchentlichen Abstand wurden die Titer von Gesamt-IgE, anti-BLG-IgG_1 und -IgG_{2a} im Serum der Tiere bestimmt. Gesamt-IgE ist ein globaler Parameter des Immunsystems. Anti-BLG-IgG_{2a} ist Ausdruck einer T_H1-gewichteten Immunantwort, während anti-BLG-IgG_1 ein Zeichen der Immunantwort vom T_H2-Typ darstellt.

Verlauf des Gesamt-IgE-Titers

In Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 nicht-exponierter Muttertiere (PBS) war in den ersten drei Wochen nach BLG-Injektion Gesamt-IgE nachweisbar, danach fiel die Gesamt-IgE Konzentration unter die Nachweisgrenze. Im Gegensatz hierzu zeigten die Tiere sensibilisierter Mütter (OVA) signifikant höhere und zudem ansteigende Gesamt-IgE Titer über den gesamten Beobachtungszeitraum. Desweiteren stieg die Konzentration im Verlauf über vier Wochen deutlich an (Abb. 3.17). Damit zeigen die Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 von exponierten Muttertieren eine verstärkte globale Immunreaktion auf ein fremdes Allergen.

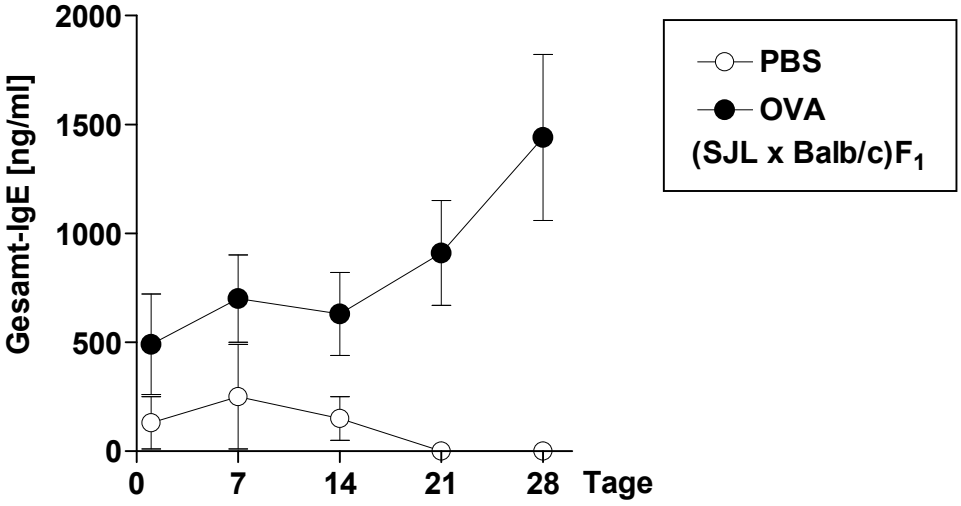


Abbildung 3.17:
Verlauf des Gesamt-IgE Titers in (SJL x Balb/c)F_1 nach BLG-Injektion

SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA exponiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder $Al(OH)_3$. Verpaarung mit Balb/c-Mäusen. Injektion i.p. von β-Laktoglobulin (BLG) in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 p.p.. Anschließend wöchentliche Serumgewinnung und Analyse des Gesamt-IgE-Titers mit ELISA-Technik. Signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe OVA und den Kontrollgruppen $Al(OH)_3$ und PBS ($p < 0.05$). PBS; $Al(OH)_3$; OVA: $n = 12$

Verlauf des anti-BLG-IgG$_1$-Titers

Nach BLG-Injektion zeigten alle Tiere anti-BLG-IgG$_1$-Titer. In allen Gruppen erfolgte der Anstieg des anti-BLG-IgG$_1$-Titers gleichsinnig. Zwischen den Gruppen ergaben sich keine Unterschiede in der Höhe der Reaktion (Abb. 18). Daraus ergab sich, dass die T_H2-Reaktion der Jungtiere (SJL x Balb/c)F_1 ohne Unterschied bezüglich der maternalen Exposition ablief.

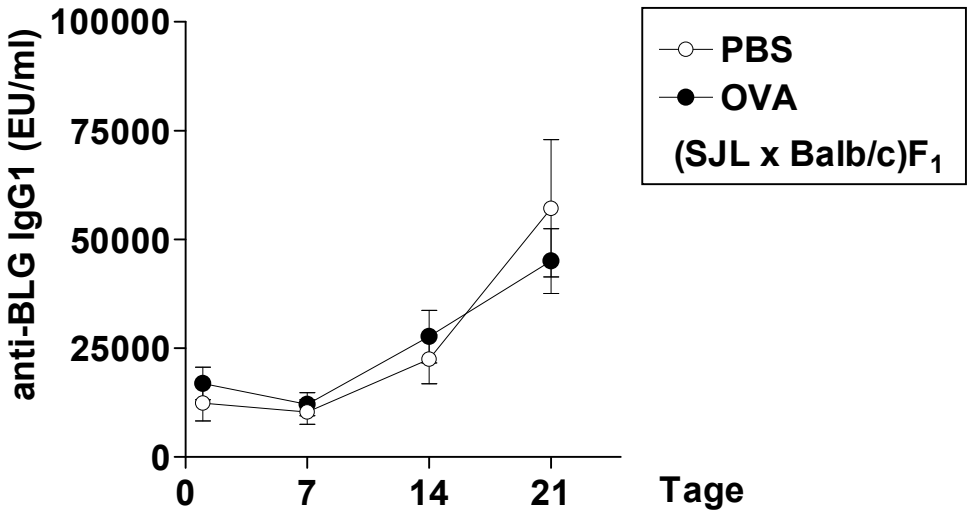


Abbildung 3.18:
Produktion von anti-BLG IgG$_1$ in (SJL x Balb/c)F_1 im Verlauf nach BLG-Injektion

SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA exponiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS oder Al(OH)$_3$. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Injektion i.p. von β-Laktoglobulin (BLG) in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 post partum. Anschließend wöchentliche Serumgewinnung und Analyse des anti-BLG IgG$_1$ -Titers mit ELISA-Technik. OVA, PBS: n = 12

Verlauf des anti-BLG-IgG_{2a}-Titers

Nach BLG-Injektion war in allen Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum das allergenspezifische Immunglobulin anti-BLG-IgG_{2a} nachweisbar. In Nachkommen nicht-exponierter Muttertiere (PBS) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von anti-BLG-IgG_{2a} bis zum Tag 28. Die Nachkommen exponierter Muttertiere (OVA) zeigten bis zum Tag 21 keinen Anstieg der anti-BLG-IgG_{2a}-Konzentration. Im Vergleich war die anti-BLG-IgG_{2a}-Konzentration in der Gruppe OVA über den gesamten Beobachtungszeitraum geringer als in der Gruppe PBS (Abb. 19). Zudem lag in der Gruppe PBS eine enorme Varianz der Konzentrationen vor, die sich in der Gruppe OVA nicht zeigte. Die verminderte Produktion von anti-BLG-IgG_{2a} zeigt in den Nachkommen sensibilisierter Muttertiere eine T_H1-Reaktionsschwäche gegenüber einem fremden Allergen.

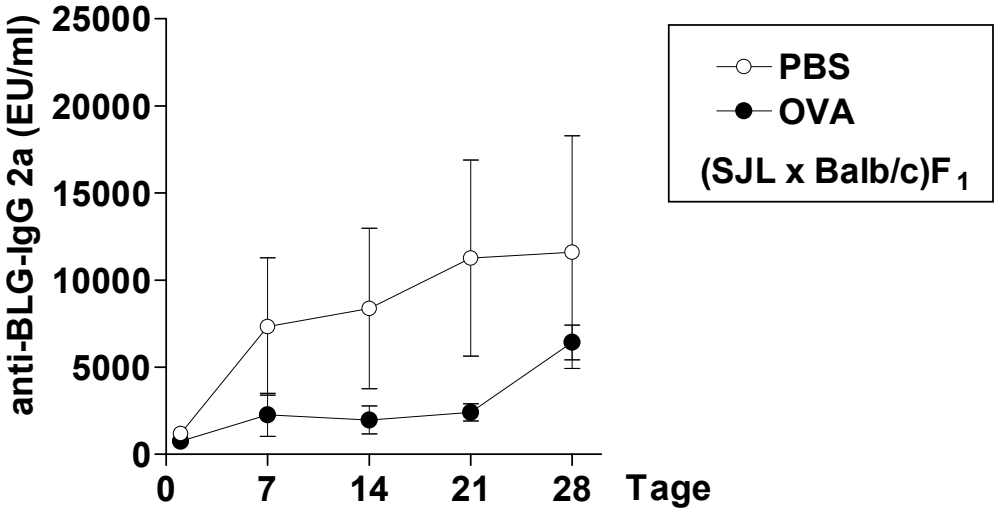


Abbildung 3.19:
Produktion von anti-BLG IgG_{2a} in (SJL x Balb/c)F_1 im Verlauf nach BLG-Injektion

SJL-Weibchen wurden prä- und perigestal gegen OVA sensibilisiert. Statt OVA erhielten die Kontrollen PBS. Verpaarung mit Balb/c-Männchen. Injektion i.p. von β-Laktoglobulin (BLG) in (SJL x Balb/c)F_1 am Tag 28 post partum. Anschließend wöchentliche Serumgewinnung und Analyse des anti-BLG IgG_{2a} -Titers mit ELISA-Technik. OVA, PBS: n = 12

Diese Daten zeigen, dass

- **die Jungtiere auf ein fremdes Allergen in Abhängigkeit der mütterlichen Exposition eine unterschiedliche Immunantwort ausbilden.**
- **die Jungtiere der Ovalbumin exponierten Muttertiere trotz der genetischen Kompetenz keine allergische Reaktion aufbauen, sondern mit einer Reduktion anti-allergischer Faktoren wie IFN-γ reagieren. Es besteht damit eine T_H1-Schwäche.**

IV. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die maternalen Einflüsse auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems gegenüber Allergien zu untersuchen. Für die Entwicklung eines Immunsystems, das zur allergischen Reaktion neigt, sind Umweltantigene und genetische Prädispositionen wichtige Einflussgrößen (Holgate et al. 2000, Strachan et al. 1997). Weiterhin wurde in Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt, dass schon in der Entwicklung des fetalen Immunsystems im intra-uterinen Milieus entscheidende Weichen für das spätere Reaktionsmuster gestellt werden (Warner et al. 2000, Jones et al. 1998). Diese Fragestellung war Gegenstand der vorliegenden Studie und wurde aus praktischen wie auch ethischen Gründen am Tiermodell durchgeführt. In diesem Versuchsansatz konnte nun ein eindeutiger Effekt auf die adaptive Immunantwort durch maternale Allergensensibilisierung nachgewiesen werden.

In unserem Versuchsaufbau wurden die Balb/c und SJL Maus als Organismen gewählt, als Modellallergen das in vielen Studien bereits etablierte Ovalbumin. Mit Ovalbumin konnten schon in der Vergangenheit wichtige Vorgänge des Immunsystems aufgedeckt werden (Herz et al. 1996 und 1998). Balb/c Mäuse gelten nach OVA-Exposition als high-responder, da sie aufgrund genetischer Disposition im Vergleich zu anderen Mausstämmen erhöhte Titer an allergenspezifischem IgE und IgG_1 produzieren (Holt et al. 1981). SJL Mäuse gelten als low-responder aufgrund entsprechend geringerer Produktion.

SJL-Muttertiere wurden gewählt, um im intrauterinen Milieu eines low-responders zu arbeiten. Balb/c Mäuse stellten die Vatertiere, um den Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 die genetische Kompetenz eines high-responders zu geben. In dieser Versuchskonstellation sollten genetische Faktoren von umweltbedingten Einflüssen durch die allergenexponierende Behandlung abgegrenzt werden. Zum Vergleich diente ein Modell mit Balb/c Mäusen.

4.0 Vergleich der Entwicklung des Immunsystems von Maus und Mensch

Zur Diskussion der Ergebnisse aus unserem in vivo Modell und zum Vergleich mit dem humanen System sind Kenntnisse über die Entwicklung des murinen und humanen Immunsystems von Bedeutung. Zum Zeitpunkt der Geburt ist im murinen System der Aufbau des Immunsystems noch nicht abgeschlossen. Vergleicht man die Anzahl der T-Zellen bei Geburt und in adulten Tieren, so unterscheidet sich diese um den Faktor 100. Im Vergleich zum humanen System entspricht die 22. Schwangerschaftswoche des Menschen dem Geburtstermin der Maus (Tag 20). T-Zell-Vorläufer erscheinen ab dem 16. Gestationstag im murinen Thymus, die Entwicklung der CD 4^+ und CD 8^+ Zellen ist frühestens ab dem 16.-17.Tag post conceptionem abgeschlossen (Collins et al. 2005).

Das humane System zeigt eine Etablierung der lymphoiden Thymusstrukturen im ersten Schwangerschaftstrimester (Lobach al. 1987). Ab der 8.-9. Woche können T-Zell-Vorläufer im Thymus detektiert werden (Haynes et al. 1988). Bereits ab diesem Zeitpunkt können T-Zellen aus dem Thymus auf mitogene Stimuli proliferieren und exprimieren Histokompatibilitätsantigene auf ihrer Zelloberfläche (Hayward et al 1981). Die Expansion der T-Zellen in fetaler Milz und fetaler Leber wird zwischen der 12. und 23. Schwangerschaftswoche beobachtet, die Migration der T-Zellen in den peripheren Blutkreislauf findet ungefähr in der 15.-16. Woche statt (Hayward et al. 1974).

Die zeitlich versetzte Reifung des Immunsystems bei Maus und Mensch ermöglicht den Vorteil einer postnatalen Untersuchung des murinen Immunsystems, welches zu diesem Zeitpunkt einen fetalen Abschnitt in der Entwicklung des humanen Immunsystems repräsentiert.

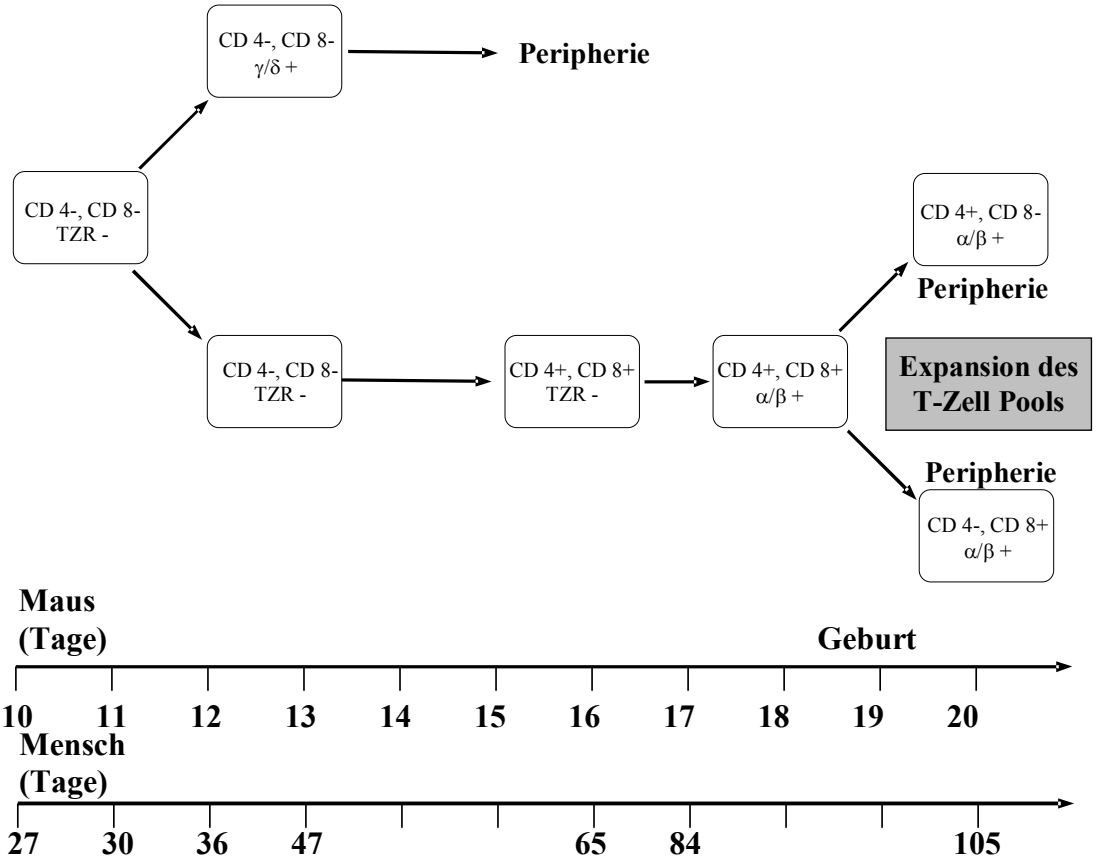


Abbildung 4.1:
Vergleich der Entwicklung des Immunsystems zwischen Maus und Mensch
(verändert nach Paul et al. 1993)

Dargestellt ist die Reifung der T-Zell Oberflächeantigene CD 4 und CD 8 mit den Ketten α,β,γ,δ in Abhängigkeit der Tage nach Konzeption für Mensch und Maus.

4.1 Charakterisierung des Phänotyps der Versuchtiere

Um die Ergebnisse der Ovalbumin-Behandlung vollständig beurteilen zu können, war es notwendig, den genetischen Hintergrund der eingesetzten Versuchstiere, insbesondere der Nachkommen, zu kennen. Dies sind SJL-, Balb/c- und (SJL x Balb/c)F1 – Mäuse. Untersucht wurden die Kettenabschnitte $V_\beta 8$ und $V_\beta 6$ auf dem T-Zell-Rezeptor (TZR) der Leukozyten.

Der TZR ist ein Heterodimer mit zwei transmembranen Polypeptidketten, die mit α und β bezeichnet werden und durch Disulfidbrücken untereinander in Verbindung stehen (siehe Abb. 4.2). Jede Kette besteht aus einer variablen (V) und einer konstanten Einheit (C). Es ist bekannt, dass ein erhöhter

prozentualer Anteil von $V_\beta 8$-Ketten in TZR mit einer erhöhten Bereitschaft des Organismus einhergeht Allergien auszubilden (Herz et al. 1995, Renz et al. 1992, Beyer et al. 1999, Ariail et al. 1998, Guo et al. 2002). $V_\beta 6$-Ketten sind dagegen bisher nur mit multipler Sklerose (Bourdette et al. 1994, Chou et al. 1994), nicht aber mit allergischen Eigenschaften verbunden worden und dienten als Kontrolle.

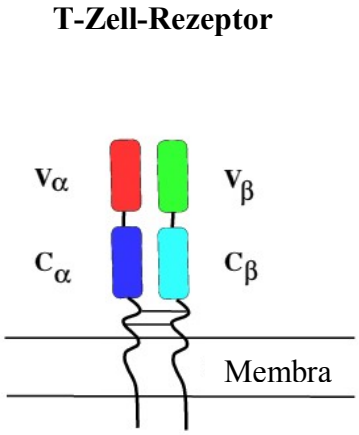


Abbildung 4.2: T-Zell Rezeptor
Die Bestandteile des T-Zell-Rezeptors. Variabler Teil V, Konstanter Teil C

In SJL-Mäusen konnten im Durchflusszytometer keine $V_\beta 8$-Ketten nachgewiesen werden, während der $V_\beta 8$-Anteil in Balb/c- Tieren bei 20% aller $CD3^+$ Zellen lag. Dies korreliert mit früheren Befunden (Herz et al. 1995) und zeigt das Verhalten der Mäuse entsprechend als low- oder high-responder. $V_\beta 6$-Ketten fanden sich auf 11,5% der $CD3^+$ Zellen in SJL und Balb/c Mäusen (Abb. 3.1).

Die Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 zeigten einen prozentualen Anteil für die $V_\beta 8$ wie auch für die $V_\beta 6$ Kette von 15-19 % der $CD3^+$ Zellen (Abb. 3.2) Damit war bei den Nachkommen (SJL x Balb/c)F_1 die Übertragung der genetischen Kompetenz der Balb/c-Vatertiere nachgewiesen. Die Nachkommen bildeten somit den Phänotyp eines high-responders aus.

Auch in Menschen scheinen diese Arten von T-Zell-Rezeptoren von Bedeutung zu sein, da Allergiker anscheinend eine erhöhte Variation der Expression dieser Ketten besitzen (Burton et al. 1990) und $V_\beta 8$-Ketten tragende T-Lymphozyten besonders selektiert werden (Dorion et al. 1995, Guo et al. 2002). Durch eine spezifische Immuntherapie konnte ebenfalls eine differentielle Expression der mit Allergie in Verbindung gebrachten Ketten nachgewiesen werden (Sade et al. 2003). Insbesondere für $V_\beta 8$-Ketten wird auch in Menschen eine besondere Rolle für die Allergieauslösung vermutet (Liebers et al. 2001)

4.2 Charakterisierung der humoralen Immunantwort in SJL und Balb/c Mäusen

Für die Interpretation der Studienergebnisse ist es wichtig, wie sich SJL- und Balb/c Mäuse jeweils sensibilisieren lassen. Hierzu wurden in den Mäusen vor und nach der Exposition gegenüber dem Modellallergen Ovalbumin die Spiegel an Gesamt-IgE und allergenspezifischem IgE, IgG1 und IgG2a gemessen.

In SJL-Mäusen zeigte sich nach Allergenexposition eine Gesamt-IgE Produktion (Abb. 3.4) wie auch eine Produktion an allergenspezifischen IgG_1 und IgG_{2a}. Im Vergleich wird deutlich mehr spezifisches IgG_{2a} gebildet. Allergenspezifisches IgE ist nicht gebildet worden (Abb. 3.5). Damit ist das Immunsystem der SJL-Muttertiere nach Abschluss der OVA-Exposition zwar unspezifisch aktiviert, was an dem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel sowie den erhöhten Spiegeln von spezifischen IgG1 und IgG2a festzumachen ist. Doch müssen die SJL-Mäuse als nicht gegen Ovalbumin sensibilisiert angesehen werden, da kein ovalbumin-spezifisches IgE gebildet wurde. Zudem ist die Produktion von spezifischem IgG_{2a} deutlich gegenüber spezifischem IgG_1 erhöht, was eine insgesamte Ausrichtung des Immunsystems der SJL-Mäuse in Richtung eines T_H1-Typs zeigt. Auch in früheren Studien wurde keine Sensibilisierung hervorgerufen (Holt et al.1981). In neuerer Zeit wird angenommen, dass ein profunder Mangel an IL-4-Produktion der Grund für dieses Phänomen darstellen könnte (Yoshimoto et al. 1995). Dies kann auch die Diversität der IgG_1 und IgG_{2a}-Produktion erklären, da IL-4 die IgG_{2a}-Produktion triggert.

In Balb/c-Mäusen besteht nach Allergenexposition sowohl eine signifikante Gesamt-IgE-Produktion (Abb. 3.6) und eine signifikante Produktion der allergenspezifischen Immunglobuline IgG1, IgG_{2a} und IgE (Abb. 3.7). Insbesondere die Produktion von allergenspezifischem IgE zeigt eine allergische Sensibilisierung des Immunsystems auf die OVA-Exposition an. Weiterhin besteht eine deutlich höhere Produktion von spezifischem IgG_1 im

Vergleich zu IgG_{2a}. Dies belegt die Aktivierung des Balb/c Immunsystems im Sinne einer T_H2-Reaktion.

Bei Gegenüberstellung zeigt sich, dass SJL-Mäuse erst nach Sensibilisierung auf ein Allergen auf den Gesamt –IgE-Spiegel kommen, der bei Balb/c Mäusen vor der Sensibilisierung gemessen wurde (Abb. 3.8). Ebenso stellt sich die Balb/c Maus durch eine Kapazität zur Bildung von spezifischem IgE dar, dies vermag die SJL-Maus nicht. In der Produktion von spezifischem IgG_{2a} und IgG_1 verhalten sich beide Maustypen konträr (Abb. 3.9). Zusammenfassend ist festzustellen, dass beide Mausstämme auf dasselbe Allergen verschieden reagieren. Dies wurde erstmals umfassend von Holt et al. 1981 beschrieben. Die Reaktivität insbesondere der Mausstämme SJL und Balb/c wurde auch in neuerer Zeit untersucht, speziell die Produktion von allergenspezifischen IgE (Seitzer et al. 2005). Die Neigung der SJL-Mäuse, eher eine T_H1 Antwort und der Balb/c Mäuse, eher eine T_H2 Antwort zu bilden, wird bei Charles et al 1999 und Peltoniemi 2003 mit verschiedenen Ansätzen beschrieben. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse unserer Untersuchungen, dass SJL-Mäuse keine allergische Sensibilisierung, dafür eine erhöhte T_H1-Antwort zeigen und dass Balb/c-Mäuse eine deutliche Sensibilisierung ausbilden.

4.3 Charakterisierung der Immunantwort der Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 am Tag 1 p.p.

4.3.1 Maternaler Transfer von allergenspezifischem IgG_1

Von allen Immunglobulinen besitzt IgG die kleinste Molekülgröße und ist plazentagängig. Durch die plazentare Übertragung erhält der Fetus einen ersten Schutz vor Keimen in Form dieser Antikörper. Dieser Schutz wird postnatal ergänzt durch die Muttermilch, die reich an maternalem IgA und IgG ist (Van de Perre 2003, Cleary 2004) Beim Stillen werden diese Antikörper vom Jungtier aufgenommen. Der Transport über die Plazenta wird dabei über einen neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) bewerkstelligt (Brandtzaeg et al. 1992, Kristoffersen et al. 1996). Der FcRn ist einmalig unter den Fc-Rezeptoren,

indem er ähnlich aufgebaut ist wie der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I MHC I (Simister 1993).
Auch in unserem Mausmodell wurde der materno-fetale Immunglobulintransfer untersucht. In den Jungtieren der mit OVA behandelten Muttertiere konnte das Vorkommen von anti-OVA IgG1 gemessen werden (Abb. 10). Dieses konnte mit einem Auftreten von Atopie zu einem späteren Lebenszeitpunkt korreliert werden (Jenmalm et al. 2000).

4.3.2 Nachweis von Gesamt-IgE

In den Nachkommen der mit OVA behandelten Muttertiere ließen sich geringe Titer von Gesamt-IgE nachweisen (Abb. 3.11). IgE ist aufgrund seiner Molekülgröße nicht plazentagängig und kann daher von einer Eigenproduktion der Jungtiere stammen. In der Literatur ist eine IgE-Produktion bei Feten beschrieben (Miller et al. 1971), diese wird zudem mit Atopiebildung im späteren Leben korreliert. (Michel FB et al. 1980, Bergmann et al 1997) Dies kann Ausdruck eines Geschehens sein, welches in utero eine IgE-Produktion hervorgerufen hat. Eine Erklärung wäre die Übertragung von Eiweißen über die Plazenta. Diese Möglichkeit wurde schon sehr früh in Betracht gezogen (Ascoli et al. 1902, Ratner et al. 1927). Mittlerweile konnte diese Übertragung mit neuen technischen Mitteln eindeutig belegt werden (Szepfalusi et al. 1997). Auch bekannte Antigene wie das der Hausstaubmilbe konnten in der Amnionflüssigkeit und dem Nabelschnurblut detektiert werden (Holloway et al. 2000). Es ist daher anzunehmen, dass auch in unserem Modell der Fetus einer Ovalbuminexposition ausgesetzt war. Bei dieser Annahme besteht nun die Frage, ob es sich bei dem detektierten IgE um eine Eigenproduktion handelt, wie oben beschrieben oder um eine Übertragung von IgE selber, wie es andere Gruppen beschreiben (Thornton et al 2003, Jones et al 2000, Jones 1998). IgE wird in deren Modell in der Amnionflüssigkeit gebildet, die der Fetus trinkt und aspiriert. Durch diese gastrointestinale Exposition wird eine Aufnahme von IgE angenommen. Für uns ist eine derartige Übertragung wahrscheinlicher als eine Eigenproduktion zu diesem sehr frühen Zeitpunkt und wird daher auch in unserem Modell angenommen.

In vielen Studien konnten erhöhte IgE-Titer im Nabelschnurblut als Risikofaktor die Ausbildung von Allergien im späteren Leben identifiziert werden (Tariq et al 1999, Allam et al. 2005, Bergmann et al 1997). In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass ein Rezeptor für die IgE-Aufnahme im Darm von CD23 und IL-4 gesteuert wird (Tu et al. 2005). Für unser Modell bedeutet dies, dass der Fetus im intrauterinen Milieu eines low-responders, der SJL-Maus, wächst, aber durch die genetische Kompetenz des Balb/c-Vaters eine verstärkte Aufnahme von IgE über eine verstärkte Expression des IgE-Rezeptors bewerkstelligen könnte.

4.3.3 Analyse des Zytokinprofils der Nachkommen am Tag 1 post partum mit zwei unabhängigen Methoden.

Mittels Analyse der produzierten Zytokine lassen sich Rückschlüsse auf die Immunlage des Organismus ziehen. Insbesondere zur Charakterisierung einer T_H1- bzw. T_H2-Deviation werden die Zytokine IFN-γ und IL-4 herangezogen. IFN-γ ist das wichtigste Makrophagen-aktivierende Zytokin und hat zusätzliche Funktionen im angeborenen Immunsystem. Dies macht es zum Signalzytokin für eine Differenzierung von naiven T-Zellen in T_H1-Helferzellen und zum Beginn einer T_H1-gerichteten Immunantwort. Auf B-Zellen hat IFN-γ den Effekt eines Klassenwechsels der Immunglobulinproduktion zur IgG_{2a} Klasse.
IL-4 dagegen ist der Hauptstimulus zur Produktion von IgE in B-Zellen und für die Entwicklung von T_H2-Helferzellen aus naiven T-Zellen. IL-4 ist das Schlüsselzytokin für den Aufbau einer T_H2-gerichteten Immunantwort.
Beide Systeme stehen über komplizierte und nicht vollends erforschte Mechanismen miteinander in Beziehung und hemmen sich reziprok.

In unseren Untersuchungen wurde das Zytokinprofil quantitativ mit Zellkulturtechnik und in der Zellfrequenz mittels Elispottechnik untersucht. In der Zellkulturtechnik wurde die Gesamtzytokinmenge bestimmt, während im Elispot die zytokinproduzierenden Zellen sichtbar gemacht wurden (Abb. 3.13).

Die ELISPot-Methode zeigte sich in Vergleichen verschiedener Methoden als die sensitivste zur Detektion von IFN-γ und IL-4 (Tassignon et al. 2005, Matijevic et al. 2005).
Es zeigte sich, dass in beiden Versuchsgruppen sowohl eine IFN-γ-Produktion als auch IFN-γ produzierende Zellen vorhanden war, diese jedoch in den Jungtieren behandelter Muttertiere signifikant herabgesetzt waren (Abb. 3.12 und 3.14). Die IL-4 Produktion wie auch die Frequenz IL-4-produzierender Zellen zeigte keinen Unterschied. Damit liegt also nicht nur eine geringere Produktion von IFN-γ vor, sondern es sind auch insgesamt weniger produzierende Zellen vorhanden.

Es ist bekannt, dass zum Zeitpunkt der Geburt alle Neugeborenen eine reduzierte IFN-γ-Produktion aufweisen. (Miyawaki et al. 1985, Lewis et al. 1986) Diese Reduktion ist bei Individuen mit vorangehender atopischer Belastung deutlich ausgeprägter (Holt et al. 1992, Warner et al. 1994). Diese klinischen Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse unseres murinen Modells, in dem die Neonaten der vorbehandelten Mütter ebenfalls deutlich geringere IFN-γ-Titer wie auch eine signifikant niedrigere Anzahl IFN-γ produzierender T-Zellen aufwiesen.
Eine starke Reduktion der IFN-γ-Titer zu Geburt ist mit der Entwicklung von Atopie, vor allem in jungen Jahren verbunden (Warner 1994, Kondo 1998, Prescott 1999). Bezogen auf die reduzierte Frequenz IFN-γ gibt es noch keine gesicherten Daten, da diese Erkenntnis erst durch die neue Methodik möglich wurde. Es ist aber zu vermuten, dass die reduzierte Anzahl der IFN-γ produzierenden Zellen einen ähnlichen Effekt haben dürfte.

Basierend auf humanen Daten haben Prescott et al 1998 ein hypothetisches Modell für die postnatale Reifung der polyklonalen IFN-γ-Antwort entworfen. In normalen, nicht atopischen Kindern stieg die IFN-γ-Produktion nach mitogener Stimulation in den ersten Lebensjahren an. Sie lag mit 2 Jahren immer noch unter der, die bei Erwachsenen gemessen wurde, erreichte aber im Alter von 4-5 Jahren annähernd die gleiche Höhe (Miyawaki et al. 1985).

Im Gegensatz dazu zeigten Kinder mit atopischer hereditärer Belastung in der frühkindlichen Phase weiterhin eine verminderte Kapazität er IFN-γ-Produktion verglichen mit Kindern niedrigen Allergie-Risikos (Holt et al.1992).
Während dieser Zeit waren die Immunantworten gegen Impfstoff-Antigene ebenfalls in den Kindern mit hohen IgE-Titern im Nabelschnurblut vermindert (Prescott et al. 1998). Daher könnte die IFN-γ-Produktion während der frühen Lebensperiode für die normale Entwicklung einer balancierten T_H1/T_H2-Immunantwort prägend sein. Die ersten 2 Jahre scheinen eine kritische Phase zu sein, um das Muster der T-Helfer-Gedächtnisfunktion zu entwickeln (Prescott et al 1997).
Ebenso konnte auch bei Menschen gezeigt werden, dass eine Exposition während der Schwangerschaft Einfluss auf die Allergieentstehung hat (Lehmann et al. 2002). Durch Vergleiche verschiedener Umweltbedingungen konnte deren großer Einfluss verdeutlicht werden(Lehmann et al. 2002).

Von einer klaren T_H2-Reaktion würde man auch einen hohen Titer an IL-4 respektive eine hohe Anzahl IL-4-produzierender Zellen erwarten. In unserer Untersuchung war in dieser Frage kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen am Tag 1 post partum festzustellen. Dies erklärten wir mit dem SJL-Mausstamm der Mutter, einem non-responder und mit dem zu diesem frühen Zeitpunkt noch sehr unreifen System, welches anscheinend noch keine eindeutige T_H2-Reaktion auslösen kann. Grund kann eine noch vergleichsweise gering ausgeprägte Expression ko-stimulierender Moleküle sein. In Studien mit menschlichen Neugeborenen zeigte sich ebenfalls eine zu Geburt deviierende IFN-γ-Produktion ohne Beeinflussung der IL-4-Synthese. Erst nach 6 Monaten bildete sich ein starkes T_H2-Zytokinmuster mit erhöhten IL-4-Titern in der Risikogruppe heraus (van der Velden et al. 2001). Für unser Modell bedeutet dies, dass am Anfang der Allergieentstehung ein Regulationsdefekt der anti-allergischen Faktoren, insbesondere des IFN-γ, stehen könnte, welcher die Ausbildung einer profunden Allergieneigung im Sinne eines T_H2-Typs begünstigt.

4.4 Charakterisierung der Immunantwort der Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 am Tag 28 post partum

4.4.1 Produktion von Gesamt-IgE am Tag 28 post partum

In den Nachkommen der mit OVA-behandelten Muttertiere wurde am Tag 28 post partum ein signifikant erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel gemessen, der im Vergleich zum Tag 1 p.p. wie auch zum Gesamt-IgE-Titer der Muttertiere am Tag 1 p.p. deutlich erhöht war. (Abb. 3.15). Wir führen diese Erhöhung auf eine Eigenproduktion der Jungtiere zurück. Eine relevante Übertragung von IgE über die Muttermilch wurde bisher nicht beschrieben (Duchen et al. 1996). Wir vermuten, dass an diesem Punkt der Einfluss des Balb/c Vatertieres, eines high-responders, deutlich wird. Durch das Vorhandensein von $V_\beta 8$-Ketten im T-Zell-Rezeptor scheinen die Jungtiere schon sehr früh in der Lage zu sein, IgE zu produzieren. Bekannt ist, dass das Vorhandensein von $V_\beta 8$-Ketten und IL-4 zusammen synergistisch wirkt und allergische Reaktionen stärker begünstigt als beide Faktoren alleine (Dieli et al. 1994 und 1998). In unserem Modell zeigt sich dieser Effekt durch die genetische Kompetenz der Jungtiere. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass dies nur die Jungtiere betrifft, die von mit Ovalbumin behandelten Muttertieren entstammen. Ein Stimulus neben der pränatalen Sensibilisierung kann die Übertragung von Zytokinen über die Muttermilch sein (Fageras Bottcher et al. 2000). Das erhöhte Gesamt-IgE stellt sich für uns als allgemeine Aktivierung des Immunsystems dar.

4.4.2 Spezifische Immunglobuline am Tag 28 post partum

Die Jungtiere der OVA-Gruppe zeigten am Tag 28 p.p. gegenüber den anderen Gruppen deutlich erhöhte Spiegel von OVA-spezifischen IgG1 und IgG2a. OVA-spezifisches IgE zeigte sich im Bereich des Detektionslimits und damit nicht signifikant erhöht. In den Ergebnissen anderer Gruppen konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls kein allergen-spezifisches IgE in den Jungtieren nachgewiesen werden (Uthoff et al. 2003). Wir führen die Abwesenheit dieser allergen-spezifischen Antikörper auf den Einfluss der SJL-Muttertiere zurück, die ein nicht sensibilisiertes intrauterines Milieu dem Feten bieten und daher

die Ausbildung dieser Antikörper verhindern. Dieses Phänomen findet sich ebenso in den Ergebnissen anderer Gruppen (Hamada et al. 2003).

Die erhöhten Titer des allergen-spezifischen IgG_1 und IgG_{2a} führen wir auf die postnatale Übertragung durch die Muttermilch zurück. Im neonatalen Darm der Nagetiere kann aufgrund des leicht aziden Milieus eine selektive Bindung von Fc-Rezeptoren und IgG direkt an der Oberfläche der intestinalen Zellen im proximalen Abschnitt des Dünndarms stattfinden (MacKenzie et al. 1984) Durch Transzytose werden die IgG-Antikörper an die basolateralen Zellseite der Enterozyten befördert und dort ins Serum entleert (Rodewal et al 1984). Der entsprechende Fc-Rezeptor ist nur in der fetalen und frühen postnatalen Phase nachweisbar (Simister et al. 1985). Durch diesen Prozess kann der IgG-Spiegel innerhalb der Stillperiode, die 16-18 Tage post partum dauert, ansteigen. Am Ende der Stillperiode wird der Rezeptor nicht mehr exprimiert und so ein Aufnahmestopp von Antikörpern herbeigeführt. Diese so genannte „gut closure“ (Halliday et al. 1959, MacKenzie et al. 1984) trennt schließlich das Immunsystem des Jungtieres von dem des Muttertieres.

Viele der Untersuchungen über Fc-Rezeptoren wurden zunächst mit murinem IgG_1 durchgeführt, heute geht man davon aus, dass alle Subklassen vom neonatalen Darm aufgenommen werden können (Tu et al. 2005). Die Kapazität des Transports sowie die Halbwertszeit sind allerdings sehr unterschiedlich (Israel et al. 1996) Als Grund hierfür kann eine unterschiedliche Aminosäurefrequenz der entsprechenden Domänen am Fc-Rezeptor sein.

Durch die Übertragung der allergenspezifischen Antikörper kann in den Nachkommen eine Immunmodulation hervorgerufen werden (Platt-Mills et al. 2003). Somit könnte sich die Exposition der Muttertiere durch die zu übertragenden Antikörper und die genetische Kompetenz der Jungtiere durch die Regulation der Aufnahme dieser Antikörper immunologisch auswirken.

4.5 Injektion eines heterologen Antigens in Jungtiere (SJL x Balb/c)F1 am Tag 28 post partum

Es ist bekannt, dass bei Allergikern häufig zunächst nur eine allergische Reaktion gegenüber einem Allergen besteht, diese aber mit der Zeit dazu neigt, auch auf andere Allergene überzugehen. Dieses als “allergischer Marsch” (Wahn et al. 2002) bekannte Phänomen beschreibt auch die Ausbreitung der klinischen Symptome von zunächst Hautekzemen bei Neugeborenen über allergische Rhinitis bei Kindern bis hin zu bronchialem Asthma bei Erwachsenen (Wahn et al 1997).

Um dieses Phänomen in unserem Modell zu untersuchen, wurde den Jungtieren (SJL x Balb/c)F1 am Tag 28 post partum einmalig β-Lactoblobulin (BLG) intraperitoneal verabreicht. β-Lactoblobulin ist zu Ovalbumin heterolog und daher für das Immunsystem der Jungtiere ein völlig neues Antigen. Nach der Injektion wurde wöchentlich Gesamt-IgE, anti-BLG-IgG_1 und anti-BLG-IgG_{2a} bestimmt.

4.5.1 Verlauf des Gesamt-IgE-Titers

Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Kontrollgruppe sich die Gesamt-IgE-Titer der Jungtiere nach der Injektion von β-Lactoblobulin erhöhten. Die Kontrollgruppe zeigte einen Abfall des Gesamt-IgE unter das Detektionslimit. Die Steigerung der Gesamt-IgE-Produktion kann nur von dem Jungtier selber ausgehen, da zu diesem Zeitpunkt die Stillperiode abgeschlossen ist. Wir sehen den Anstieg daher als Zeichen für eine weitere Aktivierung des Immunsystems sowie eine weitere Verschiebung des Ungleichgewichtes in Richtung T_H2-Dominanz. Da in der Kontrollgruppe das IgE sogar abfällt, ist hier ein postnataler Effekt der OVA-Behandlung der Muttertiere mit Ovalbumin in den Jungtieren zu sehen.

4.5.2 Verlauf der BLG-spezifischen Antikörper

Im Verlauf der anti-BLG-IgG_1-Titer konnte nach einem leichten Abfall in beiden Versuchsgruppen ein Anstieg detektiert werden. Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich nicht. Wir folgern daraus, dass sich unterschiedliche Reaktionen im T_H1/T_H2-System zunächst nicht in der Produktion der für T_H2-Reaktionen typischen IgG1 ausdrücken.

Im Gegensatz hierzu konnte bei dem Verlauf des anti-BLG-IgG_{2a} ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Während in der Kontrollgruppe die IgG_2-Antikörper nach der Injektion stark anstiegen, stagnierte in der OVA-Gruppe die Produktion und stieg erst nach vier Wochen an. Da IgG_{2a} typisch für T_H1-Reaktionen ist, scheint hier eine T_H1-Schwäche in den Jungtieren der OVA-Gruppe vorzuliegen.

4.5.3 Zusammenfassende Beurteilung der Reaktionen nach BLG-Injektion

Der Anstieg des Gesamt-IgE und die Stagnation des anti-BLG-IgG_{2a} in der OVA-Gruppe müssen zusammen betrachtet werden, um ausreichend beurteilt werden zu können. IgE wird hauptsächlich über die Interleukine IL-4 und IL-5 induziert. Als Gegenspieler fungiert IFN-γ und ist ein wichtiger Faktor zur Abwehr einer T_H2-Reaktion (Donckier et al. 1994). Ein reduzierter Titer von IFN-γ ist schon bei Geburt in der OVA-Gruppe detektierbar. Im Kontakt mit einem neuen Antigen wie zum Beispiel β-Lactoglobulin scheint sich die IFN-γ Schwäche auszuwirken: die Erhöhung der Gesamt-IgE-Titer in der OVA-Gruppe scheint von der weiterhin reduzierten IFN-γ-Antwort unterstützt zu sein. Wir vermuten daher eine Erhöhung des Gesamt-IgE durch Enthemmung des T_H2-Systems. Es konnte festgestellt werden, dass eine Reduktion des IFN-γ-Spiegels bei Geburt mit Entwicklung von Atopie im weiteren Leben in Verbindung gebracht werden konnte (Kondo et al. 1998). In einem Mausmodell, in dem trächtigen Muttertieren IFN-γ während der Schwangerschaft injiziert wurde, konnte nachgewiesen werden, dass die Nachkommen im Alter von 7 Wochen im Gegensatz zu unbehandelten Tieren auf OVA eine normale Atemwegsreaktion zeigten (Lima et al. 2005). Dies

stützt die These von einer protektiven Funktion von IFN-γ gegenüber einer Allergieentstehung.

Diskutiert wurde auch eine erhöhte Expression von $V_\beta 8$-tragenden Zellen als Wirkung einer vorangehenden Sensibilisierung (Bonfert et al. 1995). Ein weiterer Schluss wäre, dass die Reduktion von IFN-γ durch Allergenkontakte weiter anhält und damit die Entwicklung des Immunsystems durch Enthemmung weiter in Richtung einer T_H2-Dominanz gefördert wird (Warner et al. 1994, Neaville et al. 2003). Wir sehen diesen Effekt in unserem Modell insofern bestätigt, da sich die T_H1-Schwäche der Nachkommen von OVA-behandelten Muttertieren im Kontakt mit neuen Antigenen weiter verstärkt. Andere Studien konnten zeigen, dass auch im Menschen zunächst kein direkter allergischer Typ vorliegt, sondern sich dieser im ersten Lebensjahr entwickelt (Kerkhof et al. 2005).

4.6 Schema zur intrauterinen Interaktion und Allergie

Auf das fetale Immunsystem wirkt unmittelbar das uteroplazentare Milieu in Form von Hormonen und Zytokinen ein. Dieses Milieu unterdrückt T_H1-assoziierte Funktionen und begünstigt T_H2-polarisierte immunologische Interaktionen. Umweltallergene, die auf transplazentarem Weg dem Fetus im Blut und in der Amnionflüssigkeit präsentiert werden, können diese T_H2-Gewichtung verstärken und damit die T_H1 Funktionen weiter schwächen. Bis zu welchem Grad dies geschieht, scheint durch genetische Faktoren bestimmt zu sein, z.B. durch Faktoren, die die Expression von IL-4, von V_β-Ketten im T-Zell-Rezeptor oder die Expression von IgE-Rezeptoren regulieren. Diese drei Einflussgrößen bewirken das Bild, welches sich bei Geburt bietet: reduziertes IFN-γ deutet auf einen T_H1-Defekt und der Nachweis allergenspezifischer Zellen gibt Hinweise auf einen Allergenkontakt in utero. Diese Aspekte können als Prädiktoren für Atopiebildung im weiteren Leben gedeutet und eine Atopiebildung eventuell therapeutisch verhindert werden.

Durch Kontakt mit weiteren Umweltallergenen in der postnatalen Periode kann die bestehende T_H1-Schwäche persistieren und zur weiteren Entwicklung des neonatalen Immunsystems in Richtung einer T_H2-Deviation begünstigen und

eine Atopiebildung wahrscheinlich machen. Eine Aktivierung des Immunsystems durch T_H1-stimulierende Faktoren kann ein erneutes Gleichgewicht im Sinne einer T_H1/T_H2-Balance begünstigen und eine Toleranz im weiteren Leben etablieren.

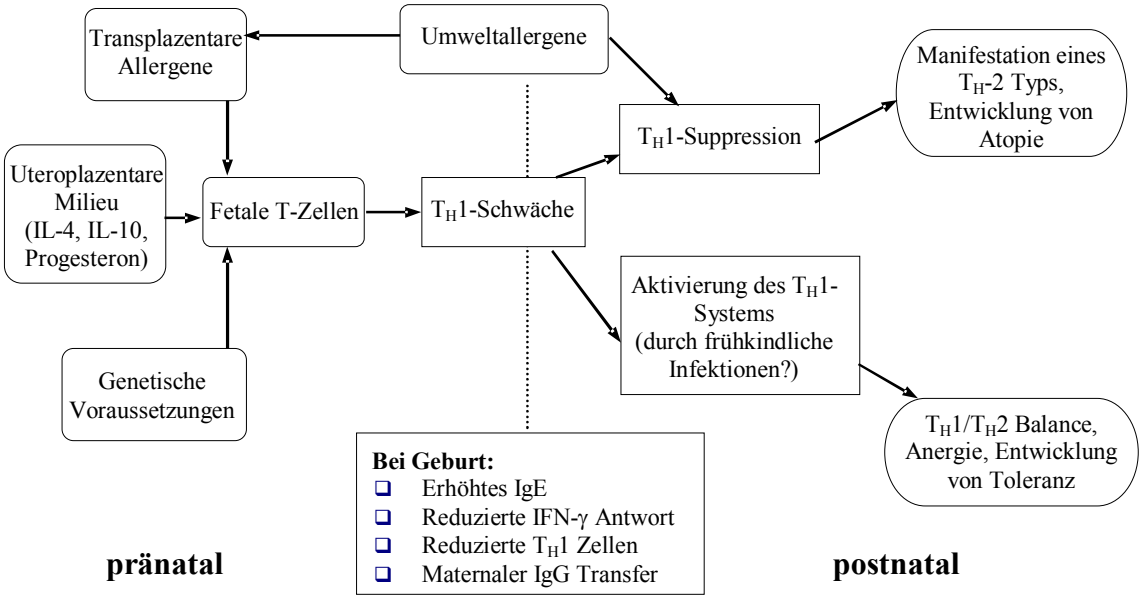


Abbildung 4.3:

Mögliches Schema zur prä- und postnatalen Beeinflussung der Entwicklung des Immunsystems durch Umwelt- und andere Faktoren.

Dargestellt sind die Einflussgrößen auf fetale T-Zellen wie transplazentare Allergen, das uteroplazentare Milieu und der genetische Hintergrund, die zu einer TH1-Schwäche bei Geburt führen können. Im weiteren Leben besteht durch weitere Einwirkungen auf die Immunlage die Ausbildung einer manifesten Allergie oder die Entwicklung einer Toleranzlage

Zusammenfassung

Epidemiologische wie auch klinischen Studien deuten daraufhin, dass die Entstehung von Allergien, z.B. bronchiales Asthma oder atopische Dermatitis, möglicherweise durch den maternalen Phänotyp geprägt werden. Sowohl die allergische Sensibilisierung der Mutter wie auch die Allergen Exposition während der Schwangerschaft scheinen hierbei von besonderer Bedeutung zu sein. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Frage untersucht, ob die maternale Sensibilisierung die Entstehung einer allergischen Immunantwort im Kind bahnt.

Zur Bearbeitung dieser Frage wurde folgender Versuchsaufbau im Mausmodell für Allergie und Asthma etabliert. Voruntersuchungen belegen, dass die Induktion einer T-Helfer-2-mediierten allergischen Reaktion im wesentlichen von der Expression der V_β-8 Ketten auf T-Zellen abhängt. SJL-Mäuse, die diese T-Zell-Rezeptor-Kette nicht exprimieren, entwickeln nur eine sehr geringe allergische Immunantwort („low-responder“), im Gegensatz dazu exprimieren BALB/c Mäuse das V_β-8Gen und entwickeln eine sehr ausgeprägte allergische Immunantwort („high-responder).

Basierend auf diesen Phänotypen wurde folgender Kreuzungsansatz entwickelt: SJL-Muttertieren wurden gegen Ovalbumin exponiert und mit BABL/c Männchen verpaart. Dadurch wurde folgende artifizielle Situation hergestellt. Die Muttertiere entwickeln trotz Allergen-Exposition keine allergische Immunantwort, jedoch erlangen die Nachkommen aufgrund der väterlichen genetischen Kompetenz den „high-responder“ Phänotyp. Die Nachkommen wurden dann im Alter von 6-8 Wochen gegen das Modellallergen β-Lactoglobulin exponiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass in Abwesenheit der maternalen allergischen Immunantwort die Produktion der allergen-spezifischen Antikörper der Subklasse IgG_1 sich nicht zwischen maternal allergen-exponierten und nicht-allergen-exponierten Tieren unterschied. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Differenz in der Produktion der anti-allergischen Antikörper der Subklasse IgG_{2a}. Nachkommen von maternal sensibilisierten Muttertieren zeigten eine deutlich niedrigere Produktion dieser anti-allergischen Antiköper im Vergleich zu Nachkommen nicht-sensibilisierter Muttertiere.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die maternale Sensibilisierung tatsächlich einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Allergien in den Nachkommen hatte. Diese Daten unterstützen die Bemühungen, die Allergen-Exposition während der Schwangerschaft zu vermeiden und unterstreichen die Notwendigkeit der therapeutischen Behandlung von Allergien bereits in der Schwangerschaft.

Literaturstellenverzeichnis

Allam JP, Zivanovic O, Berg C, Gembruch U, Bieber T, Novak N.
In search for predictive factors for atopy in human cord blood.
Allergy. 2005 Jun;60(6):743-50

Allen-Ramey F, Schoenwetter WF, Westerman D, Markson LE.
Sensitization to common allergens in adults with asthma. *J Am Board Fam Pract*. 2005 Sep-Oct;18(5):434-9

Ariail KS, Bebo BF, Adlard K, Robey I, Newman MJ, Todd CW, Vandenbark AA, Offner H.
Novel adjuvants for induction of T-cell and antibody responses toencephalitogenic and regulatory determinants in Lewis rats.
Vaccine. 1998 Jan;16(1):99-108

Ascoli A 1902 Passiert Eiweiss die placentare Scheidewand?
Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. 36,. 8. 498

Asher MI, Weiland SK.
The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAACSteeriing Committee.
Clin Exp Allergy. 1998 Nov;28 Suppl 5:52-66

Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann I, Forster J,Bauer CP, Wahn V, Zepp F, Wahn U.
Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history.
Clin Exp Allergy. 1997 Jul;27(7):752-60

Beyer K, Hausler T, Kircher M, Nickel R, Wahn U, Renz H.
Specific V beta T cell subsets are associated with cat and birch pollen allergyin humans. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1186-91

Blumer N, Herz U, Wegmann M, Renz H.
Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airwayinflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimentalasthma. *Clin Exp Allergy*. 2005 Mar;35(3):397-402

Bonfert V, Cihak J, Losch U, Ziegler-Heitbrock HW.
Preferential expression of V beta gene families in CD8 memory cells of apparently healthy donors. *Cell Immunol*. 1995 Dec;166(2):165-71

Brami C.
Immunoregulatory aspects of placental function. *Presse Med*. 1985 Feb 23;14(8):479-83

Brandtzaeg P, Halstensen TS, Huitfeldt HS, Krajci P, Kvale D, Scott H,Thrane PS.
Epithelial expression of HLA, secretory component (poly-Ig receptor), and adhesion molecules in the human alimentary tract.
Ann N Y Acad Sci. 1992;664:157-79

Burton DA, Shepherd GM, Siskind GW, Posnett DN.
T cell receptor variable gene expression: analysis in ragweed-sensitive patients during allergen exposure.
Int Arch Allergy Appl Immunol. 1990;91(3):306-10

Chou YK, Morrison WJ, Weinberg AD, Dedrick R, Whitham R, Bourdette DN, Hashim G, Offner H, Vandenbark AA.
Immunity to TCR peptides in multiple sclerosis. II. T cell recognition of V beta 5.2 and V beta 6.1 CDR2 peptides.
J Immunol. 1994 Mar 1;152(5):2520-9.

Clark DA, Blois S, Kandil J, Handjiski B, Manuel J, Arck PC.
Reduced uterine indoleamine 2,3-dioxygenase versus increased TH1/TH2 cytokine ratios as a basis for occult and clinical pregnancy failure in mice and humans.
Am J Reprod Immunol. 2005 Oct;54(4):203-16

Clark DA.
Tolerance signaling molecules. *Chem Immunol Allergy*. 2005;89:36-48

Cleary TG.
Human milk protective mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 2004;554:145

Collins A, Littman DR.
Selection and lineage specification in the thymus: commitment 4-stalled.
Immunity. 2005 Jul;23(1):4-5

Craig TJ, McCann JL, Gurevich F, Davies MJ.
The correlation between allergic rhinitis and sleep disturbance.
J Allergy Clin Immunol. 2004 Nov;114(5 Suppl):S139-45

Dieli F, Asherson GL, Romano GC, Sireci G, Gervasi F, Salerno A.
IL-4 is essential for the systemic transfer of delayed hypersensitivity by Tcell lines. Role of gamma/delta cells.
J Immunol. 1994 Mar 15;152(6):2698-704

Dieli F, Ptak W, Sireci G, Romano GC, Potestio M, Salerno A, Asherson GL.
Cross-talk between V beta 8+ and gamma delta+ T lymphocytes in contactsensitivity. *Immunology*. 1998 Apr;93(4):469-77

Donckier V, Abramowicz D, Bruyns C, Florquin S, Vanderhaeghen ML, AmraouiZ, Dubois C, Vandenabeele P, Goldman M.
IFN-gamma prevents Th2 cell-mediated pathology after neonatal injection of semiallogenic spleen cells in mice.
J Immunol. 1994 Sep 15;153(6):2361-8.

Dong M, He J, Wang Z, Xie X, Wang H.
Placental imbalance of Th1- and Th2-type cytokines in preeclampsia.
Acta Obstet Gynecol Scand. 2005 Aug;84(8):788-93

Dorion BJ, Leung DY.
Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in peanut allergy.
Pediatr Allergy Immunol. 1995 May;6(2):95-7

Duchen K, Bjorksten B.
Total IgE levels in human colostrum.
Pediatr Allergy Immunol. 1996 Feb;7(1):44-7.

Fageras Bottcher M, Jenmalm MC, Garofalo RP, Bjorksten B.
Cytokines in breast milk from allergic and nonallergic mothers.
Int Arch Allergy Immunol. 1999 Feb-Apr;118(2-4):319-20

Guo X, Li W, Deng W, Ni P, Yu S, Li Y, Zhang H.
Restricted usage of repertoire of T-cell receptor V beta in Chinese asthmatics *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2002 Feb;25(2):78-80

Gutierrez G, Gentile T, Miranda S, Margni RA.
Asymmetric antibodies:a protective arm in pregnancy.
Chem Immunol Allergy. 2005;89:158-68

Halliday R.
The effect of steroid hormones on the absorption of antibody by the young rat.
J Endocrinol. 1959 Jan;18(1):56-66.

Hamada K, Suzaki Y, Goldman A, Ning YY, Goldsmith C, Palecanda A, Coull B, Hubeau C, Kobzik L.
Allergen-independent maternal transmission of asthma susceptibility.
J Immunol. 2003 Feb 15;170(4):1683-9.

Haynes BF, Martin ME, Kay HH, Kurtzberg J.
Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues.*J Exp Med*. 1988 Sep 1;168(3):1061-80.

Haynes BF, Singer KH, Denning SM, Martin ME.
Analysis of expression of CD2, CD3, and T cell antigen receptor molecules during early human fetal thymic development. *J Immunol.* 1988 Dec 1;141(11):3776-84.

Hayward AR, Ezer G.
Development of lymphocyte populations in the human foetal thymus and spleen. *Clin Exp Immunol*. 1974 May;17(1):169-78

Hayward AR.
Development of lymphocyte responses and interactions in the human fetus and newborn. *Immunol Rev*. 1981;57:39-60

Herz U, Braun A, Ruckert R, Renz H.
Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 1998 May;28(5):625-34

Herz U, Kammertoens T, Rosenbaum J, da Palma JC, Rimm I, Renz H.
Impact of V beta 8+/+ T cells on the development of increased airway reactivity and IgE production in SJL mice.
Eur J Immunol. 1999 Sep;29(9):3028-34

Herz U, Lumpp U, Da Palma JC, Enssle K, Takatsu K, Schnoy N, Daser A,Kottgen E, Wahn U, Renz
The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. *Immunol Cell Biol*. 1996 Apr;74(2):209-17

Herz U, Lumpp U, Daser A, Gelfand EW, Renz H.
Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. *Adv Exp Med Biol*. 1996;409:25-3

Herz U, Schnoy N, Borelli S, Weigl L, Kasbohrer U, Daser A, Wahn U, Kottgen E, Renz H.
A human-SCID mouse model for allergic immune response bacterial superantigen enhances inflammation and suppresses IgE production.
J Invest Dermatol. 1998 Mar;110(3):224-31

Holgate ST.
Science, medicine, and the future. Allergic disorders.
BMJ. 2000 Jan 22;320(7229):231-4

Holloway JA, Gudin AM.
Microenvironmental influences in atopic disease.
Clin Exp Allergy. 2000 Sep;30(9):1197-200

Holloway JA, Warner JO, Vance GH, Warner JA, Jones CA.
Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet*. 2000 Dec 2;356(9245):1900-

Holt PG, Batty JE, Turner KJ.
Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology*. 1981 Mar;42(3):409-17

Holt PG, Clough JB, Holt BJ, Baron-Hay MJ, Rose AH, Robinson BW, Thomas WR.
Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy*. 1992 Dec;22(12):1093-9

Holt PG, Jones CA.
The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy*. 2000 Aug;55(8):688-97

Holt PG, Rose AH, Batty JE, Turner KJ.
Induction of adjuvant-independent IgE responses in inbred mice: primary,secondary, and persistent IgE responses to ovalbumin and ovomucoid. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1981;65(1):42-50

Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE.
Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology*. 1996 Dec;89(4):573-8.

Jarrett EE, Hall E.
IgE suppression by maternal IgG. *Immunology*. 1983 Jan;48(1):49-58

Jin LP, Zhou YH, Wang MY, Zhu XY, Li DJ.
Blockade of CD80 and CD86 at the time of implantation inhibits maternal rejection to the allogeneic fetus in abortion-prone matings. *J Reprod Immunol*. 2005 Apr;65(2):133-46

Johansson SG.
Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet*. 1967 Nov 4;2(7523):951-3

Jones CA, Finlay-Jones JJ, Hart PH.
Type-1 and type-2 cytokines in human late-gestation decidual tissue. *Biol Reprod*. 1997 Aug;57(2):303-11

Jones CA, Holloway JA, Warner JO.
Does atopic disease start in foetal life? *Allergy*. 2000 Jan;55(1):2-10

Jones CA, Holt PG.
Immunopathology of allergy and asthma in childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Aug;162(2 Pt 2):S36-9

Jones CA, Kilburn SA, Warner JA, Warner JO.
Intrauterine environment and fetal allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*. 1998 Jun;28(6):655-9

Jones CA, Warner JA, Warner JO.
Fetal swallowing of IgE. *Lancet*. 1998 Jun 20;351(9119):1859

Karmaus W, Gangur V.
Does allo-immune reactivity play a role in the prenatal programming of childhood allergy? *Clin Exp Allergy*. 2005 Apr;35(4):405-7

Kerkhof M, Wijga A, Smit HA, de Jongste JC, Aalberse RC, Brunekreef B, Gerritsen J, Postma DS; PIAMA Study Group.
The effect of prenatal exposure on total IgE at birth and sensitization at twelve months and four years of age: The PIAMA study.
Pediatr Allergy Immunol. 2005 Feb;16(1):10-8

Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yokoyama Y.
Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 1998 Nov;28(11):1340-4.

Kristoffersen EK.
Human placental Fc gamma-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG. *APMIS Suppl*. 1996;64:5-36.

Latvala J, von Hertzen L, Lindholm H, Haahtela T.
Trends in prevalence of asthma and allergy in Finnish young men: nationwide study, 1966-2003. *BMJ*. 2005 May 21;330(7501):1186-7

Lehmann I, Thoelke A, Rehwagen M, Rolle-Kampczyk U, Schlink U, Schulz R, Borte M, Diez U, Herbarth O.
The influence of maternal exposure to volatile organic compounds on the cytokine secretion profile of neonatal T cells.
Environ Toxicol. 2002;17(3):203-10.

Lehmann I, Thoelke A, Weiss M, Schlink U, Schulz R, Diez U, Sierig G,Emmrich F, Jacob B, Belcredi P, Bolte G, Heinrich J, Herbarth O, Wichmann HE,Borte M.
T cell reactivity in neonates from an East and a West German city--results of the LISA study. *Allergy*. 2002 Feb;57(2):129-36.

Lewis DB, Larsen A, Wilson CB.
Reduced interferon-gamma mRNA levels in human neonates. Evidence for an intrinsic T cell deficiency independent of other genes involved in T cell activation.
J Exp Med. 1986 Apr 1;163(4):1018-23

Liebers V, Gellert B, Raulf-Heimsoth M, Baur X.
Does IL-4 play a role in the expansion of V beta 8a T cell receptor-bearing cells? *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 May;125(1):21-3

Lima C, Souza VM, Faquim-Mauro EL, Hoshida MS, Bevilacqua E, Macedo MS, Tavares-de-Lima W, Vargaftig BB.
Modulation of the Induction of Lung and Airway Allergy in the Offspring of IFN-{gamma}-Treated Mother Mice.
J Immunol. 2005 Sep 15;175(6):3554-9.

Lima C, Souza VM, Faquim-Mauro EL, Hoshida MS, Bevilacqua E, Macedo MS, Tavares-de-Lima W, Vargaftig BB.
Modulation of the Induction of Lung and Airway Allergy in the Offspring of IFN-{gamma}-Treated Mother Mice.
J Immunol. 2005 Sep 15;175(6):3554-9.

Lobach DF, Haynes BF.
Ontogeny of the human thymus during fetal development.
J Clin Immunol. 1987 Mar;7(2):81-97

MacKenzie NM, Keeler KD.
A flow microfluorimetric analysis of the binding of immunoglobulins to Fc gamma receptors on brush borders of the neonatal mouse jejunal epithelium. *Immunology*. 1984 Mar;51(3):529-33

Matijevic M, Urban RG.
Use of interferon-gamma ELISPOT in monitoring immune responses in humans. *Methods Mol Biol*. 2005;302:237-52

Mazzucchelli I, Avanzini MA, Ciardelli L, Pagani S, Greco R, Belloni C, Castellazzi A, Marconi M, Rondini G, Polatti F.
Human amniotic fluid cells are able to produce IL-6 and IL-8.
Am J Reprod Immunol. 2004 Mar;51(3):198-203

Miller DL, Hiravonen T, Gitlin D.
Synthesis of IgE by the human conceptus.
J Allergy Clin Immunol. 1973 Sep;52(3):182-8

Miller E, Jacombs B, Pollock TM.
Whooping-cough notifications. *Lancet*. 1980 Mar 29;1(8170):718

Miller ME, Levin L, Bernstein JA.
Characterization of a population of monozygotic twins with asthma.
J Asthma. 2005 Jun;42(5):325-30

Miyawaki T, Seki H, Taga K, Sato H, Taniguchi N.
Dissociated production of interleukin-2 and immune (gamma) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants.
Clin Exp Immunol. 1985 Feb;59(2):505-11

Mori A, Yamamoto K, Suko M, Watanabe N, Ito M, Miyamoto T, Okudaira H.
Interleukin-4 gene expression in high and low IgE responder mice.
Int Arch Allergy Appl Immunol. 1990;92(1):100-2

Mutius von, E, Martinez FD, Fritzsch C, Nicolai T , Thiemann HH.
Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany.
Am J Respir Crit Care Med. 1994 Feb;149(2 Pt 1):358-64

Mutius von, E.
Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jun;109(6 Suppl):S525

Neaville WA, Tisler C, Bhattacharya A, Anklam K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Adler K, Dasilva DF, Roberg KA et al.
Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life.
J Allergy Clin Immunol. 2003 Oct;112(4):740-6.

Nicolai T, Bellach B, Mutius EV, Thefeld W, Hoffmeister H.
Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany.
Clin Exp Allergy. 1997 Aug;27(8):886-92

Platts-Mills TA, Erwin EA, Allison AB, Blumenthal K, Barr M, Sredl D, Burge H, Gold
The relevance of maternal immune responses to inhalant allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first 2 years of life.
J Allergy Clin Immunol. 2003 Jan;111(1):123-30

Prescott SL, Holt PG.
Abnormalities in cord blood mononuclear cytokine production as a predictor of later atopic disease in childhood.
Clin Exp Allergy. 1998 Nov;28(11):1313-6.

Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG.
Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens:universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol*. 1998 May 15;160(10):4730-7.

Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG.
Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 1999 Jan 16;353(9148):196-200.

Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Loh R, Holt PG.
Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants. *Clin Exp Allergy*. 1998 Nov;28 Suppl 5:39-44

Prescott SL, Macaubes C, Yabuhara A, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Loh R, Sly PD, Holt PG.
Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life.
Int Arch Allergy Immunol. 1997 May-Jul;113(1-3):75-9.

Prescott SL.
Allergy: the price we pay for cleaner living?
Ann Allergy Asthma Immunol. 2003 Jun;90(6 Suppl 3):64-70.

Renz H, Bradley K, Gelfand EW.
Production of interleukin-4 and interferon-gamma by TCR-V beta-expressing T-cell subsets in allergen-sensitized mice.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1996 Jan;14(1):36-43

Renz H, Bradley K, Larsen GL, McCall C, Gelfand EW.
Comparison of the allergenicity of ovalbumin and ovalbumin peptide 323-339. Differential expansion of V beta-expressing T cell populations.
J Immunol. 1993 Dec 15;151(12):7206-13

Renz H, Saloga J, Bradley KL, Loader JE, Greenstein JL, Larsen G, Gelfand EW.
Specific V beta T cell subsets mediate the immediate hypersensitivity response to ragweed allergen. *J Immunol*. 1993 Aug 15;151(4):1907-17

Renz H.
The central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation.
Exp Dermatol. 1995 Aug;4(4 Pt 1):173-82

Renz H.
T cell receptor-V beta repertoire in allergen-specific sensitization and increased airway responsiveness. *Allergy*. 1995;50(25 Suppl):15-9

Rodewald R, Kraehenbuhl JP.
Receptor-mediated transport of IgG.
J Cell Biol. 1984 Jul;99(1 Pt 2):159s-164s

Sade K, Kivity S, Levy A, Fireman E.
The effect of specific immunotherapy on T-cell receptor repertoire in patientswith allergy to house-dust mite. *Allergy*. 2003 May;58(5):430-4

Sadeghnejad A, Karmaus W, Davis S, Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Arshad SH.
Raised cord serum immunoglobulin E increases the risk of allergic sensitisation at ages 4 and 10 and asthma at age 10.
Thorax. 2004 Nov;59(11):936-42

Seitzer U, Bussler H, Kullmann B, Petersen A, Becker WM, Ahmed J.
Mouse strain specificity of the IgE response to the major allergens of Phleum pratense. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 Apr;136(4):347-55.

Selassie FG, Stevens RH, Cullinan P, Pritchard D, Jones M, Harris J, Ayres JG, Newman Taylor AJ.
Total and specific IgE (house dust mite and intestinal helminths) in asthmatics and controls from Gondar, Ethiopia. *Clin Exp Allergy*. 2000 Mar;30(3):356-8

Settipane RA.
Complications of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 1999 Jul-Aug;20(4):209-13

Simister NE, Rees AR.
Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol*. 1985 Jul;15(7):733-8

Simons FE, Gerstner TV, Cheang MS.
Tolerance to the bronchoprotective effect of salmeterol in adolescents with exercise-induced asthma using concurrent inhaled glucocorticoid treatment. *Pediatrics*. 1997 May;99(5):655-9

Szepfalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R, Herkner K, Urbanek R.
Prenatal allergen contact with milk proteins.
Clin Exp Allergy. 1997 Jan;27(1):28-35

Taneja V, David CS.
HLA class II transgenic mice as models of human diseases.
Immunol Rev. 1999 Jun;169:67-79

Tariq SM, Arshad SH, Matthews SM, Hakim EA.
Elevated cord serum IgE increases the risk of aeroallergen sensitization without increasing respiratory allergic symptoms in early childhood.
Clin Exp Allergy. 1999 Aug;29(8):1042-8

Tassignon J, Burny W, Dahmani S, Zhou L, Stordeur P, Byl B, De Groote D.
Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid:Comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR.
J Immunol Methods. 2005 Oct 30;305(2):188-98

Thornton CA, Holloway JA, Popplewell EJ, Shute JK, Boughton J, Warner JO.
Fetal exposure to intact immunoglobulin E occurs via the gastrointestinal tract. *Clin Exp Allergy*. 2003 Mar;33(3):306-11

Tu Y, Salim S, Bourgeois J, Di Leo V, Irvine EJ, Marshall JK, Perdue MH.
CD23-Mediated IgE Transport Across Human Intestinal Epithelium: Inhibition by Blocking Sites of Translation or Binding.
Gastroenterology. 2005 Sep;129(3):928-40.

Uthoff H, Spenner A, Reckelkamm W, Ahrens B, Wolk G, Hackler R, Hardung F, Schaefer J, Scheffold A, Renz H, Herz U.
Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates.
J Immunol. 2003 Oct 1;171(7):3485-92

Van de Perre P.
Transfer of antibody via mother's milk.
Vaccine. 2003 Jul 28;21(24):3374-6.

van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YC, Souverijn JH et al.
Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren.
J Infect Dis. 2004 Mar 1;189(5):892-900

van der Velden VH, Laan MP, Baert MR, de Waal Malefyt R, Neijens HJ, Savelkoul HF.
Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jul;31(7):997-1006

Victor JR Jr, Fusaro AE, Duarte AJ, Sato MN.
Preconception maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring.
J Allergy Clin Immunol. 2003 Feb;111(2):269-77

Wahn U, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bauer CP.
The natural course of sensitisation and atopic disease in infancy and childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(10 Suppl):16-20

Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, Guggenmoos-Holzmann I.
Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jun;99(6 Pt 1):763-9

Wahn U.
Immunotherapy in children. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002 Dec;2(6):557-60.

Warner JA, Jones CA, Jones AC, Miles EA, Francis T, Warner JO.
Immune responses during pregnancy and the development of allergic disease.*Pediatr Allergy Immunol*. 1997;8(10 Suppl):5-10

Warner JA, Jones CA, Jones AC, Warner JO.
Prenatal origins of allergic disease.
J Allergy Clin Immunol. 2000 Feb;105(2 Pt 2):S493-8

Warner JA, Miles EA, Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO.
Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema?
Clin Exp Allergy. 1994 May;24(5):423-30

Warner JA, Warner JO.
Early life events in allergic sensitisation. *Br Med Bull*. 2000;56(4):883

Warner JA.
Controlling indoor allergens.
Pediatr Allergy Immunol. 2000 Nov;11(4):208-19

Warner JO, Jones CA, Kilburn SA, Vance GH, Warner JA.
Pre-natal sensitization in humans.
Pediatr Allergy Immunol. 2000;11 Suppl 13:6-8

Wegmann M, Renz H.
Animal models of experimental asthma.
Ernst Schering Res Found Workshop. 2005;(50):69-87

Weiss KB, Sullivan SD, Lyttle CS.
Trends in the cost of illness for asthma in the United States, 1985-1994.
J Allergy Clin Immunol. 2000 Sep;106(3):493-9

Whincup PH, Cook DG, Strachan DP, Papacosta O.
Time trends in respiratory symptoms in childhood over a 24 year period.
Arch Dis Child. 1993 Jun;68(6):729-34

Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE.
Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Dec 5;92(25):11931-4

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Guido Wölk
Wohnhaft in	27777 Ganderkesee
Geburtsdatum:	24. Mai 1978

Schulausbildung

1984 – 1988	Grundschule
1988 – 1990	Orientierungsstufe
1990 – 1997	Gymnasium Ganderkesee
1997	Abitur

Militärische Ausbildung

1997	Einstellung als Sanitätsoffizieranwärter der Marine
1997-1998	Militärische Ausbildung zum Offizier
2001	Beförderung zum Leutnant zur See
2004	Beförderung zum Stabsarzt

Medizinische Ausbildung

April 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
März 2000	Ablegen der ärztlichen Vorprüfung
März 2001	Ablegen des 1. Staatsexamens
März 2003	Ablegen des 2. Staatsexamens
April- Aug. 2003	Abteilung für Chirurgie, Tripler Army Medical Center, Honolulu, USA
Aug.- Nov. 2003	Abteilung für Innere Medizin, Hospital Naval, Rio de Janeiro, Brasilien
Dez.- März 2003	Abteilung für HNO, Kantonspital Luzern, Luzern, Schweiz
Juni 2004	Ablegen des 3. Staatsexamens Gesamtstudiennote 1,83
Seit 06.07. 2004	Assisstenzarzt im Bundeswehrzentralkrankenhaus Koblenz, Abteilung für HNO

Famulaturen und Praktisches Jahr

28.08. – 09.10.00	Abteilung für Chirurgie am Bundeswehrkrankenhaus in Bad Zwischenahn
27.08. – 01.10.01	Abteilung für Innere Medizin am Bundeswehrkrankenhaus Hamburg
11.02. – 03.03.02	Abteilung für Orthopädie im Klinikum der Phillipps-Universität Marburg
04.03. – 07.04.02	Praxis für Orthopädie Dres. Hildner & Hufeland, Marburg
15.07. – 12.08.02	Abteilung für Plastische Chirurgie, Tripler Army Medical Center, Honolulu, USA
13.07. – 06.09.02	Abteilung für Gynäkologie, Tripler Army Medical Center, Honolulu
April- Aug. 2003	Abteilung für Chirurgie, Tripler Army Medical Center, Honolulu, USA
Aug.- Nov. 2003	Abteilung für Innere Medizin, Hospital Naval, Rio de Janeiro, Brasilien
Dez.- März 2003	Abteilung für HNO, Kantonspital Luzern, Luzern, Schweiz

Promotion

Oktober 2000	Beginn der experimentellen Doktorarbeit im Fach Immunologie mit dem Thema „Beeinflussung der Allergieentstehung durch genetische und umweltbedingte Einflüsse im Mausmodell “
August 2001	Ende des experimentellen Teils der Doktorarbeit

Sprachen

Englisch	fließend in Sprache und Schrift Juli 2002 Certificate in Cambridge English (grade A)
Portugiesisch	gute Kentnisse
Latein	Latinum

VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren:

In Marburg:
Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Daut, Fruhstorfer, Gemsa, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Grzeschik, Happle, Herz, Hasilik, Hilgermann, Hoffmann, Huffmann, Joseph, Kälble, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Lang, Lennartz, Lorenz, Maisch, Mennel, Moosdorf, Mueller, Oertel, Renz, Radsak, Remschmidt, Rothmund,Schäfer, Schachtschabel, Seitz, Slenczka, Steiniger, Sturm, Vohland, Voigt, Walter,Wagner, Weihe, Wesemann, v. Wichert

In Honolulu:
Barcia, Chung, Goldhammer, Heetderks, Johnson

In Rio de Janeiro:
Monteiro

In Luzern:
Linder

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Renz angefertigt, dem ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, seiner stetigen Unterstützung und guten Betreuung danken möchte. Insbesondere seine moralische Unterstützung wie auch die Möglichkeit kurzfristig Probleme zu diskutieren waren mit ausschlaggebend für den Erfolg dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich PD Dr. Udo Herz für sein immenses und unermüdliches Engagement. Seine hervorragenden wissenschaftlichen Ratschläge, der Zuspruch in schwierigen Situationen, vor allem aber seine angenehme menschliche Art haben mich als Doktorand immer begleitet. Für die die unendliche Geduld und konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts danke ich besonders.

Ein besonders herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Renz, sowie die Mitarbeiter des Labors für die starke praktische und technische Unterstützung, sowie die zahlreichen Tipps und jederzeitige Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, im besonderen meinem Vater, Hans-Peter Wölk, ohne dessen jahrelange Unterstützung und absolute Zuverlässigkeit diese Arbeit und mein erfolgreiches Studium nicht möglich gewesen wären.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Beeinflussung der Allergieentstehung durch genetische und umweltbedingte Faktoren im Mausmodell“ in der Abteilung für Laboratoriumsmedizin und Molekulare Diagnostik unter Leitung von Prof. Dr. med. Harald Renz mit Unterstützung durch PD Dr. rer. nat. Udo Herz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit oder wird in der Universitätsbibliothek veröffentlicht.

Marburg, den

Guido Wölk