

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

und

aus dem Institut für Epidemiologie der GSF

Vorstand: Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann

**Chemokinrezeptorexpression peripherer T-Helferzellen im Zusammenhang mit
Klinik und Pathogenese atopischer Erkrankungen bei Kindern**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Zecher

aus

Stuttgart

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Mitberichterstatter:	PD. Dr. med. R. Gruber PD Dr. med. R. Rupec
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. S. Krauss-Etschmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	25.11.2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Das T _H 1-/ T _H 2-Modell in der Pathogenese allergischer Erkrankungen	9
1.2. Die Hygiene Hypothese	10
1.3. Chemokinrezeptoren	11
2. Zielsetzung der Arbeit.....	13
3. Probanden, Methoden und Material	14
3.1. Probandencharakterisierung und Datenerhebung im Rahmen der LISA-Studie	14
3.2. Isolation von PBMC aus Vollblut.....	14
3.3. Einfrieren und Auftauen der PBMC.....	15
3.4. Herstellung hochangereicherter CD4 ⁺ -Lymphozytenpopulationen	15
3.5. Durchflusszytometrie (FACS)	17
3.6. RNA-Isolation	18
3.7. cDNA-Synthese	19
3.8. Polymerase Kettenreaktion.....	20
3.8.1. Quantitative RT-PCR.....	21
3.8.1.1. SYBR-Green I auf dem LightCycler	21
3.8.1.1.1. Haushaltsgen und Primer	23
3.8.1.1.2. Durchführung.....	24
3.8.1.1.3. PCR Mix.....	24
3.8.1.1.4 PCR Protokoll.....	25
3.8.1.1.5 Auswertung.....	27
3.8.1.2 Hybridisierungssonden auf dem ABI PRISM 7700 (TaqMan)	28

3.8.1.2.1	Haushaltsgen und Primer	28
3.8.1.2.2	Durchführung.....	28
3.8.1.2.3	PCR-Protokoll.....	29
3.8.1.2.4	Auswertung.....	29
3.8.1.3	PCR - Kontrollreaktionen	30
3.8.1.4	Gelelektrophorese	30
3.9	Statistische Auswertung.....	30
3.10	Material	32
3.10.1	Geräte	32
3.10.2	Verbrauchsmaterialien.....	32
3.10.2.1	Glas- und Plastikmaterial, Zellanreicherung.....	32
3.10.2.2	Chemikalien	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Probandencharakterisierung und Gruppengrößen.....	34
4.2	Ergebnisse der serologischen Tests.....	35
4.2.1	Nabelschnur-IgE.....	35
4.2.2	Gesamt Serum-IgE im Alter von zwei Jahren	35
4.2.3	Sensibilisierung	35
4.2.4	Allergentestung in der Muttermatratze	36
4.2.4.1	Hausstaubmilben- und Katzenallergene.....	36
4.2.4.2	Endotoxingehalt.....	37
4.3	Probenverarbeitung	38
4.3.1	Herstellung und Reinheitsüberprüfung der hochangereicherten CD4 ⁺ -Subpopulationen.....	39
4.3.2	Quantitative RT-PCR.....	39

4.3.2.1	PCR - Kontrollreaktionen	39
4.3.2.1.1	Intra-Assay Variabilität.....	39
4.3.2.1.2	Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese.....	41
4.4	Quantitative Ergebnisse der einzelnen Marker.....	43
4.4.1	IL-4 und IFN- γ	43
4.4.2	CCR3	44
4.4.3	CCR4	44
4.4.4	CXCR3	45
4.4.5	CCR5	45
4.5	Zusammenhang der einzelnen Marker untereinander	45
4.5.1	Zusammenhang von IFN- γ mit CCR4, CCR5 und CXCR3	46
4.5.2	Zusammenhang der Chemokinrezeptoren untereinander	47
4.6	Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit klinischen Parametern	48
4.6.1	Elterliche Atopie	48
4.6.2	Atopische Dermatitis.....	49
4.6.3	Wheezing	50
4.6.4	Nabelschnur- und Serum-IgE.....	50
4.6.5	Sensibilisierung	51
4.6.6	Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit der Exposition.....	52
4.6.6.1	Hausstaubmilben- und Katzenallergene.....	52
4.6.6.2	Endotoxin	52
5.	Diskussion	54
5.1	Probanden.....	54
5.2	Real-time RT-PCR auf dem LightCycler	54

5.3	Quantitative Ergebnisse der einzelnen Marker.....	56
5.3.1	IFN- γ	56
5.3.2	CCR3.....	57
5.3.3	CCR4.....	58
5.3.4	CXCR3 und CCR5.....	59
5.4	Zusammenhang der molekularbiologischen Marker untereinander.....	59
5.5	Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit klinischen Parametern	61
5.5.1	Elterliche Atopie	61
5.5.2	Atopische Dermatitis.....	62
5.5.3	Wheezing.....	63
5.5.4	IgE	64
5.6	Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit der Exposition.....	65
5.6.1	Hausstaubmilben- und Katzenallergene.....	66
5.6.2	Endotoxin	67
6	Zusammenfassung	68
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Anhang.....	80
8.1	Experimentelle Rohdaten	80
8.2	Klinische Rohdaten.....	82
8.3	Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit klinischen Parametern	84
8.4	Auszug aus dem 2-Jahres Fragebogen der LISA-Studie	85
9.	Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
APC	Allophycocyanin
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CI	Konfidenzintervall
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
C _t	Threshold Cycle
Der f1	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Der p1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum
Fel d1	<i>Felis domesticus</i>
FITS	Fluorescein Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GM	Geometrisches Mittel
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IL-	Interleukin
IP-10	Interferon- γ inducible 10 kDa Protein
I-TAC	Interferon-inducible T-Cell α -Chemoattractant
LPS	Lipopolysaccharide
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MDC	Macrophage Derived Chemokine
MiP	Macrophage Inducible Protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
PBMC	Periphere Mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Saline

PMA	Phorbol Myristat Acetat
RANTES	Regulated on Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Flüssigmedium
SD	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethyl-Rhodamin
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
TGF	Tumor Growth Factor
T _H	T-Helfer (Zelle)
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Nekrose Factor

1. Einleitung

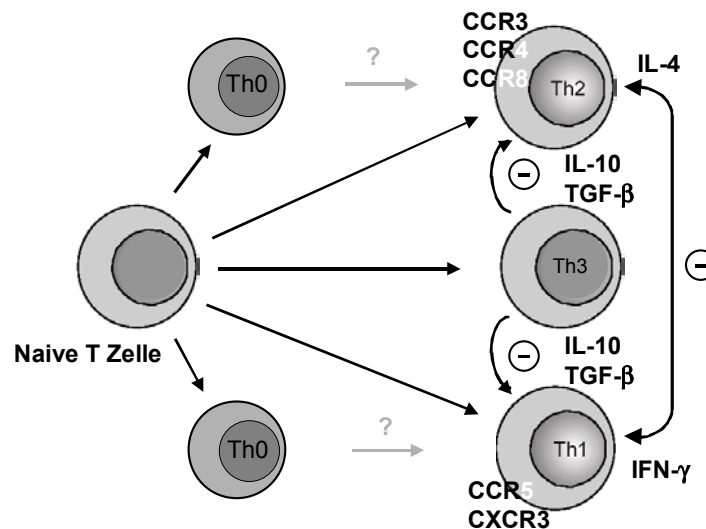
1.1. Das T_H1-/ T_H2-Modell in der Pathogenese allergischer Erkrankungen

Die Konfrontation des menschlichen Organismus mit einem Antigen löst abhängig von dessen Struktur, dem Zeitpunkt⁴², der Dosis²³ und dem Ort des Kontakts⁶⁴ eine spezifische Immunantwort aus. Nach den jeweils daran beteiligten T_H-Zellen werden diese T_H1- und T_H2-Antworten genannt, welche wahrscheinlich die Extreme eines breiten Spektrums an möglichen Immunantworten darstellen. T_H1- und T_H2-Zellen können aufgrund des von ihnen sezernierten Zytokinmusters voneinander unterschieden werden. T_H1-Lymphozyten produzieren IFN- γ und IL-2 als Antwort auf intrazelluläre Pathogene und induzieren eine vorwiegend zellulär vermittelte Immunreaktion⁴⁴. T_H2-Zellen synthetisieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, wodurch es zur Aktivierung von Mastzellen und zur Ausreifung von eosinophilen und basophilen Granulozyten kommt⁹⁴. Zusammen mit weiteren kostimulatorischen Signalen wird durch IL-4 der Isotypenwechsel zu IgE in B-Lymphozyten induziert⁶¹. Diesem Schritt wird eine zentrale Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen beigemessen. Darüber hinaus werden T_H0-Zellen beschrieben, die man aufgrund des von ihnen sezernierten Zytokinmusters weder dem T_H1- noch dem T_H2-Phänotyp zuordnen kann. Hierbei ist noch unklar, ob es sich dabei um Vorläuferzellen, oder eine eigene Zelllinie handelt. Die Populationen der T_H3- und regulatorischen T-Zellen sind über die von ihnen sezernierten Zytokine TGF- β und IL-10 an der Induktion von Toleranz gegenüber Selbst- und Fremdanitigenen beteiligt¹¹⁸. Ihre funktionelle Beeinträchtigung könnte durch eine fehlende Toleranzentwicklung gegenüber körperfremden Antigenen ebenfalls eine Rolle in der Genese allergischer Erkrankungen spielen^{16,35,96,110}. T_H1- und T_H2-Zellen befinden sich im gesunden Organismus in einem funktionellen Gleichgewicht. Dominiert einer der beiden Zelltypen, oder besteht ein funktioneller Defekt innerhalb der regulatorischen T-Zellpopulation, kann der Zusammenbruch dieses Gleichgewichts z.B. zu Autoimmunkrankheiten (T_H1) oder Krankheiten des atopischen Formenkreises (T_H2) führen. Das T_H1-/T_H2-Modell wurde im hochspezialisierten Mausmodell häufig unter Verwendung von T-Zellklonen etabliert. Auf den Menschen übertragen zeigt sich oft eine weniger klare Polarisierung, dennoch ist das Modell zur Charakterisierung humaner Immunantworten allgemein anerkannt (Abb. 1).

In Neugeborenen wurde ein physiologisches Ungleichgewicht zwischen T_H1- und T_H2-Zellen zugunsten IL-4 produzierender T_H-Zellen gefunden⁸⁶. Dies wird zum einen als Schutz des mütterlichen Organismus vor dem Plazenta-toxischen IFN- γ interpretiert⁸², zum anderen auf eine fehlende Ausreifung antigenpräsentierender Zellen zurückgeführt. Es wird spekuliert,

dass im gesunden Organismus mikrobielle Stimuli zu einer Ausreifung immunkompetenter Zellen in den ersten Lebensjahren führen, und so die Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen induzieren⁴¹.

Abb. 1: T_H -Zellen



1.2. Die Hygiene Hypothese

Sowohl Prävalenz als auch Schweregrad atopischer Erkrankungen haben in den letzten Jahrzehnten in den westlichen Industrienationen deutlich zugenommen^{40,113}. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bietet die Hygiene Hypothese¹⁰⁶: Dieses erstmals von Strachan et al. vorgeschlagene Modell beruht auf der Überlegung, dass die verbesserten hygienischen Bedingungen eines „westlichen Lebensstils“ zu einer verminderten Interaktion des menschlichen Organismus mit den ihn normalerweise umgebenden Mikroorganismen führen. Weiter wird postuliert, dass eine durch mikrobielle Infektionen induzierte T_H1 -Antwort die Ausbildung eines T_H2 -dominanten Phänotyps verhindert kann⁶⁴. Die Ergebnisse mehrerer epidemiologischer Studien stehen hiermit in Einklang. So wurde eine inverse Korrelation zwischen durchgemachten Tuberkulose-⁴⁵, Masern-¹⁰¹ und Hepatitis A-⁶⁵ Infektionen und atopischen Erkrankungen beobachtet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass anthroposophisch erzogene Kinder seltener Allergien entwickelten³. Dies wurde unter anderem auf die verminderte Einnahme von Antibiotika und den vermehrten Genuss fermentierter, und damit lebende Bakterien enthaltende, Nahrung zurückgeführt. Der Konfrontation des frühkindlichen Verdauungstrakts mit bakteriellen Antigenen und der damit verbundenen Stimulation einer T_H1 -Antwort bei gleichzeitiger Toleranzentwicklung

gegenüber diesen Antigenen wird derzeit große Bedeutung bei der Atopieentstehung beigemessen. Unterstützt wurde dies durch die Beobachtung, dass die perinatale Gabe probiotischer Bakterien bei finnischen Kindern die Entstehung einer atopischen Dermatitis um 50% verringern konnte^{46,47}. Neben der Auseinandersetzung mit probiotischen Bakterien wird der protektive Effekt einer frühen Exposition mit Endotoxin und bakteriellen Lipopolysacchariden diskutiert. Diese Substanzen sind hoch immunogene Bestandteile der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien. Bei Kindern, die auf dem Bauernhof aufwuchsen, und damit über den frühen Kontakt zu Tieren stark mit Endotoxin in Berührung kamen, wurde eine deutlich niedrigere Inzidenz von allergischer Rhinitis und atopischer Dermatitis festgestellt¹³. In Einklang mit oben genannten Beobachtungen stehen durch *in vitro* Experimente erhaltene Ergebnisse, die einem Zusammenhang des in der Wohnung gemessenen Endotoxingehalts mit der Anzahl IFN- γ produzierender T_H1-Zellen im peripheren Blut von Kindern zeigen konnten³².

1.3. Chemokinrezeptoren

Bei Chemokinen handelt es sich um chemotaktische Zytokine, die an der Steuerung von Zellwanderungsprozessen beteiligt sind. T_H-Zellen wandern entlang eines Konzentrationsgradienten bestimmter Chemokine durch den Blutstrom. Die funktionelle Interaktion der Chemokine mit den T_H-Zellen erfolgt hierbei über Rezeptoren, welche sieben transmembranöse Domänen aufweisen, und zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören⁶⁸. Abhängig von der Konzentration der Chemokine und dem Aktivitätszustand der Zellen – damit der Expressionsdichte der entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche - kommt es zur Induktion einer Integrin-vermittelten Adhäsion an Gefäßwandendothel⁸⁴ und schließlich zur Einwanderung der T_H-Zellen in das Zielgewebe. Derzeit sind 50 Chemokine und 19 Chemokinrezeptoren beschrieben⁸⁸. Die Klassifikation der Chemokine erfolgt hierbei in Abhängigkeit von der Position der ersten vier Cysteine am N-Terminus der Moleküle in vier Gruppen: C-, CC-, CXC-, und CX3C-Chemokine, wobei X stellvertretend für das Vorhandensein weiterer Aminosäuren steht. Die Nomenklatur der Rezeptoren ist analog zu ihren Liganden⁶⁸. Zahlreiche Arbeiten deuten darauf hin, dass T_H1- und T_H2-Zellen durch die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren voneinander differenziert werden können. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4, CCR5 und CXCR3. CXCR3- und CCR5-mRNA werden vorwiegend von T_H1-Zellen exprimiert⁸⁹. *In vitro* werden T_H1-Zellen durch die CXCR3-Liganden IP-10, Mig und I-TAC sowie die CCR5-Liganden RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β

chemotaktisch angelockt¹⁰⁴. *In vivo* ist eine erhöhte Expression dieser Chemokinrezeptoren bei Multipler Sklerose⁶, Rheumatoider Arthritis⁸⁹ und Hepatitis C¹⁰² als Vertreter T_H1-assoziiierter Krankheiten, beschrieben. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit multipler Sklerose eine vermehrte Oberflächenexpression von CCR5 und CXCR3 auf T-Zellen in peripherem Blut im Vergleich zu T-Zellen gesunder Probanden nachgewiesen werden⁶. Der CCR3-Ligand Eotaxin ist an der Chemotaxis eosinophiler Granulozyten beteiligt. Der Rezeptor wurde auf einer Subpopulation von T_H2-Zellen gefunden⁹⁸ und ließ sich in bronchialen Biopsien von Asthmatikern und in Biopsien bei atopischer Dermatitis nachweisen^{79,121,124}. CCR4 wird *in vitro*²¹ und *ex vivo*⁷⁹ ebenfalls bevorzugt auf Zellen vom T_H2-Typ exprimiert. Ebenso fanden sich signifikant mehr CCR4-positive T_H-Zellen in peripherem Blut erwachsener Patienten mit atopischer Dermatitis als in gesunden Kontrollen⁷⁶. Arbeiten zum Zusammenhang der peripheren Chemokinrezeptorexpression auf T_H1-/T_H2-Zellen mit der klinischen Manifestation atopischer Erkrankungen bei Kindern fehlen bislang. Es existieren Arbeiten, welche die Serumkonzentration der CCR4-Liganden TARC und MDC oder des CCR5-Liganden RANTES mit dem Schweregrad einer atopischen Dermatitis^{55,58} oder von Asthma⁵⁷ bei Kindern verglichen haben. Hierbei blieb die zelluläre Herkunft der Chemokine unberücksichtigt, und aufgrund der Promiskuität der Chemokine bzgl. ihrer Rezeptoren⁶⁸ lassen diese Arbeiten keine direkten Rückschlüsse auf die Chemokinrezeptorexpression zu.

Zytokine werden in unstimulierten peripheren T_H-Zellen nur in geringen Mengen exprimiert. Darüber hinaus steht bei der Arbeit mit Kinderblut nur eine limitierte Menge an Material zur Verfügung. Dies hat in bisherigen Arbeiten oft dazu geführt, dass zum molekularbiologischen Nachweis der Zytokine entweder T_H1- und T_H2-Zelllinien herangezogen, oder Zellen *ex vivo* mit unphysiologischen Stimuli behandelt wurden^{21,59,97,98}. Auch die oben skizzierte Zugehörigkeit bestimmter Chemokinrezeptoren zum T_H1-/T_H2-Phänotyp wurde in erster Linie durch *in vitro* Stimulationsexperimente etabliert. Hierdurch kann eine Verfälschung der *in vivo* Situation nicht ausgeschlossen werden. Neuere Arbeiten, die ohne *in vitro* Stimulation arbeiteten, kamen zu kontroversen Ergebnissen hinsichtlich einer klaren Zuordnung oben genannter Chemokinrezeptoren zum T_H1-/ T_H2-Modell^{5,17,74,120}.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der quantitativen real-time RT-PCR bot die Möglichkeit, mit hoher Sensitivität geringe Mengen an mRNA nachzuweisen. Hierdurch konnte auf eine der Analyse vorangestellte *in vitro* Stimulation verzichtet, und die *in vivo* Situation weitgehend unverzerrt wiedergegeben werden.

2. Zielsetzung der Arbeit

Im Kleinkindesalter sind die bisher in der Allergiediagnostik eingesetzten Parameter wie Prick-Test oder RAST oft nur bedingt aussagekräftig²⁰. Ebenso ist bei Kindern mit entzündlichen Atemwegserkrankungen die Differenzierung zwischen einer Virusinfektion und dem Beginn von allergischem Asthma nicht ohne Weiteres möglich⁴⁹. Aufgrund der unterschiedlichen therapeutischen Vorgehensweise wäre ein leicht erhältlicher Marker, beispielsweise in Form eines in peripherem Blut nachweisbaren Chemokinrezeptors, zur Frühdiagnose einer atopischen Prädisposition sowie zur Charakterisierung des immunologischen Phänotyps in diesem Alter wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurde folgende Hypothese aufgestellt:

T_H1- und T_H2-Lymphozyten lassen sich durch die Expression unterschiedlicher Chemokinrezeptoren in peripherem Blut eines Normalkollektivs differenzieren.

Diese Hypothese sollte in einem Pilotprojekt an zweijährigen Probanden der LISA-Studie (Einfluss von Lebensstilfaktoren auf die Entwicklung des Immunsystems und Allergien) überprüft werden.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

- Lassen sich in peripherem Blut T_H1- und T_H2-assoziierte Zytokine und Chemokinrezeptoren ohne vorherige Stimulation mit der quantitativen real-time RT-PCR nachweisen?
- Falls ja, lässt sich anhand der Zytokine und Chemokinrezeptoren ein T_H1- oder T_H2-typisches Expressionsmuster peripherer T-Helferzellen erkennen?
- Korrelieren Chemokinrezeptoren mit der Diagnose atopische Dermatitis, mit der Familienanamnese hinsichtlich atopischer Erkrankungen, oder anderen in der Allergiediagnostik eingesetzten Parametern?
- Korreliert die Endotoxinexposition in den ersten Lebensmonaten mit einem der potentiellen T_H1-Marker?

3. Probanden, Methoden und Material

3.1. Probandencharakterisierung und Datenerhebung im Rahmen der LISA-Studie

Im Rahmen der LISA Studie (Einfluss von Lebensstilfaktoren auf die Entwicklung des Immunsystems und Allergien) wurde zwischen Januar 1998 und Januar 1999 eine Geburtskohorte in Leipzig und München rekrutiert. Für die vorliegende Arbeit wurden Proben aus der Münchener Kohorte verwendet. Soziodemographische Daten sowie Angaben zur atopischen Familienanamnese wurden zwischen der Geburt und dem Alter von zwei Jahren anhand eines standardisierten Fragebogens erhoben. Drei Monate nach der Geburt wurde in einem standardisierten Verfahren Hausstaub von den mütterlichen Matratzen gesammelt (siehe bei²⁵). Darin wurde der Gehalt an Endotoxin sowie an Hausstaubmilben- (Der p1 und Der f1) und Katzenallergenen (Fel d 1) mittels des Limulus Amoebocyten Lysat Testes quantifiziert (in³⁰). Das Gesamt-IgE wurde im Nabelschnurblut bestimmt, und erneut im Serum im Alter von zwei Jahren. Zu diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls die Sensibilisierung gegen häufig vorkommende Allergene (siehe 4.2) mittels eines RAST ermittelt⁸. Mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens wurde festgestellt, bei welchen der Kinder in den ersten zwei Lebensjahren „Anfälle mit pfeifenden oder keuchenden Geräuschen im Brustkorb über mehr als drei Tage“ (*wheezing*) aufgetreten waren. Ebenso wurde nach Symptomen einer atopischen Dermatitis - Auftreten von mehr als vierzehntägigem, juckenden Hautausschlag in Gesicht, Hals und im Bereich der Beugeseiten der Extremitäten - gefragt. Gleichzeitig wurden Daten darüber erhoben, bei welchen der Kinder bereits von einem Arzt die Diagnose einer atopischen Dermatitis gestellt worden war. Alle oben genannten Daten wurden von der „LISA“-Studiengruppe (siehe in³⁰) erhoben und für die vorliegenden Doktorarbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

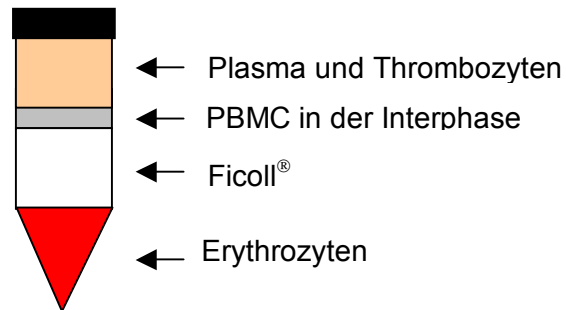
3.2. Isolation von PBMC aus Vollblut

Im Rahmen der Studie wurde den Kindern durch Venenpunktion heparinisieretes Vollblut abgenommen und am selben Tag fraktioniert. Ein Teil des Vollblutes wurde unmittelbar nach der Blutentnahme durchflusszytometrisch untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden aus der zweiten Fraktion periphere mononukleäre Zellen isoliert.

Die Isolation erfolgte über einen Dichtegradienten. Entsprechend der untenstehenden Graphik befanden sich nach Zentrifugation des Vollbluts Erythrozyten und Granulozyten am

Boden des Gefäßes, während die PBMC in der Interphase angereichert waren. In der oberen Phase verblieben das Plasma und die Thrombozyten.

Abb. 1: Isolation PBMC



Durchführung:

Das Vollblut wurde mit PBS im Verhältnis 1:3 verdünnt, auf Ficoll-Hypaque® in ein 15 ml Tube geschichtet und anschließend zentrifugiert (20 min, 2600 rpm). Daraufhin wurde die PBMC-haltige Interphase mittels einer Glaspipette abgenommen und die Zellsuspension zweimal in PBS gewaschen (10 min, 1300 rpm).

3.3. Einfrieren und Auftauen der PBMC

Um die PBMC zu einem späteren Zeitpunkt weiter verarbeiten zu können, wurden sie eingefroren.

Durchführung:

Die Zellen wurden pelletiert und anschließend in 1 ml kaltem (4°C) FCS + 10% DMSO resuspendiert, in Cryotubes transferiert, und diese sofort bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die gefrorenen Proben nach kurzem Antauen in 10 ml RPMI +10% FCS aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 1300 rpm). Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS für die nachfolgende Zellanreicherung aufgenommen.

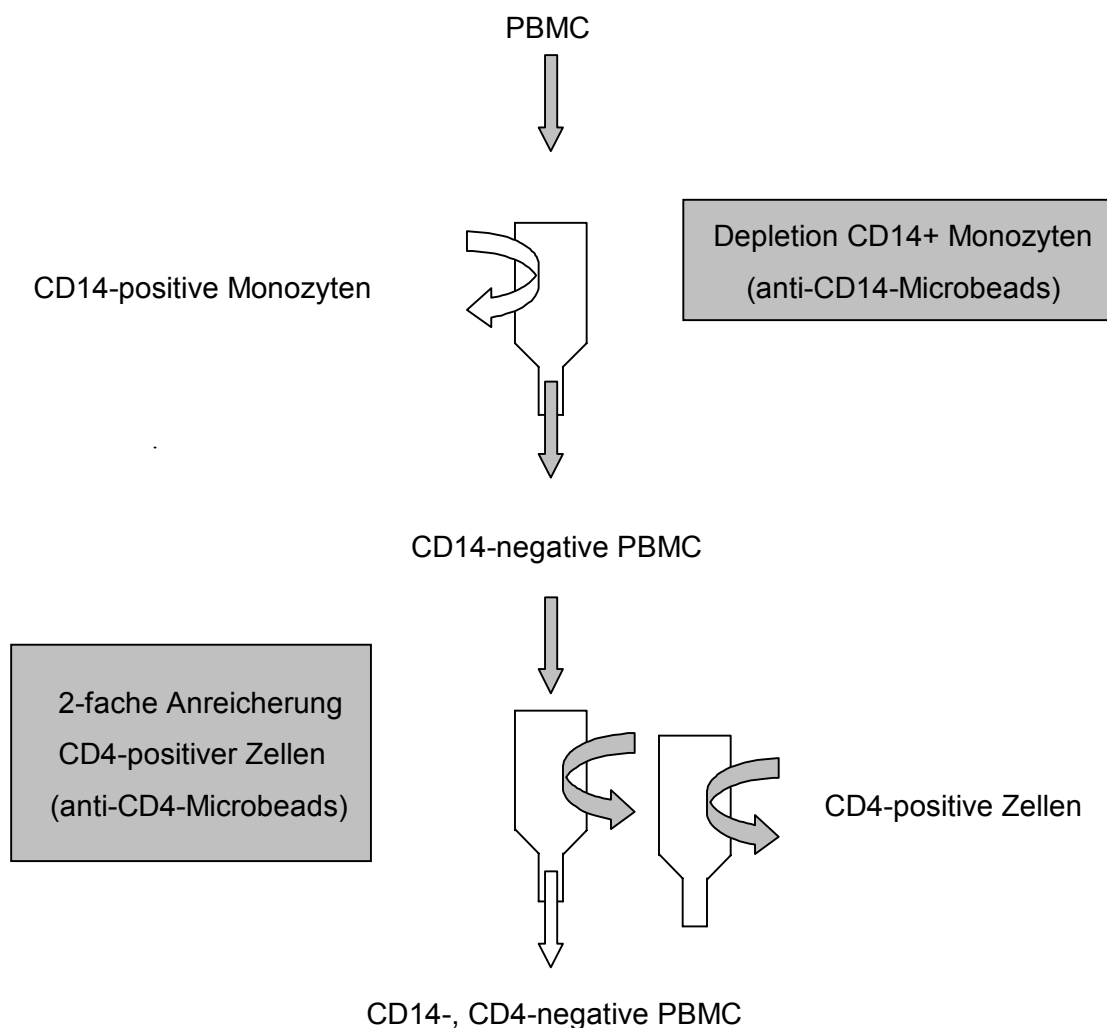
3.4. Herstellung hochangereicherter CD4⁺-Lymphozytenpopulationen

Zum Herstellen von hochangereicherten CD4⁺-T-Zell-Fractionen wurde die MACS®-Technologie verwendet. Bei diesem Verfahren werden PBMC mit an ferromagnetische Partikel gekoppelten Antikörpern inkubiert, welche gegen zelluläre Oberflächenantigene gerichtet sind. Die partikelbeladenen Zellen laufen durch eine Separationssäule, die in

einem magnetischen Feld aufgehängt ist. Bei der Passage bleiben markierte Zellen in der Säule haften, wohingegen nichtmarkierte Zellen die Säule passieren. Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld werden die angereicherten Zellen mit einem Stempel aus der Säule herausgedrückt und in einem Gefäß aufgefangen. Um eine Kontamination der CD4⁺-Zellfraktion mit Monozyten zu vermeiden, die auch das CD4-Antigen auf ihrer Oberfläche tragen, wurden diese in einem der CD4-Anreicherung vorangestellten Schritt durch Markierung mit CD14-Antikörpern depletiert (Abb. 2).

Anschließend wurde die CD4-positive T-Zell-Fraktion durchflußzytometrisch auf ihre Reinheit überprüft.

Abb. 2: Flusschema Zelltrennung



Durchführung:

Der Ansatz wurde nach oben stehendem Schema auf Eis durchgeführt. Als Puffer wurde bei der Zellanreicherung PBS+ 2 mM ETDA + 0,5% FCS (im Folgenden PBS_E) verwendet.

Der Zusatz von 2 mM EDTA + 0,5% FCS wurde gewählt, da damit eine Verbesserung der Fließeigenschaften über die Säulen erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die PBMC ($1-10 \times 10^5$ Zellen) wurden pelletiert, in 80 μ l PBS_E resuspendiert und mit 20 μ l Anti-CD14-Micro-Beads inkubiert (15 min, 4°C). Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in 0,5 ml PBS_E resuspendiert und auf die vorher mit 0,5 ml PBS_E gespülte Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 3x0,5 ml PBS_E gespült. Durch Aufstecken einer Kanüle wurde die Durchflussgeschwindigkeit der Zellen durch die Säule reduziert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass damit die Depletion der CD14⁺-Zellen verbessert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Anreicherung der CD4⁺ Fraktion erfolgte analog, jedoch ohne Verwendung der Kanüle. Zuletzt wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, 1ml PBS_E auf die Säule gegeben, und die markierten Zellen mit einem Stempel in ein 15 ml Falcon[®]-Tube gedrückt. Zur Erhöhung der Reinheit der CD4⁺-Probe wurde das Eluat erneut wie oben beschrieben über eine zweite Säule gegeben, 3x mit PBS_E gespült und nach Herausdrücken bei 4°C zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

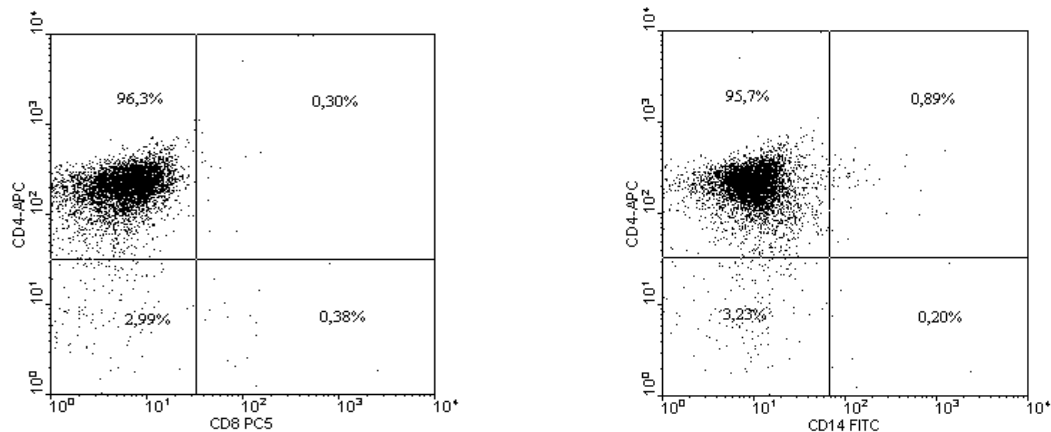
Anschließend entnahm man den in 1 ml suspendierten CD4⁺-T-Zell-Fraktionen 200 μ l, um deren Reinheitsgrad durchflusszytometrisch zu überprüfen.

3.5. Durchflusszytometrie (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie passieren Zellen hintereinander angeordnet einen fokussierten Laserstrahl. Die hierbei entstehende Streuung des Lichtes ist proportional sowohl zur Zellgröße (Vorwärtsscatter, FSC) als auch zur Zellgranularität (Seitwärtsscatter, SCL). Mit Hilfe der Software graphisch ausgewertet, können dadurch unterschiedliche Zelltypen einer Gesamtpopulation voneinander abgegrenzt und separat weiter untersucht werden. Darüber hinaus kann die Expression von Oberflächenmolekülen einzelner Zellen bestimmt werden. Hierzu verwendet man mit verschiedenen Fluorochromen markierte Antikörper, die spezifisch gegen ein bestimmtes zelluläres Antigen gerichtet sind. Passieren die Zellen den Laserstrahl, werden die Fluorochrome angeregt und emittieren ein Signal mit für das entsprechende Fluorochrom typischer Wellenlänge. Dieses wird von einem Sensor erfasst. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional der Anzahl markierter Moleküle auf jeder Zelle. Das Ergebnis wird graphisch zweidimensional als Punktwolke für jeweils zwei Antikörper dargestellt. Durch morphologische Abgrenzung der für das gemessene Oberflächenmolekül deutlich positiven Zellen von den negativen Zellen mit unspezifisch geringer Fluoreszenz kann man deren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation bestimmen (Abb. 3).

Es wurden die Fluorochrome FITC und APC verwendet. Durch Titration wurden in Vorversuchen die idealen Verdünnungsstufen der Fluoreszenz-markierten Antikörper bestimmt.

Abb. 3: FACS-Analyse Probe L110 nach CD4-Anreicherung



Durchführung:

Die Analysen wurden mit einem 4-Farben-Durchflusszytometer (FACSCalibur®) durchgeführt. Die angereicherte CD4-positive T-Zellfraktion wurde mit 10 µl CD4-mAbs-APC und 10 µl CD-14-mAbs-FITC inkubiert (15 min, 4°C). Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und in 10 ml Plastikröhrchen gegeben. Diese wurden in die Messvorrichtung des Durchflusszytometers gestellt, und die Reinheit analog der obigen Beschreibung mit der Cell Quest® Software bestimmt. Um eine Beeinflussung der weiteren Analysen durch CD4-negative Zellen zu vermeiden, wurden hierfür nur Proben mit einer Reinheit > 90% verwendet.

Die Zellen wurden anschließend aus organisatorischen Gründen bei -80°C eingefroren. Dies führt zu einer Reduktion der lebenden Zellen mit aussagekräftigem Ribonukleinsäuregehalt. Aus diesem Grund wurde vor der Weiterverarbeitung der Proben die Zellzahl mit der Neubauer-*improved*® Zählkammer bestimmt. Die sich nach Zugabe von Methyleneblau anfärbenden und somit toten Zellen wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

3.6. RNA-Isolation

Um aus den Zellen RNA zu isolieren, wurde ein kommerzieller Kit (High Pure RNA Isolation Kit[®]) verwendet. Hierbei wurden in einem ersten Schritt die Zellen lysiert. In Gegenwart chaotroper Salze wurden die Nukleinsäuren spezifisch an eine Glasfaseroberfläche in einem Filter gebunden. Ein anschließender DNase Verdau diente der weitgehenden Reduktion kontaminierender genomischer DNA. In drei folgenden Waschschrritten wurden noch vorhandene Salze und Proteine entfernt, bevor die an die Glasfaseroberfläche gebundene RNA mit Wasser herausgewaschen werden konnte.

Durchführung:

Die Isolation der RNA wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde bei jeder RNA-Isolation neues Wasser verwendet.

Nach Einsetzen des Filters in ein Auffanggefäß wurde die in 200 µl suspendierte Probe auf den Filter pipettiert. Nach Zentrifugation (15 s, 10000 rpm) wurde der Durchlauf verworfen. Die in 100 µl gelöste DNase (90 µl Inkubationspuffer + 10 µl in Wasser gelöste DNase I) wurde für 15 min bei Raumtemperatur auf den nukleinsäurehaltigen Filter gegeben. Anschließend folgten zwei Waschschrritte durch Zugabe von je 500 µl Waschpuffer I und II und anschließender Zentrifugation (15s bei 10000 rpm). Ein letzter Waschschrtritt mit 200 µl Waschpuffer II (Zentrifugation 2 min bei maximaler Geschwindigkeit) diente der kompletten Entfernung des Puffers. Daraufhin wurde das Auffanggefäß verworfen und der Filter in ein steriles 1,5 ml Tube eingesetzt. Zur Elution der RNA wurde jede Probe in einem Volumen von 60 µl sterilem Wasser durch Zentrifugation aus dem Filter gewaschen.

3.7. cDNA-Synthese

Als komplementäre DNA bezeichnet man die einzel- oder doppelsträngige Kopie eines RNA Moleküls. Für die Synthese der cDNA wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt. Diese sogenannte Reverse Transkriptase benutzt die RNA als Matrize für die Synthese eines DNA-Stranges. Hierbei entsteht initial ein RNA/DNA-Hybridmolekül. Um mit der Strangsynthese zu beginnen, benötigt die Reverse Transkriptase kurze doppelsträngige Nukleinsäurebereiche. Hierzu dienen zufällig an die RNA angelagerte Hexanukleotide, an deren 3' Enden die Reverse Transkriptase bindet. Genomische DNA würde in der PCR ebenso wie cDNA amplifiziert werden. Da jedoch nur die transkribierten mRNA-Moleküle erfasst werden sollen, wird die genomische DNA durch einen der cDNA-Synthese vorangestellten Schritt durch ein DNA-spaltendes Enzym, der DNase, möglichst eliminiert (siehe Punkt 3.6).

Um die Affinität der RNA zur Plastikoberfläche des Reaktionsgefäßes zu reduzieren, wurde zusätzlich Glycogen als RNA-Trägersubstanz zugesetzt.

Durchführung:

Der gesamte Ansatz wurde auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde ein gemeinsamer Mastermix angesetzt. Dieser Bestand je Probe aus

9 µl	5xBuffer
2 µl	DTT
0,9 µl	dNTP 10x
1 µl	Glycogen
0,5 µl	Hexanukleotide

Anschließend füllte man je Probe 1 µl RNAsin zur Inhibierung von Ribonukleasen in ein steriles Reaktionsgefäß. Dazu wurde für jede Probe nacheinander der Mastermix und 60 µl RNA gegeben. Vor Zugabe der Reversen Transkriptase wurden vom Gesamtansatz je Probe 1/10 des Volumens in ein separates Reaktionsgefäß gegeben, das später für die Messungen auf dem TaqMan als RT-Kontrolle verwendet wurde (siehe Punkt 3.8.1.2). Durch die fehlende Reverse Transkriptase kam es dabei zu keiner cDNA-Synthese, wodurch die mögliche Kontamination der Proben mit genomischer DNA überprüft werden konnte. Zuletzt wurde zu jeder Probe 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript I[®]) pipettiert und die Reaktion durch Einbringen der Proben in den Blockcycler gestartet (60', 42°C). Durch Verdünnen mit H₂O wurden im Anschluss an die cDNA-Synthese die Proben auf ein Endvolumen von 100 µl, die RT-Proben auf 10 µl H₂O gebracht (Verdünnungsfaktor 1,47). Um ein häufiges Auftauen der Proben zu verhindern, wurden die cDNA-Proben in zwei Teilfraktionen von je 50 µl aliquotiert, und zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.8. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein *in vitro* Verfahren, mit der DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Nukleotid-Sequenzen eingerahmt werden, spezifisch vervielfältigt werden können. Das Prinzip beruht auf drei sich zyklisch wiederholenden Schritten: Die Nukleinsäuren werden hitzedenaturiert, die spezifischen Primer lagern sich an die komplementäre Sequenz des Einzelstranges an (sog. Annealing), woraufhin die Taq-Polymerase die Primer zum Doppelstrang ergänzt (sog. Extension). Durch Wiederholen dieser Schritte kommt es in jeder Vermehrungsrunde theoretisch zu einer Verdoppelung

des Ausgangsmaterials. Dabei dienen auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen zur Vervielfältigung der Ziel-DNA bei.

3.8.1. Quantitative RT-PCR

Um die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zu beurteilen, muss man das PCR-Produkt quantifizieren. Im Vergleich zu herkömmlichen, oft sehr aufwändigen Verfahren hat die Technik der real-time RT-PCR den Vorteil, dass Amplifizierung, Detektion und Quantifizierung der zu untersuchenden Sequenz in einem Ansatz durchgeführt werden können. Hierzu stehen mehrere kommerzielle Systeme zur Verfügung (z.B. LightCycler[®], iCycler[®], RotorGene[®], Gene Amp 5700[®], ABI Prism 7700[®]). Ebenso bestehen zur Detektion des Amplifikates mehrere Möglichkeiten, von denen in der vorliegenden Arbeit die SYBR-Green Methode sowie die Detektion mit Hybridisierungs sonden zur Anwendung kamen. Aufgrund limitierten Zuganges wurden die molekularbiologischen Untersuchungen auf zwei verschiedenen Geräten, dem LightCycler und dem ABI Prism 7700 (TaqMan), durchgeführt.

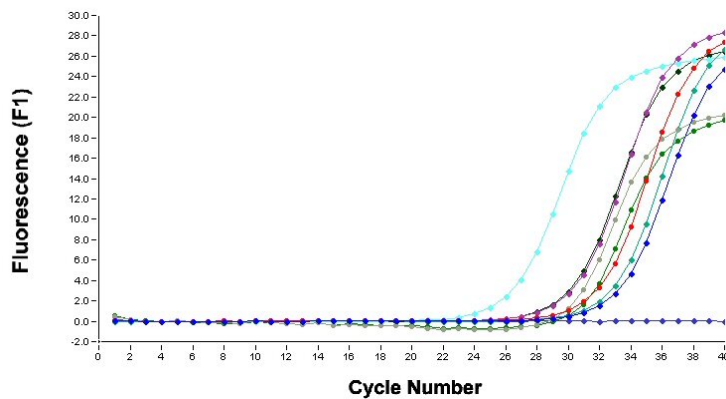
3.8.1.1. SYBR-Green I auf dem LightCycler

Beim LightCycler handelt es sich im Gegensatz zu herkömmlichen Blockcyclern um ein Gerät, in dem sich die Reaktionsansätze in dünnen Glaskapillaren in einem Rotor mit Platz für 32 Kapillaren befinden. Mit Hilfe von Luft als Medium werden diese mit bis zu 20°C/ sec auf die entsprechenden Temperaturen gebracht. Durch einen Ventilator wird die Luft gleichmäßig in der thermischen Kammer verteilt, und es herrscht an jeder Position des Rotors die gleiche Temperatur. Außerdem sind in jedem Reaktionsansatz Farbstoffe enthalten, die über eine Lichtquelle mit blauem Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm angeregt werden und daraufhin fluoreszierendes Licht abstrahlen. Diese Fluoreszenz kann über eine optische Einheit in Höhe der Kapillarenspitze während jedem PCR Zyklus gemessen werden. Durch sofortige Abbildung der Fluoreszenzdaten auf dem Bildschirm wird so eine „Online-Detektion“ der PCR möglich⁹³.

Die Detektion mit dem Molekül SYBR-Green I beruht auf dessen spezifischem Fluoreszenzverhalten. Bei der Interkalierung dieses Moleküls mit neu gebildeter doppelsträngiger DNA steigt deren Eigenfluoreszenz um ein Vielfaches an, was vom Gerät in Echtzeit (real-time) nach jedem durchlaufenen Zyklus gemessen wird. Hierbei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA in der jeweiligen Probe.

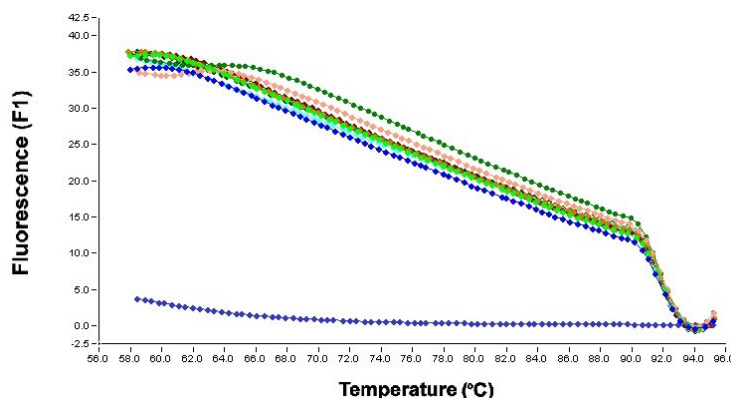
Zur Quantifizierung der einzelnen Proben wird der Messpunkt C_t (sog. threshold cycle) als der Zyklus der PCR definiert, an dem die Fluoreszenz von SYBR-Green das 10-fache der Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz überschreitet, und somit neue DNA gebildet wird. Je früher es im Verlauf der PCR zur signifikanten Zunahme der Fluoreszenz kommt, um so mehr cDNA war in ursprünglichen Probe vorhanden. (Abb. 4).

Abb. 4: Amplifizierung LightCycler



Im Anschluss an die PCR wird die Spezifität des Produktes durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Das PCR-Produkt wird in $0,1^\circ\text{C}$ Schritten bis auf 95°C erhitzt. Abhängig von Sequenz, Länge und CG-Gehalt⁹² des Fragmentes trennt sich der Doppelstrang bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur und es kommt zu einem steilen Abfall der Fluoreszenz, was vom Gerät gemessen und grafisch ausgewertet wird (Abb. 5).

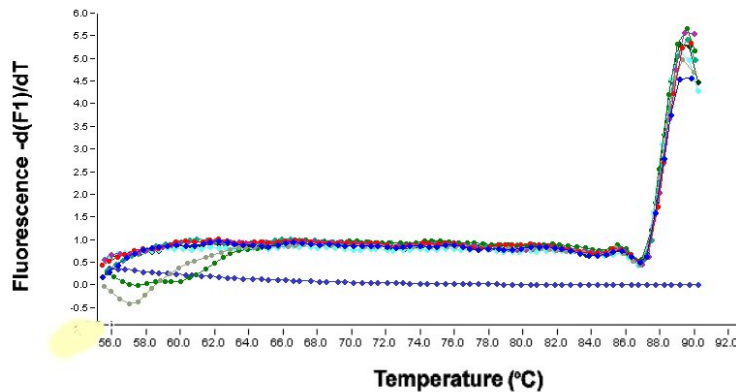
Abb. 5: Schmelzkurvenanalyse LightCycler



Um die Schmelzkurve graphisch besser abzubilden, werden die Daten konvertiert. Die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur (dargestellt als negative 1.

Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur $-dF/dT$) wird gegen die Temperatur aufgetragen. Es entsteht eine Spitze bei einer für jedes Produkt spezifischen Temperatur, der *melting peak* (siehe Abb. 6). Hierbei ist die Fläche unter dem Graph der Menge an gebildetem Produkt proportional.

Abb. 6: *Melting peak* Darstellung LightCycler



Um die so erhaltenen Ergebnisse zu quantifizieren, wurden in jedem PCR-Lauf neben den Proben unbekannter cDNA-Konzentration Titrationsreihen von Proben mitgeführt, deren Ausgangskonzentration an cDNA des zu untersuchenden Moleküls bekannt war. Dadurch konnte eine Standardkurve erstellt werden, anhand derer die Konzentration der Proben unbekanntem cDNA-Gehalts ermittelt werden konnte.

3.8.1.1.1. Haushaltsgen und Primer

Die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander erfordert den Einsatz von exakt gleichen Mengen an cDNA. Haushaltsgene wie GAPDH oder β -Actin sind Gene, die von Zellen unabhängig von äußeren Stimuli in weitgehend konstanter Menge transkribiert werden²⁹. Bestimmt man deren Gehalt, kann man Aussagen über die Nukleinsäuremenge in den zu untersuchenden Proben machen. Bezieht man den Gehalt eines gesuchten Ziel-Moleküls einer Probe auf dessen Gehalt an einem Haushaltsgen, können Unterschiede an eingesetzter Menge cDNA ebenso wie Unterschiede bei der Effektivität der cDNA-Synthese zwischen verschiedenen Proben ausgeglichen werden.

Für die Primer GAPDH, IFN- γ , CXCR3 und CCR4 wurden kommerzielle Produkte verwendet. Die einzelnen Sequenzen lagen uns nicht vor. Tabelle 1 zeigt Größe und CG-Gehalt des zu erwartenden Produkts (Angaben des Herstellers):

Tab. 1: Länge und CG-Gehalt

	Größe	CG-Gehalt
GAPDH	304 bp	59,9%
IFN- γ	307 bp	37,1%
CCR4	250 bp	48,8%
CXCR3	218 bp	63,8%

Die Primer sollten zur sicheren Unterscheidung des Produktes von solchen genomischen Ursprungs ein Intron überspannen. Dieses wurde von der Fa. Search LC durch Versuche mit genomischer DNA belegt.

3.8.1.1.2. Durchführung

Es wurde ein kommerzieller Kit (LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I[®]) verwendet. Der hierbei mitgelieferte Mastermix enthält zum einen den Farbstoff SYBR Green I, zum anderen eine thermostabile Taq DNA-Polymerase. Letztere wird erst durch hohe Temperaturen aktiviert (z.B. durch die initiale Denaturierung bei 95°C über 10 min, siehe Punkt 3.8.1.1.4), und vermindert so weitgehend die unspezifische Bildung von Primer-Oligomeren bei niedrigen Temperaturen vor Beginn der PCR.

Der gesamte Ansatz wurde auf Eis durchgeführt, die einzelnen Proben in einer Verdünnung von 1:10 in Duplikaten eingesetzt.

3.8.1.1.3. PCR Mix

Es wurden je Probe pipettiert:

6 μ l	H ₂ O
2 μ l	Primer
2 μ l	Master Mix
10 μ l	cDNA

3.8.1.1.4 PCR Protokoll

Es wurde ein für alle Primer identisches Protokoll der Fa. Search LC verwendet. Um die Spezifität des PCR-Produktes zu erhöhen, wurde das Prinzip der *touchdown* PCR angewandt. Diese beruht auf der Tatsache, dass spezifische Doppelstränge aus Primer und Zielsequenz eine höhere Schmelztemperatur besitzen als unspezifische Primer - Nukleotid Doppelstränge. Mit zunehmender Zahl an Zyklen wird die *Annealing*-Temperatur schrittweise gesenkt. Üblicherweise beginnt man mit einer sehr hohen *Annealing*-Temperatur, bei der keine Amplifizierung erwartet wird (in diesem Fall 68°C) und behält diese für einige Zyklen bei (sog. *step delay*, in diesem Fall 1 Zyklus), um die PCR zu Anfang möglichst stringent zu machen und die Amplifizierung unspezifischer Produkte schon zu Beginn zu unterbinden. Dann senkt man die *Annealing*-Temperatur langsam von Zyklus zu Zyklus um 0,5°C ab (sog. *step size*), bis man die Temperatur erreicht hat, die für die Sensitivität der PCR optimal ist (in diesem Fall 58°C). Dadurch sollte das Verhältnis von erwünschten zu unerwünschten Produkten auch in den späteren Zyklen bei niedrigeren Temperaturen beibehalten werden¹⁰³.

Die folgende Tabelle 2 zeigt das zur Durchführung der real-time RT-PCR auf dem LightCycler verwendete Protokoll:

Tab. 2: RT-PCR Protokoll LightCycler

Denaturierung

Anzahl der Zyklen	1
Zieltemperatur	95°C
Inkubationszeit	10'
Temperaturänderung/Zeit	20°C/s

Annealing und Amplifizierung

Anzahl der Zyklen	40		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Zieltemperatur	95°C	68°C	72°C
Inkubationszeit	10''	10''	16''
Temperaturänderung/Zeit	20°C/s		
Zieltemperatur nach touchdown	-	58°C	-
Step size	-	0,5	-
Step delay	-	1	-

Schmelzkurvenanalyse

Anzahl der Zyklen	1		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Zieltemperatur	95°C	58°C	95°C
Inkubationszeit	0''	10''	0''
Temperaturänderung/Zeit	20°C/s	20°C/s	0,1°C/s

Kühlen

Anzahl der Zyklen	1
Zieltemperatur	40°C
Inkubationszeit	30''
Temperaturänderung/Zeit	20°C/s

3.8.1.1.5 Auswertung

Zur Auswertung der PCR mit dem LightCycler wurden die Schmelzkurvenanalysen in Verbindung mit den Ergebnissen der Agarosegel-Elektrophorese benutzt (siehe Kapitel 3.8.1.4). In der Schmelzkurvenanalyse wurde ein Fluoreszenzsignal dann als positiv gewertet, wenn es in der 1. negativen Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ein für das amplifizierte Molekül spezifisches Temperaturmaximum zeigte. Beim Auftragen der PCR-Produkte auf Agarosegele wurde eine sichtbare Bande an der entsprechenden Stelle (erwartete Größe des Produkts in Basenpaaren) als positives Ergebnis gewertet.

Zur Quantifizierung wurde die *fit points* Methode verwendet⁹³. Durch Legen des *noise band* wurden hierbei alle Proben bei Erreichen einer vom Benutzer definierten Fluoreszenzintensität (in diesem Fall 0,6) quantifiziert.

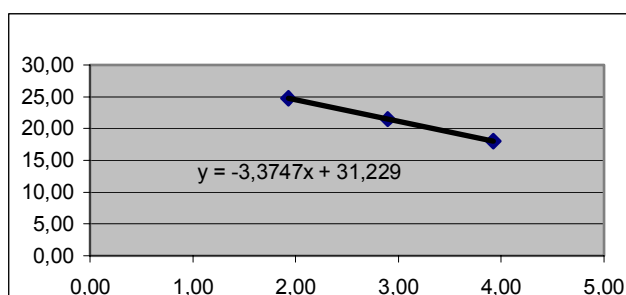
Um eine vergleichende Quantifizierung aller Proben der einzelnen Läufe untereinander zu ermöglichen, musste eine externe gemeinsame Standardkurve für jeden Primer erstellt werden. Aus den Standardkurven aller Läufe mit einem spezifischen Primer wurde für jede der drei Verdünnungsstufen jeweils ein Mittelwert für den C_t -Wert und die korrespondierende Kopienanzahl ermittelt. Mit Hilfe der Geradengleichung $y = mx + t$ wurde so eine neue Standardkurve generiert (siehe Abb. 7 am Beispiel von IFN- γ), anhand derer für jede Probe die entsprechende Kopienzahl bestimmt wurde. Tabelle 3 zeigt die Rohdaten zur Generierung der Standardkurve am Beispiel von IFN- γ :

Tab. 3: Rohdaten IFN- γ

Molekül	log (Kopien)	C_t
IFN- γ 1:10	3,92 (0,02)	18,01 (0,27)
IFN- γ 1:100	2,90 (0,02)	21,45 (0,27)
IFN- γ 1:1000	1,92 (0,01)	24,74 (0,07)

Mittelwerte fettgedruckt, in Klammern Standardabweichung

Abb. 7: Standardkurve IFN- γ



Um Schwankungen an eingesetzter mRNA sowie qualitative Unterschiede bei der cDNA-Synthese auszugleichen, wurde das Ergebnis jeder Probe als Anzahl spezifischer Kopien eines Moleküls pro 1000 Moleküle GAPDH angegeben.

3.8.1.2 Hybridisierungssonden auf dem ABI PRISM 7700 (TaqMan)

Zusätzlich zu dem 3'- und 5'-Primer verwendet man bei dieser Methode ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Oligonukleotid, das komplementär zu einem Bereich innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz ist. An seinem 5'-Ende ist kovalent das fluoreszierende Reporter-Molekül FAM gebunden. Am 3'-Ende befindet sich das sogenannte Quencher-Molekül TAMRA, das die Emission des Reporters absorbiert, solange das Molekül intakt ist. Während der Extensionsphase der PCR wird das hybridisierte Molekül von der 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dies führt zu einer Freisetzung der Emission, was vom Gerät in Echtzeit (real-time) analog der SYBR Green Methode festgehalten wird.

Die Verwendung von zusätzlichen Sonden hat im Gegensatz zur Methode mit SYBR Green I den Vorteil, dass die Spezifität für die zu vervielfältigende Sequenz erheblich gesteigert werden kann. Es kommt kaum zur Bildung von unspezifischen, die Quantifizierung beeinträchtigenden, Produkten. Auf eine Schmelzkurvenanalyse kann daher weitgehend verzichtet werden. Nachteil der Methode sind die erheblich höheren Kosten bei der Verwendung von Sonden.

3.8.1.2.1 Haushaltsgen und Primer

Es wurden kommerzielle Primer für CCR3, CCR5 sowie für das Haushaltsgen GAPDH verwendet. In Vorversuchen zeigte sich eine fehlende RNA-Spezifität der Primer CCR3 und CCR5, was zur Transkription von genomischer DNA führte. Deshalb wurde zum Ausschluss einer Kontamination der Proben mit genomischer DNA eine nicht revers transkribierte Kontrolle (RT) gemessen.

3.8.1.2.2 Durchführung

Zur Durchführung wurde eine hitzeaktivierte Taq Polymerase verwendet (AmpliTaq Gold®). Das Versuchsprotokoll für die oben genannten Primer wurde in Vorversuchen von C. Cohen

(Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Medizinische Poliklinik der LMU München) etabliert¹⁹, und für die vorliegenden Messungen übernommen.

Der gesamte Ansatz wurde auf Eis durchgeführt, und die einzelnen Proben in einer Verdünnung von 1:10 in Duplikaten eingesetzt.

3.8.1.2.3 PCR-Protokoll

Tabelle 4: PCR-Protokoll TaqMan

Denaturierung

Anzahl der Zyklen	1	
	Segment 1	Segment 2
Zieltemperatur	50°C	95°C
Inkubationszeit	2'	10'

Annealing und Amplifizierung

Anzahl der Zyklen	40	
	Segment 1	Segment 2
Zieltemperatur	95°C	60°C
Inkubationszeit	15''	60''

3.8.1.2.4 Auswertung

Im TaqMan wurden keine Standards mitgeführt, so dass nur relativ zum Haushaltsgen quantifiziert werden konnte. Unter Annahme optimaler und identischer Amplifizierung von Haushaltsgen und spezifischem Gen sowie einer Verdoppelung der eingesetzten Menge cDNA pro Zyklus wurde die Ergebnisse durch die Ratio

$$2^{-(Ct \text{ spez. Molekül} - Ct \text{ Haushaltsgen})}$$

analog der $\Delta\Delta C_T$ -Methode²⁶ ausgedrückt.

3.8.1.3 PCR - Kontrollreaktionen

Die Kontamination der Reagenzien mit Fremd-DNA wurde durch eine Probe ausgeschlossen, die statt cDNA Wasser enthielt.

Jede Probe wurde innerhalb eines Laufes in Duplikaten gemessen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Laufes zu überprüfen (*intra-assay* Variabilität), und um Schwankungen an eingesetzter cDNA auszugleichen. Als Ergebnis wurde der Mittelwert der einzelnen C_t -Werte verwendet.

Zum Ausschluss von Kontamination der Proben mit genomischer DNA wurde für die Primer CCR3 und CCR5 auf dem ABI PRISM 7700 eine nicht revers transkribierte Kontrolle (RT⁻) gemessen (siehe 3.8.1.2.1).

3.8.1.4 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können bei geeignetem pH-Wert als geladene Makromoleküle innerhalb eines elektrischen Feldes in einer Agarose-Gelmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. RNA und DNA sind im pH Bereich des Puffers (pH 8,0) aufgrund ihres Phosphatrests negativ geladen und wandern daher zur Anode. Im Anschluss an die PCR kann so anhand der Größe des amplifizierten Produkts dessen Reinheit und Spezifität überprüft werden.

Durchführung:

Eine 2% Agarosesuspension wurde in 1xTAE angesetzt und die Agarose durch Kochen gelöst. Zu der abkühlenden Agaroselösung wurde Etidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben und die Agaroselösung auf einen Gelträger gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1xTAE gefüllte horizontale Elektrophoresekammer transferiert. Die DNA-Proben sowie ein DNA-Molekulargewichtsmarker wurden in die Gelfaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde für ca. eine Stunde bei einer Spannung von 80 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel zur Auswertung im UV-Licht photographiert.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesamten Daten erfolgte mittels des *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS®) für Windows 2000®, Version 11.0. Grundsätzlich wurden die Ergebnisse als Mediane mit Minimum und Maximum angegeben, da bei der vorliegenden

Patientenzahl keine Normalverteilung der Daten anzunehmen war. Die Ergebnisse der PCR wurden darüber hinaus als Geometrisches Mittel mit einem 95% Konfidenzintervall angegeben, da diese Daten zum einen eine Spannweite von mehreren Zehnerpotenzen umfassten, zum anderen durch Multiplikation mehrerer Einzelwerte entstanden waren¹. Korrelationen zwischen stetigen Variablen wurden mit dem nicht-parametrischen Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten ermittelt. Eine signifikante Korrelation wurde angenommen, wenn der Korrelationskoeffizient r größer 0,3 und das Signifikanzniveau p kleiner als 0,05 war. Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Streudiagrammen. Zur Überprüfung der Nullhypothese, dass sich mehr als zwei Gruppen nicht in der Verteilung einer Zielvariablen unterscheiden, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test eingesetzt. Er kam bei der Analyse der Chemokinrezeptorexpression in Abhängigkeit der elterlichen Atopie zur Anwendung. Zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben hinsichtlich einer stetigen Zielvariablen wurde der Mann-Whitney- U -Test (Wilcoxon-Rangsummentest) verwendet.

3.10 Material

3.10.1 Geräte

FACSCalibur® FACS Cell Quest® Software, Version	Becton Dickenson (Heidelberg)
Magnet und Haltevorrichtung	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Mikroskop	Leica (Wetzlar)
Multipette 4780	Eppendorf (Hamburg)
Neubauer- <i>improved</i> ® Zählkammer	Planoptik
Pipetten <i>research</i> (0-2 ml, 2-20 ml, 10-100 ml, 100-1000 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Roche LightCycler® Roche LightCycler Software, Version 3.3	Roche Diagnostics (Mannheim)
Taq Man ABI 7700 Sequence Detection System®	Applied Biosystems (Darmstadt)
Temperaturzyklusautomat UNO II	Biometra (Göttingen)
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge	Heraeus (Osterode)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)

3.10.2 Verbrauchsmaterialien

3.10.2.1 Glas- und Plastikmaterial, Zellanreicherung

Anti CD-4/-14 Microbeads	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
FACS Glasröhrchen	Becton Dickenson (Heidelberg)
MS-Magnetsäulen	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (blau, gelb, mit Filter)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Tubes (15 ml/50 ml)	Becton Dickenson (Heidelberg)
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Roche LightCycler® Glaskapillaren	Boehringer (Mannheim)

3.10.2.2 Chemikalien

5xPuffer	Sigma (München)
Aqua bidestilata	Gibco BRL (Eggenstein)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma (München)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma (München)
Dithiotreitol (DTT)	Sigma (München)
Ethanol 100%	Sigma (München)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco BRL (Eggersheim)
Ficoll Hypaque	Sigma (München)
Glycogen	Life Technologies (Karlsruhe)
Hexanukleotide	Life Technologies (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma (München)
Natriumchlorid	Sigma (München)
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Life Technologies (Karlsruhe)
Oligonukleotide	Life Technologies (Karlsruhe)
Primer GAPDH, IFN- γ , CCR4, CXCR3 (LightCycler RT-PCR)	Search LC (Heidelberg)
Primer und Sonden GAPDH, CCR3, CCR4 (ABI PRISM 7700 RT-PCR)	Applied Biosystems (Weiterstedt)
Reverse Transkriptase (Superscript I)	Life Technologies (Karlsruhe)
Ribonuklease Inhibitor (RNAsin)	Promega (Mannheim)
Roche LightCycler FastStart Master	Boehringer (Mannheim)
Roche RNA-Isolation Kit	Boehringer (Mannheim)
RPMI Medium	Gibco (München)

4 Ergebnisse

4.1 Probandencharakterisierung und Gruppengrößen

Für die Analyse des Expressionsmusters T_H1 - und T_H2 -assoziierter Zytokine und Chemokinrezeptoren aus CD4-positiven Lymphozyten stand Vollblut einer zufällig ausgewählten Stichprobe von 61 Kindern kaukasischer Abstammung aus dem 1467 Neugeborene umfassenden Münchener Kollektiv der LISA-Studie zur Verfügung. Die Probanden wurden im Zeitraum vom 27.05.98 bis 22.01.99 geboren und waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme zwei Jahre alt. Aufgrund zu niedriger Reinheit nach der CD4-T-Zellanreicherung oder zu geringen Nukleinsäuregehalts nach der cDNA-Synthese wurden 19 Proben von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen. Die verbliebenen 42 Probanden bilden das Kollektiv der vorliegenden Arbeit. Die mittels Fragebogen erhaltenen Daten zur Probandencharakterisierung sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tab. 5: Probandencharakterisierung

Probanden gesamt	42
Geschlecht	
Männlich	19
Weiblich	23
Elterliche Atopie	
Keine	14
Einfach	21
Doppelt	7
Arztdiagnose AD	
Keine Angaben	3
Ja	8
Nein	31
Symptome AD	
Keine Angaben	2
Ja	8
Nein	32
Wheezing	
Keine Angaben	2
Ja	3
Nein	37

4.2 Ergebnisse der serologischen Tests

4.2.1 Nabelschnur-IgE

Folgende Tabelle 6 gibt die Ergebnisse des mittels ELISA bestimmten Nabelschnur-IgE wieder.

Tab. 6: Ergebnisse Nabelschnur IgE

Nicht nachweisbar	Nachweisbar	nicht gemessen
n = 15	n = 6 0,58 (0,4-1,99)	n = 21

Werte angegeben in kU/l, untere Nachweisgrenze 0,35 kU/l. Fettgedruckte Werte sind Mediane, in Klammern Minimum und Maximum.

4.2.2 Gesamt Serum-IgE im Alter von zwei Jahren

Das Gesamt IgE wurde im Alter von zwei Jahren mittels ELISA bestimmt (Tab. 7). Ein Wert > 60 kU/l wurde als erhöht definiert. Dies war bei sechs der 39 nachweisbaren Proben (15,4%) der Fall.

Tab. 7: Gesamt Serum-IgE im Alter von zwei Jahren

Nicht nachweisbar	Nachweisbar	Nicht gemessen
n = 3	n = 39 23,60 (2,07-1217)	n = 0

Werte angegeben in kU/l, untere Nachweisgrenze 0,35 kU/l. Fettgedruckte Werte sind Mediane, in Klammern Minimum und Maximum.

4.2.3 Sensibilisierung

Durch Bestimmen des spezifischen IgE mit Hilfe eines RAST wurde die Sensibilisierung der Kinder auf häufig vorkommende Allergene im Alter von zwei Jahren ermittelt: Bei insgesamt

neun Kindern (21,4%) konnte eine Sensibilisierung gegen mindestens ein Allergen nachgewiesen werden (Tab. 8).

Tab. 8: Spezifisches IgE

Allergen	nachweisbar	nicht nachweisbar
Milben und KÜchenschabe	1	41
Katze	1	41
Schimmelpilze	0	42
Lebensmittel	6	36
Gräser-, Baum- und Kräuterpollen	1	41

4.2.4 Allergentestung in der Muttermatratze

4.2.4.1 Hausstaubmilben- und Katzenallergene

Der Gehalt an Allergenen der Hausstaubmilben *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) und *Dermatophagoides farinae* (Der f1) sowie Katzenallergen (Fel d1) wurde mittels ELISA ermittelt. Für die statistischen Berechnungen wurde die Summe aus Der p1 und Der f1 verwendet. Für nicht nachweisbare Allergene wurde mit der Hälfte der unteren Nachweisgrenze gerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Hausstaubmilben und Katzenallergene

Allergen	Nicht nachweisbar	nachweisbar	Nicht gemessen
Der p1 + Der f1	n = 6	n = 35 463 (61-94437)	n = 1
Fel d1	n = 3	n = 38 0,19 (0,03-3191)	n = 1

Der p1 und Der f1 in ng/g Staub, Nachweisgrenze 10 ng/g Staub. Fel d1 in µg/g Staub, Nachweisgrenze 15 ng/g Staub. Mediane fettgedruckt, in Klammern Minimum und Maximum.

4.2.4.2 Endotoxingehalt

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Endotoxinkonzentration gemessen in den Muttermatratzen der Probanden.

Tab. 10: Endotoxingehalt

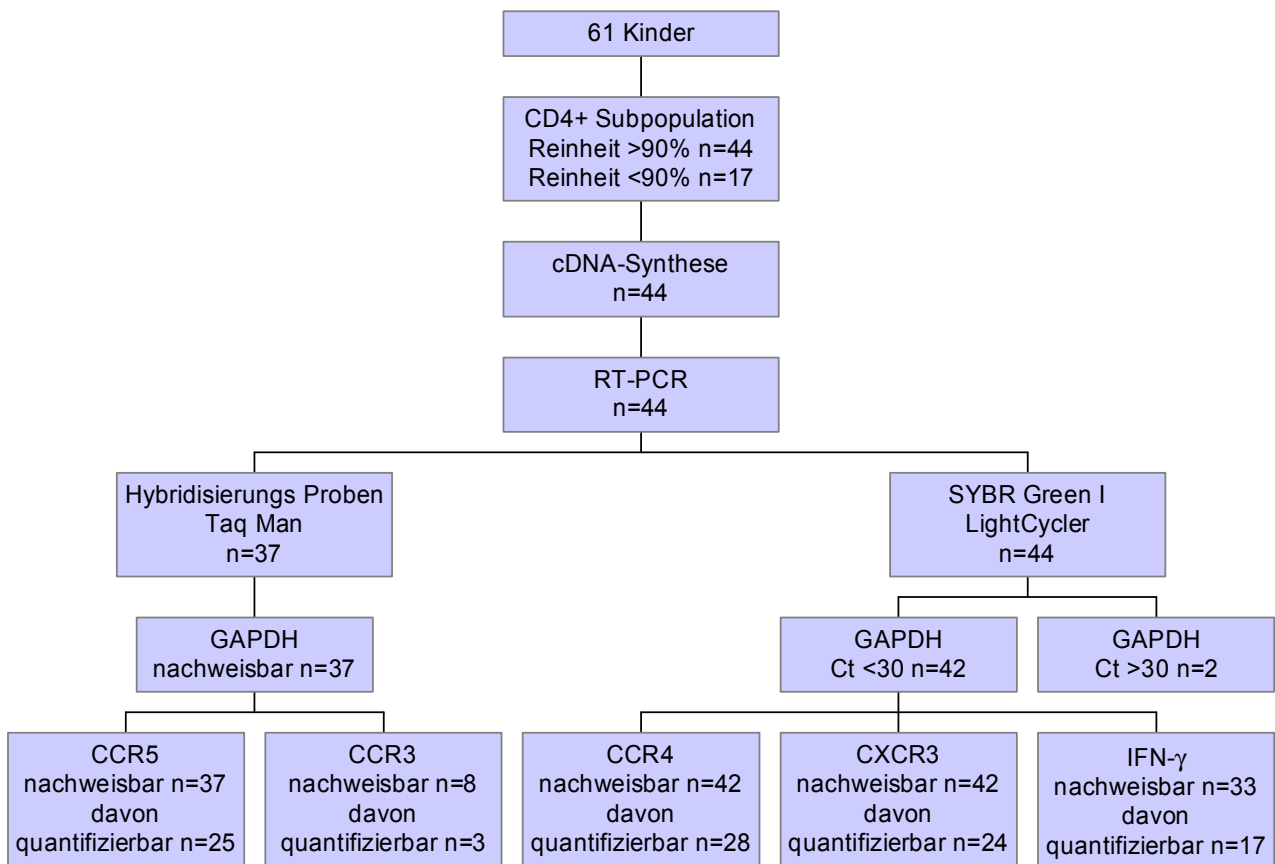
Nicht nachweisbar	Nachweisbar	Nicht gemessen
n = 0	n = 41 2738 (109-85380)	n = 1

Werte in Endotoxinunits EU/g Staub. Mediane fettgedruckt, Minimum und Maximum in Klammern.

4.3 Probenverarbeitung

Abbildung 7 zeigt schematisch die einzelnen Schritte bei der Probenverarbeitung und die jeweilige Anzahl der verarbeiteten Proben:

Abb. 7: Probenverarbeitung



4.3.1 Herstellung und Reinheitsüberprüfung der hochangereicherten CD4⁺-Subpopulationen

Die peripheren Blutproben der 61 Kinder hatten ein Ausgangsvolumen von 1-2 ml. Nach Herstellung der CD4-positiven Subpopulationen lag die Zellzahl der Proben in einem Bereich von 5×10^4 bis $8,5 \times 10^5$ Zellen (MW $2,27 \times 10^5$, SD $1,38 \times 10^5$). Nach Methylenblaufärbung bestätigte die Zellzählung unter dem Lichtmikroskop durchwegs mehr als 95% lebende Zellen.

Die Reinheit der angereicherten CD4⁺-Subpopulationen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Bei 44 Probanden lag die Reinheit über 90% (MW 93,93% SD 2,04 – siehe Abb. 3 unter 3.5). Bei 17 Probanden wurde eine geringere Reinheit erreicht. Diese Proben wurden von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen.

4.3.2 Quantitative RT-PCR

Für das auf dem LightCycler mit dem Molekül SYBR Green I gemessene Zytokin IFN- γ und die Chemokinrezeptoren CCR4 und CXCR3 stand Blut von 44 Kindern zur Verfügung. Zwei Proben wurden aufgrund zu geringen Nukleinsäuregehaltes nach der Bestimmung von GAPDH von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Der Gehalt an mRNA der Moleküle CCR5 und CCR3 wurde mit Hybridisierungssonden mit Hilfe des TaqMan bei 37 Kindern quantifiziert. Das Versuchsprotokoll für den TaqMan wurde in Vorversuchen von C. Cohen (Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik, LMU München) etabliert und für die vorliegenden Messungen übernommen¹⁹.

4.3.2.1 PCR - Kontrollreaktionen

4.3.2.1.1 Intra-Assay Variabilität

Jede cDNA-Probe wurde pro Lauf in Duplikaten eingesetzt. Durch Berechnung der bivariaten Korrelation nach Pearson konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Laufes über den gesamten C_t-Bereich bestimmt werden.

Die mit SYBR Green gemessenen Proben zeigten durchwegs eine gute Reproduzierbarkeit, wobei Proben mit niedrigen initialen C_t-Werten und somit höherem Ausgangsmaterial eine höhere Korrelation aufwiesen. Eine geringe Probenanzahl wirkte sich darüber hinaus

negativ auf die Intra-Assay Variabilität aus, da hier einzelne Ausreißer stärker das Ergebnis beeinflussten.

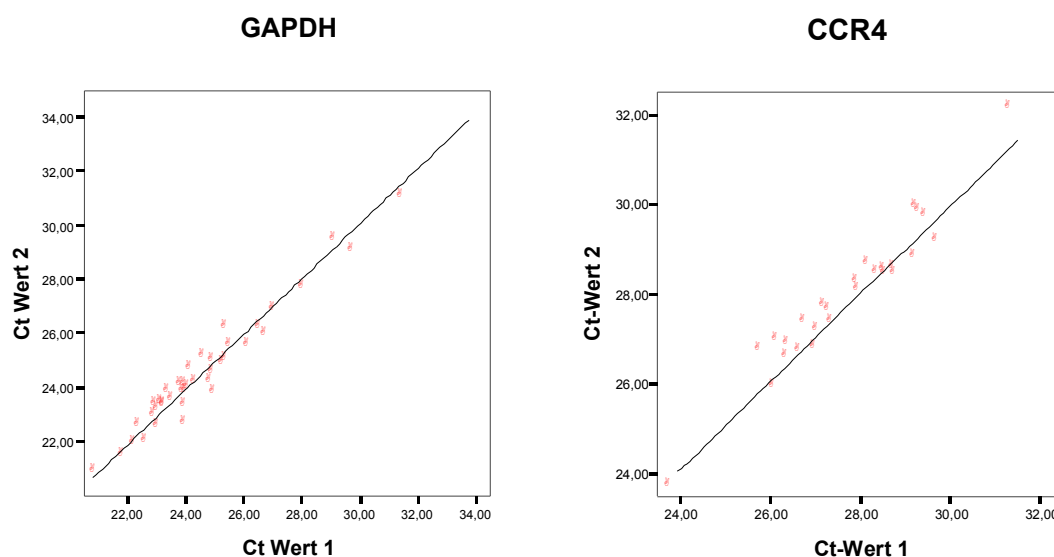
Der Gehalt an CCR5 mRNA der einzelnen Proben wurde mit dem TaqMan gemessen. Hier zeigte sich eine hohe Intra-Assay Variabilität. Die maximal zulässige Zyklusdifferenz zwischen den Duplikaten einer zu wertenden Probe wurde bei zwei Zyklen definiert, entsprechend einer maximalen Kopyendifferenz von 2^2 . Dies war bei allen untersuchten Proben der Fall. Aufgrund der geringen Anzahl zu quantifizierender Proben auf CCR3 (n = 3) wurde hier keine Korrelation berechnet (Tab. 5 und Abb 2 – 5).

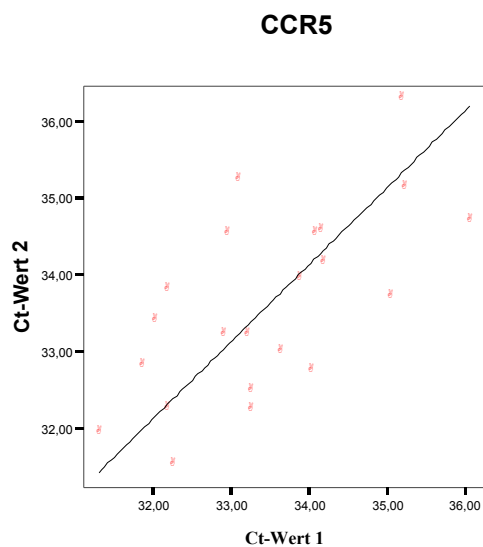
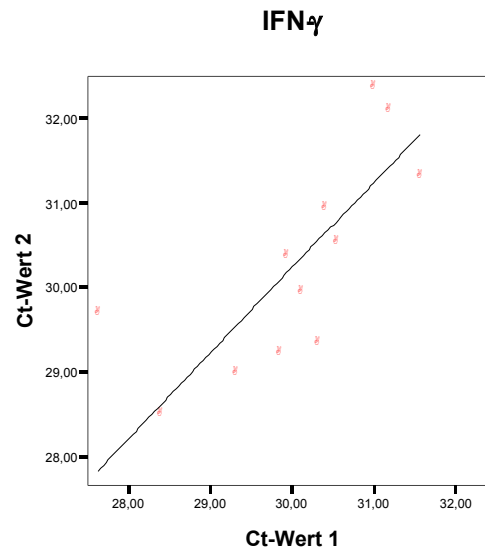
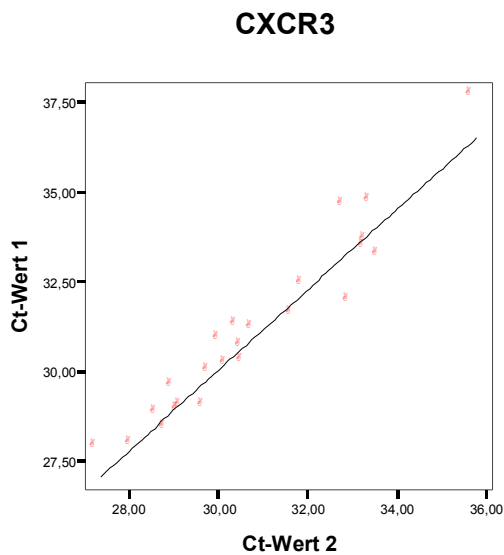
Tabelle 5: Intra-Assay Variabilität LightCycler und TaqMan

Primer	Median (Min – Max)	n	r	p
GAPDH	24,04 (20,78 - 35,21)	41 (3)*	0,950	<0,001
CCR4	28,08 (23,69 - 32,09)	27 (1)	0,958	<0,001
CXCR3	30,64 (27,36 - 37,65)	24 (5)	0,963	<0,001
IFN- γ	30,17 (27,62 - 32,33)	12 (5)	0,853	<0,001
CCR5	33,31 (31,29 - 36,27)	22	0,597	0,003

*Werte in Klammern geben die Anzahl der Proben an, von denen nur ein Wert für die Quantifizierung vorlag. Diese Proben wurden von den Korrelationsberechnungen ausgeschlossen. r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau bei zweiseitiger Testung.

Abb. 2-5: Intra-Assay Variabilität





4.3.2.1.2 Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese

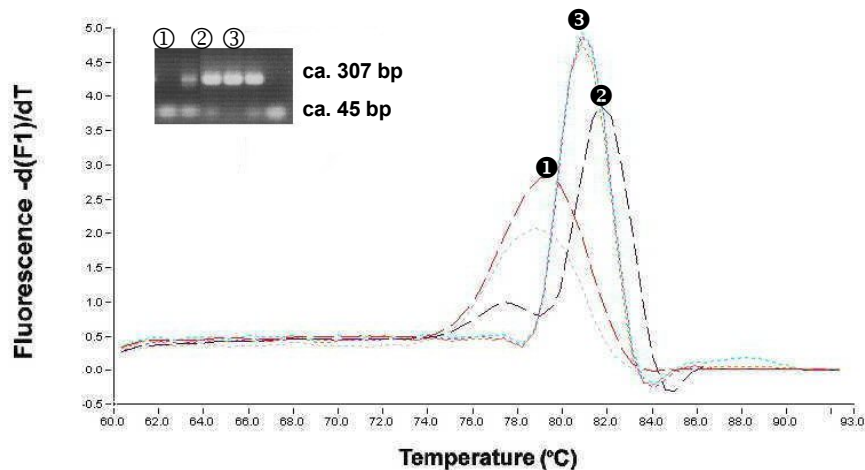
Mit dem LightCycler wurde zur Überprüfung von Reinheit und Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anschließend wurden durch Gelelektrophorese Produktgröße und Reinheit nochmals überprüft.

Bei der Untersuchung der Proben auf IFN- γ kam es zu einigen Besonderheiten, die im Folgenden besprochen werden sollen:

Die spezifische Schmelzkurve von IFN- γ lag bei ca. 81°C (Abb. 1, Kurve unter ⑤). Bei acht Proben war das Maximum der Schmelzkurve auf ca. 79°C erniedrigt (①). Bei elf weiteren Proben kam es zusätzlich zum spezifischen zu einem weiteren Maximum geringer Fluoreszenz bei ca. 77,5°C (②).

Die Gelelektrophorese zeigte bei den erstgenannten Proben kein spezifisches Produkt, jedoch ein Produkt geringerer Größe (ca 45 bp, ①). Letzteres trat auch in unterschiedlicher Intensität bei der Mehrzahl (n = 29) der übrigen, auf IFN- γ hin untersuchten Proben, auf (②).

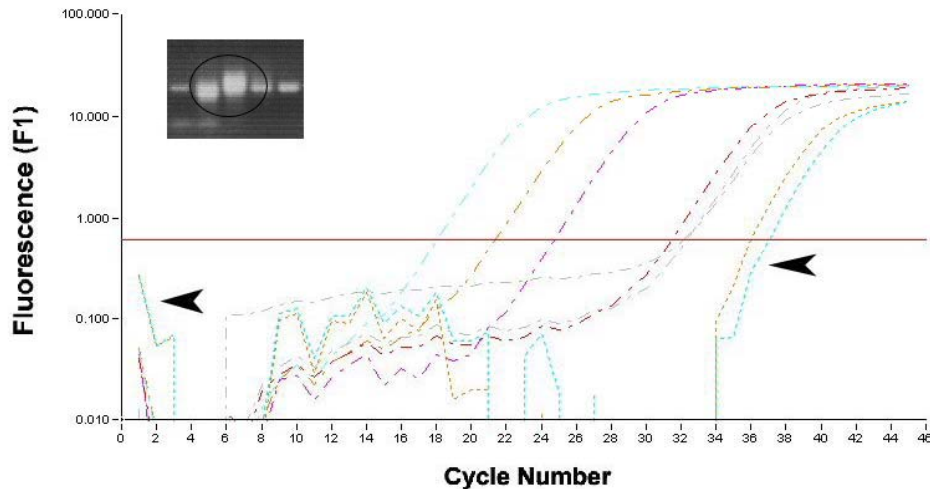
Abb.1: Primer Dimere in Gel und Schmelzkurve bei IFN- γ



Die Schmelzkurvenanalysen in Verbindung mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese sprachen für das Vorliegen von Primer-Dimeren. Lagern sich Primer zu Dimeren zusammen, besteht grundsätzlich das Risiko, dass diese die Amplifizierung des spezifischen Produktes kompetitiv hemmen. Darüber hinaus überlagert die von den Dimeren emittierte Fluoreszenz die des spezifischen Produktes. Dies hat zur Folge, dass das Ergebnis nur eingeschränkt quantifizierbar ist. Um den Einfluss der Primer-Dimere auf die Quantifizierung weitgehend zu eliminieren, wurden nur solche Proben in der Quantifizierung berücksichtigt, bei denen folgende Kriterien zutrafen (n = 17): 1. Vorliegen einer für IFN- γ spezifischen Schmelzkurve bei ca. 81°C in Verbindung mit einer Bande im Gel an der erwarteten Stelle (ca. 307 bp) und 2. Bei einer durch Primer-Dimere positiven Negativkontrolle wurden in diesem Lauf nur solche spezifischen Ergebnisse gewertet, deren Fluoreszenzanstieg um zwei Zyklen (Faktor 2^2) vor denen der Negativkontrolle erfolgte. Zum Zeitpunkt der Amplifikation des spezifischen Produktes war so die kompetitive Hemmung weitgehend zu vernachlässigen.

Bei einigen Proben traten unabhängig vom verwendeten Primer unspezifische, breite Banden unterschiedlicher Größe in der Gelelektrophorese auf. In der Schmelzkurvenanalyse zeigten diese Proben eine hohe Ausgangsfluoreszenz, verbunden mit einem relativ späten Anstieg des spezifischen Signals (Abb. 2).

Abb. 2: Kontamination mit genomischer DNA in Gel und Schmelzkurve



Diese Auffälligkeiten sprachen für die Kontamination einzelner Proben mit unspezifischer genomischer DNA, die trotz des der Nukleinsäureisolierung vorangestellten DNase Verdau in den Proben vorhanden war¹⁴. Die erhöhte Basisfluoreszenz verhindert dabei die Detektion des spezifischen Signals zu Beginn der exponentiellen Phase. Der eigentliche Moment des Überschreitens der Grundfluoreszenz wird durch die erhöhte Basisfluoreszenz überdeckt und ein vermeintlich späterer Anstieg vom Gerät erfasst, so dass falsch niedrige Werte gemessen werden. Hierdurch konnten die entsprechenden Proben ebenfalls nicht uneingeschränkt quantifiziert werden¹⁰⁸, weshalb auch sie von der Quantifizierung ausgeschlossen wurden.

4.4 Quantitative Ergebnisse der einzelnen Marker

4.4.1 IL-4 und IFN- γ

Durch die von ihnen produzierten Zytokine können T-Helferzellen dem T_H1- bzw. T_H2-Phänotyp zugeordnet werden. Das von T_H2-Zellen produzierte IL-4 mRNA konnte in Vorversuchen in dem der Arbeit zu Grunde liegenden Material mit der real-time RT-PCR nicht nachgewiesen werden, weshalb weitergehende Analysen nicht möglich waren. IFN- γ mRNA war in 33 von 42 gemessenen Proben nachweisbar. Fünf der neun negativen Ergebnisse (L29, L30, L135, L140, L144) sind auf den geringen absoluten Nukleinsäuregehalt der Proben – erkennbar an C_T-Werten des Haushaltsgens GAPDH größer oder gleich 29, entsprechend einer Größenordnung von 10⁰ Kopien/ μ l –

zurückzuführen. Aufgrund oben genannter Besonderheiten wurden 16 Proben nicht quantifiziert. Die Ergebnisse der 17 quantifizierbaren Proben zeigt Tabelle 6.

Tab. 6: Quantitative Ergebnisse IFN- γ .

N	Median	Min-Max	GM	95% CI
17	4,67	0,08-15,87	2.90	1,47-5,72

Werte angegeben in Kopien IFN- γ /1000 Kopien GAPDH. GM = Geometrisches Mittel, CI = Konfidenzintervall

4.4.2 CCR3

CCR3 wird hauptsächlich auf Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen und einer Subpopulation von T_H2-Zellen exprimiert. CCR3 konnte in acht von 37 Proben peripherer T_H-Zellen nachgewiesen werden. Bei fünf davon konnte eine Kontamination mit genomischer DNA nicht sicher ausgeschlossen werden, weshalb sie nicht quantifiziert wurden. Aufgrund dieser geringen Zahl wurde CCR3 von den statistischen Analysen ausgeschlossen (Tab. 7).

Tab. 7: Quantitative Ergebnisse CCR3.

N	Median	Min-Max
3	$9,8 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4} - 24,5 \times 10^{-4}$

Werte angegeben als $2^{(-\Delta Ct)}$

4.4.3 CCR4

CCR4 ist Rezeptor für die Liganden TARC und MDC. Er wird bevorzugt auf CD4-positiven T-Zellen vom T_H2-Phänotyp gefunden. CCR4 mRNA ließ sich in allen 42 Proben nachweisen (Tab. 8).

Tab. 8: Quantitative Ergebnisse CCR4.

N	Median	Min-Max	GM	95% CI
28	82,44	15,40 – 212,10	66,47	51,92 – 85,10

Werte angegeben in Kopien CCR4/1000 Kopien GAPDH. GM = Geometrisches Mittel, CI = Konfidenzintervall.

4.4.4 CXCR3

CXCR3 ist Rezeptor für die Chemokine IP-10, Mig und I-TAC. Er wird bevorzugt von T_H1-Zellen exprimiert. CXCR3 mRNA ließ sich in 40 von 42 Fällen nachweisen (Tab. 9).

Tab. 9: Quantitative Ergebnisse CXCR3

N	Median	Min-Max	GM	95% CI
24	13,14	2,98-66,85	13,01	8,95 – 18,91

Werte angegeben in Kopien CXCR3/1000 Kopien GAPDH. GM = Geometrisches Mittel, CI = Konfidenzintervall.

4.4.5 CCR5

CCR5 ist ein Rezeptor für die Chemokine RANTES, MIP 1- α und MIP 1- β und ist auf der Oberfläche von T-Helferzellen mit dem CD4-Antigen assoziiert. Er wird dem T_H1-Phänotyp zugeordnet. CCR5 mRNA war in allen 37 Proben nachweisbar. Da eine Kontamination mit genomischer DNA bei 15 Proben nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden diese nicht quantifiziert (Tab. 10).

Tab. 10: Quantitative Ergebnisse CCR5.

N	Median	Min-Max	GM	95% CI
22	$12,6 \times 10^{-2}$	$0,3 \times 10^{-2} - 97,4 \times 10^{-2}$	$14,07 \times 10^{-2}$	$10,05 \times 10^{-2} - 19,70 \times 10^{-2}$

Werte angegeben als $2^{-(\Delta Ct)}$. GM = Geometrisches Mittel, CI = Konfidenzintervall.

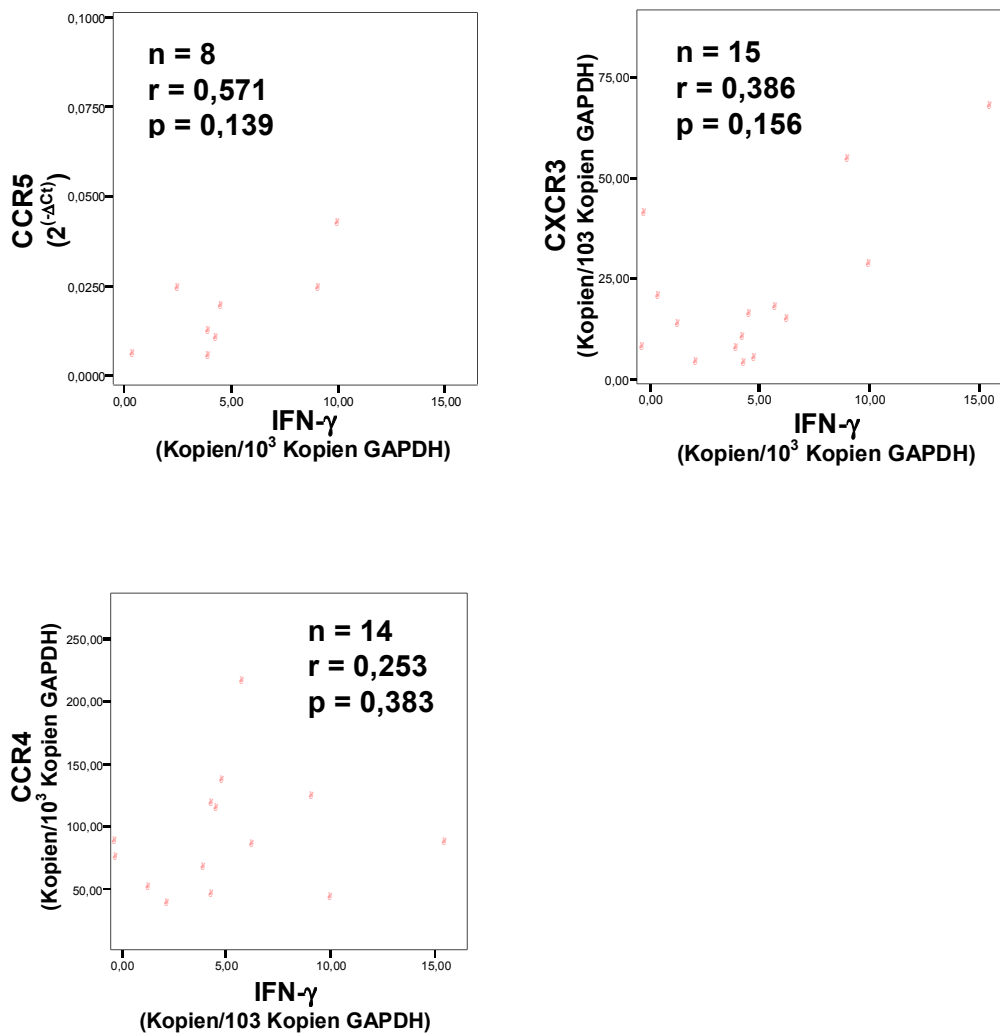
4.5 Zusammenhang der einzelnen Marker untereinander

CD4-positive T-Zellen vom T_H1-Phänotyp sind durch die Synthese der Zytokine IFN- γ und IL-2 charakterisiert. Ihnen werden die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 zugeordnet. T_H2-Zellen dagegen produzieren IL-4 und werden mit den Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR4 assoziiert. In den Versuchen sollte überprüft werden, ob eine derartige Zuordnung in peripheren T_H-Zellen mit Hilfe der real-time RT-PCR gelingt.

4.5.1 Zusammenhang von IFN- γ mit CCR4, CCR5 und CXCR3

Die mRNA Expression von IFN- γ der untersuchten T_H-Zellen zeigte einen positiven Zusammenhang mit der Expression von CXCR3 und CCR5. Die Korrelation war jedoch nicht statistisch signifikant. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen IFN- γ und CCR4 konnte nicht gefunden werden. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 7 – 9 wiedergegeben.

Abb. 7-9: Korrelation IFN- γ mit CCR5, CXCR3 und CCR4

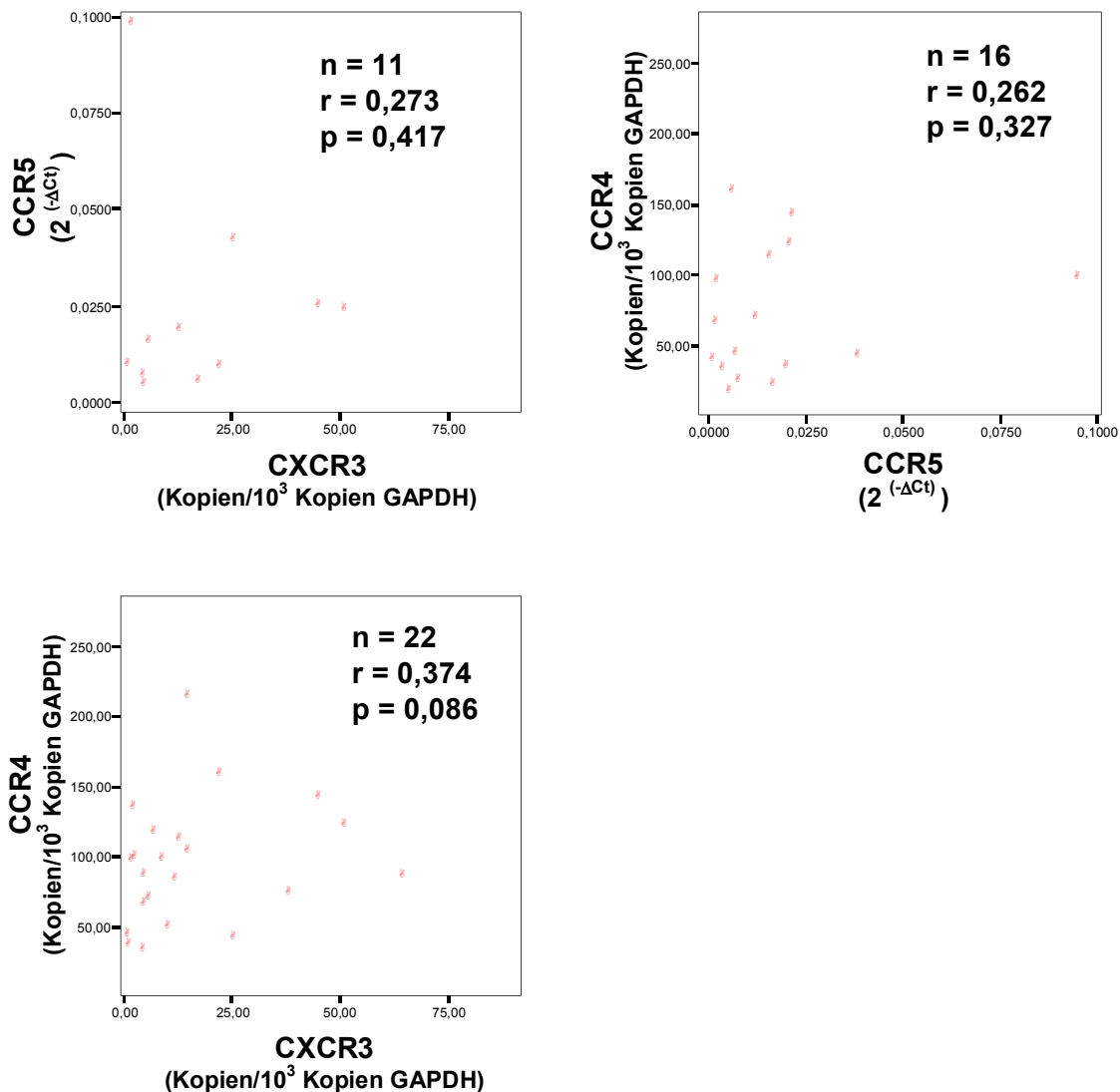


n = Anzahl der auf Korrelation untersuchten Fälle, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau bei zweiseitiger Testung.

4.5.2 Zusammenhang der Chemokinrezeptoren untereinander

Es konnte keine signifikante Korrelation der Chemokinrezeptoren untereinander festgestellt werden. Trotz der niedrigen Fallzahl lässt die graphische Darstellung einen Zusammenhang zwischen der mRNA Expression von CXCR3 und CCR5 vermuten (Abb. 10-12).

Abb. 10 – 12: Korrelationen CCR5-CXCR3, CCR4-CCR5 sowie CCR4-CXCR3



n = Anzahl der auf Korrelation untersuchten Fälle, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau bei zweiseitiger Testung.

4.6 Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit klinischen Parametern

Im nächsten Schritt sollte das mRNA-Expressionsniveau der molekularbiologischen Marker mit den Parametern elterliche Atopie, Arzt diagnose sowie Symptome einer atopischen Dermatitis, *wheezing* und der Sensibilisierung gegen häufig vorkommende Allergene verglichen werden. Ein Überblick über die Verteilung der einzelnen Parameter relativ zum Expressionsniveau ist zusammenfassend in Tabelle 11 im Anhang wiedergegeben.

4.6.1 Elterliche Atopie

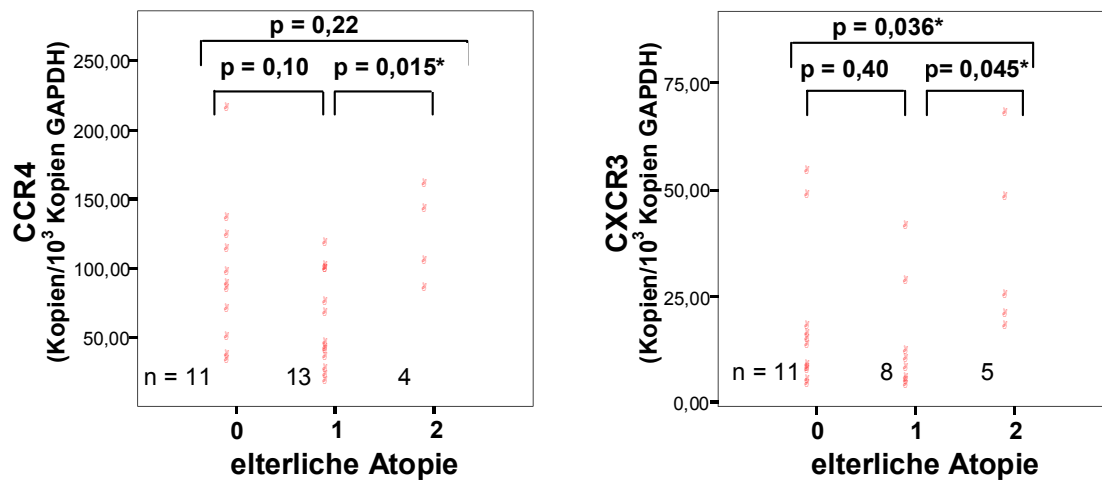
Mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens wurden Angaben zum Vorliegen von Asthma, Heuschnupfen oder Neurodermitis bei den Eltern der untersuchten Kinder (elterliche Atopie) erhoben. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied im mRNA-Expressionsniveau von CCR4 zwischen den Gruppen (s.u.). Die weiteren untersuchten Moleküle zeigte diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 12). Mit dem Kruskal-Wallis-Test war keine weitere Unterscheidung zwischen den einzelnen Gruppen untereinander möglich. Hierfür wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, und so Unterschiede bei der mRNA Expression der einzelnen Moleküle abhängig von der Ausprägung der familiären Prädisposition - keine elterliche Atopie (0) vs. ein (1) vs. beide Elternteile (2) -ermittelt. Bei CCR4 (T_H2) und CXCR3 (T_H1) zeigte sich eine signifikant höhere mRNA Expression bei Kindern mit zweifach positiver gegenüber denen mit einfach positiver Familienanamnese. Bei CXCR3 zeigte sich darüber hinaus eine signifikant höhere mRNA Expression bei Kinder mit zweifach positiver gegenüber denen mit negativer Familienanamnese (Abb 13-14). Bei den nicht abgebildeten Molekülen IFN- γ sowie CCR5 fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Tab. 12: Zusammenhang Familienanamnese und Molekularbiologie

	CCR4	CXCR3	IFN- γ	CCR5
Elterliche Atopie	n = 28 p = 0,033	n = 24 p = 0,055	n = 17 p = 0,87	n = 25 p = 0,771

n = Anzahl der untersuchten Proben, p = Signifikanzniveau nach Kruskal-Wallis

Abb. 13-14: Zusammenhang zwischen der elterlichen Atopie und der Expression von CCR4 und CXCR3



n = Anzahl der untersuchten Proben, p = Signifikanzniveau nach Mann Whitney-U, signifikante Korrelationen mit * markiert.

4.6.2 Atopische Dermatitis

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der klinischen Manifestation einer atopischen Dermatitis, ermittelt durch die Kriterien „Symptome einer atopischen Dermatitis bis zum Alter von zwei Jahren“ sowie „ärztliche Diagnose einer atopischen Dermatitis in den ersten zwei Lebensjahren“ und dem mRNA-Expressionsniveau der untersuchten Moleküle gefunden werden (Tab. 13 und 14).

Tab. 13: Zusammenhang der Diagnose AD mit der Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Diagnose AD	n = 4 (17) p = 0,428	n = 5 (23) p = 0,881	n = 7 (27) p = 0,699	n = 5 (22) p = 0,845

n = Anzahl der Kinder mit der Arzt diagnose AD, Werte in Klammern Anzahl der untersuchten Kinder, p = Signifikanzniveau (Mann-Whitney-U).

Tab. 14: Zusammenhang Symptome AD mit der Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Symptome AD	n = 4 (27) p = 0,651	n = 4 (23) p = 0,256	n = 5 (27) p = 0,708	n = 5 (24) p = 0,915

n = Anzahl der Kinder mit AD-Symptomen, Werte in Klammern Anzahl der untersuchten Kinder, p = Signifikanzniveau (Mann-Whithney-U).

4.6.3 Wheezing

Mittels standardisiertem Fragebogen wurden die Eltern nach dem Auftreten von „pfeifenden oder keuchenden Geräuschen im Brustkorb“ (*wheezing*) in den ersten zwei Lebensjahren ihrer Kinder befragt. Diese Symptome treten im Kleinkindesalter sowohl bei infektiösen als auch bei allergischen Atemwegserkrankungen auf. Bei Probanden mit oben beschriebenen Atembeschwerden zeigte sich eine signifikant höhere CCR5 mRNA Expression als bei diesbezüglich unauffälligen Probanden (p = 0,03). Aufgrund zu geringer Fallzahl an Kindern mit wheezing konnte dieser Zusammenhang bei den übrigen untersuchten Molekülen nicht untersucht werden (Tab. 15).

Tab. 15: Zusammenhang wheezing mit der Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Wheezing	n = 0 (16)	n = 1 (23)	n = 1 (27)	n = 3 (23) p = 0,03

n = Anzahl der Kinder mit wheezing, Werte in Klammern Anzahl der untersuchten Kinder, p = Signifikanzniveau (Mann-Whithney-U).

4.6.4 Nabelschnur- und Serum-IgE

Das Gesamt IgE wurde im Nabelschnurserum zum Zeitpunkt der Geburt, sowie in peripherem Serum im Alter von zwei Jahren bestimmt. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben mit nachweisbarem Nabelschnur-IgE (n = 6) wurden die Daten dichotomisiert in

„nachweisbar“ und „nicht-nachweisbar“. Zwischen den Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im mRNA-Expressionsniveau der untersuchten Chemokinrezeptoren oder IFN- γ (Tab. 16). Ebenso bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des Serum IgE-Titers und dem Expressionsniveau der oben genannten Parameter (Tab. 17).

Tab. 16: Zusammenhang Nabelschnur-IgE mit der Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
NS-IgE	n = 3 (9) p = 0,121	n = 3 (11) p = 0,414	n = 3 (12) p = 0,926	n = 3 (12) p = 0,518

n = Anzahl der Kinder mit nachweisbarem Nabelschnur-IgE, Werte in Klammern Anzahl der untersuchten Kinder, p = Signifikanzniveau (Mann-Whitney-U).

Tab. 17: Zusammenhang Serum-IgE mit der Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Serum-IgE	n = 17 r = 0,412 p = 0,1	n = 24 r = -0,298 p = 0,158	n = 28 r = 0,2 p = 0,308	n = 25 r = -0,342 p = 0,094

n = Anzahl der untersuchten Proben, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau.

4.6.5 Sensibilisierung

Bei neun Kindern wurden im Serum IgE gegen ein oder mehrere der untersuchten spezifischen Allergene nachgewiesen (siehe 4.2). Aufgrund der geringen Fallzahl der Untergruppen war eine Differenzierung zwischen den einzelnen Allergenen nicht möglich. Die Daten wurden dichotomisiert und die molekularbiologischen Ergebnisse mit den Gruppen „Sensibilisierung“ und „keine Sensibilisierung“ verglichen. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im Expressionsniveau der untersuchten Moleküle zwischen den Gruppen festgestellt (Tab. 18).

Tab. 18: Zusammenhang Sensibilisierung mit der Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Sensibilisierung	n = 4 (17) p = 0,130	n = 5 (24) p = 0,679	n = 7 (28) p = 0,604	n = 5 (25) p = 0,303

n = Anzahl der sensibilisierten Kinder, Werte in Klammern Anzahl der untersuchten Kinder, p = Signifikanzniveau (Mann-Whithney-U).

4.6.6 Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit der Exposition

4.6.6.1 Hausstaubmilben- und Katzenallergene

In der Muttermatratze gemessene Hausstaubmilben- (Der p1 + Der f1) und Katzenallergene (Fel d1) gelten als Indikatorsubstanzen für die Konfrontation des frühkindlichen Organismus mit potentiell allergenen Substanzen. Es fand sich keine signifikante Korrelation zwischen dem nachweisbaren Allergengehalt und der Höhe der Chemokinrezeptor- oder IFN- γ -mRNA Expression (Tab. 18).

Tab. 18: Zusammenhang Allergene und Expression molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Der p1 + f1	n = 16 r = 0,331 p = 0,210	n = 23 r = -0,049 p = 0,825	n = 28 r = 0,279 p = 0,150	n = 24 r = 0,336 p = 0,108
Fel d1	n = 16 r = 0,346 p = 0,189	n = 23 r = 0,377 p = 0,076	n = 28 r = -0,119 p = 0,547	n = 24 r = 0,245 p = 0,248

n = Anzahl der untersuchten Proben, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau

4.6.6.2 Endotoxin

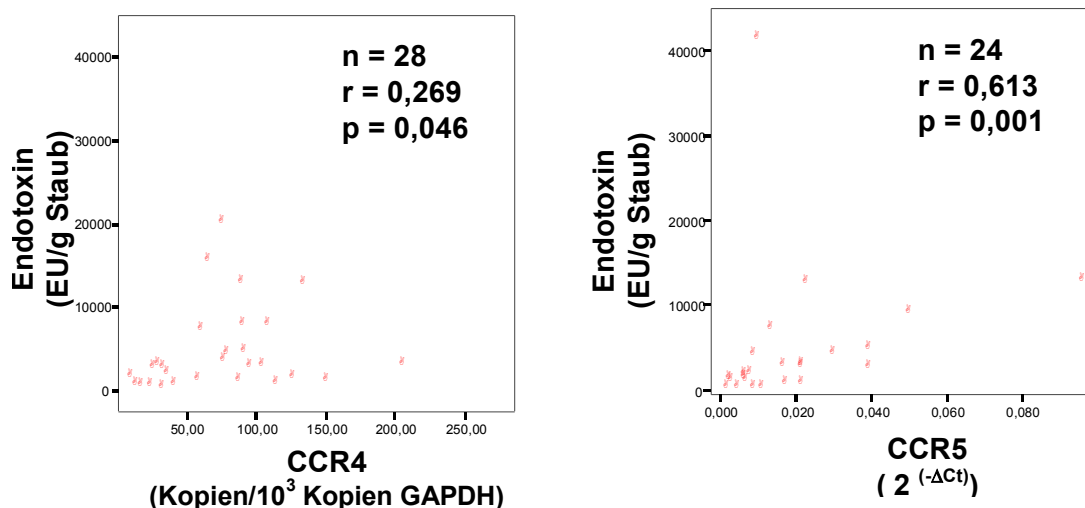
Endotoxin ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Es ist ubiquitär in der Umwelt vorhanden und findet sich regelmäßig in Hausstaub. In der Muttermatratze gemessen gilt es als Indikator für die Exposition des frühkindlichen Organismus gegenüber bakteriellen Antigenen. Die Höhe des Entotoxingehalts in der Muttermatratze korrelierte hochsignifikant mit dem mRNA-Expressionsniveau von CCR5. Ebenso fand sich eine Korrelation mit der Höhe der CCR4 mRNA Expression. Für die Moleküle CXCR3 und IFN- γ bestand dieser Zusammenhang nicht (Tab. 19 und Abb. 15 – 16).

Tab. 19: Zusammenhang Endotoxingehalt und molekularbiologischer Marker

	IFN- γ	CXCR3	CCR4	CCR5
Endotoxingehalt	n = 16 r = -0,147 p = 0,587	n = 23 r = 0,014 p = 0,950	n = 28 r = 0,269 p = 0,046	n = 24 r = 0,613 p = 0,001

n = Anzahl der untersuchten Proben, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau

Abb: 15 – 16: Endotoxingehalt und CCR4 bzw. CCR5 Expression



n = Anzahl der auf Korrelation untersuchten Fälle, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Signifikanzniveau bei zweiseitiger Testung.

5. Diskussion

5.1 Probanden

Für die Analysen standen 42 Proben der im Rahmen der LISA-Studie rekrutierten zweijährigen Kinder zur Verfügung. Die Kinder waren alle kaukasischer Abstammung, in Deutschland geboren und hinsichtlich des Geschlechts gleichmäßig verteilt. IgE im Nabelschnurblut wird häufig in niedrigen bis nicht messbaren Konzentrationen gefunden (in¹⁰⁵). In Übereinstimmung hiermit wurde das Gesamt-IgE bei 28,6% (6/21) unserer Probanden nachgewiesen mit einem Median von 0,58 kU/l. Bei 15,4% (6/39) wurde im Alter von zwei Jahren ein erhöhtes Gesamt-IgE gemessen. Dies deckt sich mit der in der Literatur angegebenen Prävalenz von 5-35% in der Altersgruppe der bis sechsjährigen Kinder (in¹⁰⁵). Bei 21,4% (9/42) der Probanden wurde spezifisches IgE gegen mindestens ein Allergen nachgewiesen. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen der MAS-Studie¹¹⁵, die eine Prävalenz von 25% in dieser Altersgruppe ermittelte. Erwartungsgemäß hatten eine geringe Anzahl der Kinder eine manifeste Klinik. Bei acht Kindern (19%) wurde in den ersten zwei Lebensjahren durch einen Arzt die Diagnose einer atopischen Dermatitis gestellt, oder von den Eltern Symptome einer atopischen Dermatitis beobachtet. Dies entspricht der Prävalenz der atopischen Dermatitis in dieser Altersgruppe⁹⁹. Wheezing wird ebenfalls bei 10 - 20% der zweijährigen Kinder beobachtet¹⁰⁹. Die geringe Anzahl von drei für dieses Merkmal positiven Kindern (7%) in der untersuchten Population schränkt die Aussagekraft der diesbezüglich erhaltenen Ergebnisse ein. Asthma als eigenständige Diagnose unabhängig des Symptomenkomplexes *wheezing* wird in der untersuchten Altersgruppe in nur bis zu 1 % gestellt (in¹⁰⁵) und wurde daher bei den Untersuchungen nicht berücksichtigt. Oben genannte Ergebnisse belegen trotz relativ kleiner Fallzahlen den Charakter eines repräsentativen Normalkollektivs der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Population.

5.2 Real-time RT-PCR auf dem LightCycler

Die Aufbereitung der Proben und insbesondere die Verwendung des LightCycler für die real-time RT-PCR hat zu einer deutlichen Verringerung der quantifizierbaren Proben geführt. Darüber hinaus war die Methode der quantitativen real-time RT-PCR bei Etablierung der Versuchsanordnung ein relativ neues Verfahren. Daher sollen im

Folgendes die Besonderheiten der Methode und die im Verlauf der Arbeit aufgetretenen Probleme diskutiert werden.

Die Methode der quantitativen real-time RT-PCR bietet die Möglichkeit, durch Fluoreszenzmessung die Zunahme des Produktes während der PCR „online“ zu verfolgen und das Amplifikat relativ zu einem mitgeführten Standard zu quantifizieren. Durch Bestimmen der *intra-assay* Variabilität wurde die Reproduzierbarkeit der einzelnen Ergebnisse innerhalb eines Laufes überprüft. Hierbei zeigten Proben mit relativ hohen Ausgangskopienzahlen (im Bereich 10^2 bis 10^3 /Probe) eine hohe Reproduzierbarkeit (*intra-assay* Variabilität: GAPDH $r = 0,95$, CCR4 $r = 0,96$, CXCR3 $r = 0,96$). In geringer Menge transkribierte Gene (im Bereich 10^0 bis 10^1 /Probe) hatten eine niedrigere Reproduzierbarkeit (*intra-assay* Variabilität IFN- γ $r = 0,85$). Die in der Literatur durchwegs angegebene hohe Reproduzierbarkeit bei der Verwendung von Sonden gerade im Bereich geringer Ausgangskopienzahl^{77,122} konnte in unseren Experimenten mit dem TaqMan nicht bestätigt werden (*intra-assay* Variabilität CCR5 $r = 0,60$). Die mit dem TaqMan ermittelten C_t -Werte für CCR5 lagen alle in einem relativ engen Bereich (C_t 31-36) verglichen mit den auf dem LightCycler gemessenen Proben (z.B. CCR4 C_t 23-32). Diese Tatsache hat zu einer rein rechnerisch geringeren Korrelation beigetragen.

In unseren Versuchen zeigte sich bei einer nicht unerheblichen Anzahl von Proben trotz eines der RNA-Präparation vorangestellten DNase-Verdau eine Kontamination mit genomischer DNA. Ein starker DNase-Verdau birgt gerade bei geringen Mengen an Ausgangsmaterial die Gefahr eines RNA-Verlustes. Jeder DNase-Verdau stellt daher einen Kompromiss dar und eine Kontamination ist häufig unvermeidbar¹⁴. In unseren Versuchen kam es ebenso zum Auftreten von unspezifischen Primer-Oligomeren. Diese traten vor allem auf, wenn die zu amplifizierende cDNA-Sequenz in geringer Menge vorhanden war. Trotz der Verwendung einer hitzeaktivierten Taq Polymerase⁶⁷, sowie der Technik der *touchdown* PCR¹⁰³ ließ sich die Spezifität der PCR-Reaktion bei der Analyse von IFN- γ nicht erhöhen.

Aufgrund der oben genannten Einschränkungen wurden für die Quantifizierung ausschließlich Proben verwendet, die eine für die gesuchte Sequenz spezifische Schmelzkurve und ein spezifisches Produkt in der Gelelektrophorese aufwiesen. Lagen Primer-Dimere in der Negativ-Kontrolle eines Laufes vor, wurden nur solche Proben quantifiziert, deren spezifisches Signal deutlich vor dem der Negativ-Kontrolle gekommen war (Faktor 2^2). So konnte eine Beeinträchtigung der Quantifizierung durch unspezifische Nebenprodukte weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Sensitivität bei der Verwendung von SYBR Green wird in der Literatur auf dem LightCycler im Bereich von bis zu einer Kopie/Probe angegeben⁶⁷. Unter Verwendung einer

externen Standardkurve zur Quantifizierung wurde dies in unseren Experimenten bestätigt. Theoretisch wird jedoch in einem Bereich von einer Kopie/Probe aufgrund der Poisson'schen Verteilung in nur maximal 63% der Fälle dieses Ergebnis erreicht⁶⁷. Darüber hinaus ist hier der Einfluss von Ungenauigkeiten beim Pipettieren und Ansetzen der Verdünnungen besonders groß. Dies erklärt die relativ geringe Reproduzierbarkeit in diesem Bereich. Die Spezifität des Ergebnisses wurde jedoch durch Schmelzkurvenanalyse und Gele belegt.

Zur Quantifizierung standen zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die *second derivative maximum*-Methode wird vom Hersteller bei der Verwendung von Proben mit mehr als 1000 Kopien empfohlen⁹³. Bei dem sogenannten *fit points*-Verfahren hat der Benutzer die Möglichkeit, ein Fluoreszenzniveau selbst festzulegen, bei dem sich alle Proben und Standards in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden und eine identische Fluoreszenzintensität aufweisen. Diese Benutzer-definierte Methode erlaubt die Quantifizierung von Proben mit einer Kopienanzahl kleiner 1000⁹³, und wurde von uns angewandt. Das Verwenden einer extern generierten, für alle Läufe gleichen Standardkurve barg durch Mittelung der Einzelwerte das Risiko einer ungenauen Quantifizierung. Die geringe Standardabweichung der Mittelwerte belegte hierbei jedoch die hohe Reproduzierbarkeit und somit die Aussagekraft der externen Standardkurve. Die relativ hohe Variabilität der Ergebnisse von niedrig transkribierten Genen wie IFN- γ führte zu einer relativ hohen Variabilität in der absoluten Quantifizierung dieser Proben. Die Tatsache, dass die Ergebnisse der einzelnen Proben untereinander alle im Bereich 10^0 bis 10^1 und damit sehr nahe beieinander lagen, reduzierte die Aussagekraft der absoluten Quantifizierung in diesem Bereich.

Zusammenfassend kamen wir zu dem Ergebnis, dass aufgrund oben genannter Beobachtungen die absolute Quantifizierung niedrig transkribierter Gene mit Vorsicht zu werten ist. Darüber hinaus muss betont werden, dass trotz der Möglichkeit der Schmelzkurvenanalyse bei Verwendung von SYBR Green auf dem LightCycler zur Überprüfung von Reinheit und Spezifität des Amplifikats eine Gelelektrophorese unerlässlich ist.

5.3 Quantitative Ergebnisse der einzelnen Marker

5.3.1 IFN- γ

IFN- γ ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und wird bevorzugt in einem T_H1-dominierten Milieu von T-Helferzellen sezerniert. Die Literatur kommt beim Nachweis von IFN- γ in peripherem Blut zu unterschiedlichen Ergebnissen, was in erster Linie auf erhebliche methodische Unterschiede zurückzuführen ist. Kim et al.⁴⁸ konnten mit durchflusszytometrischer Analyse IFN- γ intrazellulär in 10% der peripheren T_H-Zellen erwachsener Probanden nachweisen. Mit Hilfe der real-time RT-PCR fanden Kruse et al. 10¹ Kopien IFN- γ /10⁶ Kopien β -Actin in unstimuliertem Vollblut⁵². Hartel et al. gelang der Nachweis von 10⁰ – 10⁴ Kopien IFN- γ /10⁶ Kopien β -Actin in unstimulierten PBMC³⁷. Nanki et al.⁷³ gelang hingegen vor Stimulation mit Hilfe der Einzel-Zell-PCR kein Nachweis von IFN- γ mRNA in peripheren CD4-positiven Gedächtniszellen. Wir konnten IFN- γ in 33 von 42 Proben nachweisen. Die 17 quantifizierbaren Proben hatten 10⁰ bis 10¹ Kopien/10³ Kopien GAPDH, so dass von einer niedrigen basalen Expressionsrate ausgegangen werden kann. Dieses Ergebnis erscheint vor dem Hintergrund plausibel, dass in peripherem, unstimuliertem Blut nur ein sehr geringer Anteil an Effektor T_H1-Zellen vorhanden ist, die Mehrheit jedoch aus nicht-polarisierten T_H-Zellen besteht, die kein IFN- γ produzieren⁴⁸.

5.3.2 CCR3

CCR3 ist der Rezeptor für Eotaxin, RANTES, MCP-1 und MCP-4. Dabei ist Eotaxin der potenteste Ligand mit der höchsten Selektivität für CCR3⁶⁸. In bronchialen Biopsien von Asthmatikern^{123,124} sowie in Hautbiopsien von Patienten mit atopischer Dermatitis¹²¹ wurde eine erhöhte Protein- und mRNA Expression von Eotaxin und RANTES nachgewiesen. CCR3 wurde in den untersuchten Biopsien hauptsächlich auf eosinophilen Granulozyten exprimiert, jedoch auch auf T-Zellen in deren direkter Nachbarschaft³¹. Deshalb wurde für die Interaktion CCR3 / Eotaxin eine funktionelle Rolle bei der T-Zell-Rekrutierung sowie Aktivierung eosinophiler Granulozyten bei allergischen Entzündungsreaktionen postuliert. Sallusto et al. wiesen eine hohe Anzahl CCR3+ Zellen in einer *in vitro* generierten T_H2-Zelllinie aus humanen Nabelschnurblut nach, auf unter T_H1-Bedingungen generierten T_H-Zellen jedoch nicht. Hieraus wurde auf eine selektive Expression von CCR3 auf T_H2-Zellen geschlossen⁹⁸. In peripheren, unstimulierten Zellen fand sich CCR3 auf ca. 1% aller CD4⁺-Zellen⁹⁸. Rabin et al.⁹⁰ konnten CCR3 auf naiven (CD45RA+) humanen T_H-Zellen mit der FACS-Analyse nicht nachweisen. Okazaki et al. gelang dies ebenfalls nicht auf peripheren unstimulierten T_H-Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis⁷⁶. Patel et al.⁸³ wiesen mittels real-time RT-PCR CCR3 in peripheren, humanen Lymphozyten in einer Größenordnung von 10¹ Kopien/ng RNA nach. Diesem Ergebnis lag eine Fallzahl von n = 3

zugrunde, und es erfolgte keine weitere Differenzierung der Lymphozytensubpopulationen. In der vorliegenden Arbeit konnte in acht von 37 Proben CD4-positiver Zellen eine niedrige Expression von CCR3 nachgewiesen werden, wovon bei drei eine quantitative Aussage möglich war. Die CCR3-exprimierenden T-Helferzellen werden in der Literatur als ausdifferenzierte⁹⁰ Gedächtniszellen (CD45RO+)⁹⁷ beschrieben. Oben genannte Ergebnisse deuten auf eine spezifische Rolle CCR3-positiver T_H-Zellen bei der Rekrutierung und / oder Aktivierung eosinophiler Granulozyten am Ort einer allergischen Entzündungsreaktion hin, und bieten eine mögliche Erklärung für die geringe bis fehlende periphere Expression in der vorliegenden Arbeit.

5.3.3 CCR4

CCR4 ist der Rezeptor für die Liganden TARC und MDC. *In vitro* wurde eine Assoziation von CCR4 mit IL-4 produzierenden T_H-Zellen beschrieben^{10,21,79}, und eine selektive Expression dieses Rezeptors auf T_H2-Zellen propagiert. In Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis¹¹¹, sowie in unspezifisch entzündlich veränderter Haut¹⁵ fand sich eine vermehrte Einwanderung CCR4+ T_H-Zellen. Gleichzeitig wurden die CCR4-Liganden TARC und MDC auf Keratinozyten¹¹¹, dermalen Fibroblasten, dendritischen Zellen¹¹⁴ sowie Gefäßendothelzellen¹⁵ in Hautbiopsien bei atopischer Dermatitis nachgewiesen, und der Interaktion CCR4-positiver T_H-Zellen mit CCR4-Liganden funktionelle Bedeutung bei der Pathogenese der atopischen Dermatitis beigemessen. In peripherem Blut wurde CCR4 bei Patienten mit atopischer Dermatitis auf einem erhöhten Prozentsatz CD4-positiver T-Zellen exprimiert^{75,111}. Bei Kindern wurde eine positive Korrelation der Serumkonzentration des CCR4-Liganden MDC mit dem klinischen Schweregrad einer atopischen Dermatitis⁵⁵ festgestellt. CCR4 wird überwiegend auf CD4-positiven Gedächtniszellen gefunden^{4,48}. Der Rezeptor ist auf peripheren T_H-Zellen mit der Expression des kutanen Lymphozyten Antigen CLA unabhängig vom Vorliegen eines aktiven Entzündungsmilieus assoziiert¹⁵. Matsumoto et al. fanden in peripheren unstimulierten CD3-positiven T-Zellen gesunder Probanden sowie Patienten mit atopischer Dermatitis CCR4 mRNA in einer Größenordnung von 10³-10⁴ Kopien / ng RNA⁶⁶. In der vorliegenden Arbeit wurde CCR4 bei allen 42 Probanden nachgewiesen. Die Expression lag in einer Größenordnung von 10¹-10² Kopien / 10³ Kopien GAPDH. In Verbindung mit oben genannten Ergebnissen ist dieses relativ hohe Expressionsniveau in peripheren, unstimulierten T-Helferzellen unseres Kollektivs mit der funktionellen Rolle von CCR4 und seinen Liganden bei Zellwanderungsprozessen zwischen lymphatischem Gewebe und der Haut vereinbar.

5.3.4 CXCR3 und CCR5

Die Rezeptoren CXCR3 und CCR5 sind an der entzündungsabhängigen Rekrutierung von T-Zellen beteiligt. CXCR3 bindet die Liganden IP-10, Mig und I-TAC⁶⁸. CCR5 ist der Rezeptor für die Chemokine RANTES, MIP-1 α sowie MIP-1 β ⁶⁸. Beide Rezeptoren werden hauptsächlich auf CD4-positiven Gedächtniszellen exprimiert⁸⁹. Nach Interaktion mit ihren Liganden konnte für beide Rezeptoren die Induktion einer Integrin-vermittelten Gefäßwandadhäsion gezeigt werden⁸⁴, welche die Einwanderung CXCR3- und CCR5-positiver T-Zellen in entzündete Gewebe ermöglicht. Zahlreiche Arbeiten haben die *in vitro* und *in vivo* Assoziation von CXCR3 und CCR5 mit Krankheiten untersucht, für die eine T_H1-vermittelte Immunantwort belegt ist. Oben genannte Rezeptoren wurden auf T-Zellen in Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nachgewiesen⁸⁹. Ebenso fanden sich bei der Hepatitis C die Rezeptoren vermehrt auf Gewebe-infiltrierenden T-Zellen¹⁰². In Hirnläsionen von Patienten mit Multipler Sklerose ließen sich ebenfalls vermehrt CXCR3- und CCR5-positiv T-Zellen nachweisen. In der gleichen Arbeit wurde darüber hinaus ein zur Kontrollgruppe größerer Anteil peripherer CXCR3-positiver T_H-Zellen im Blut von an Multiple Sklerose erkrankten Patienten beschrieben⁶. Eine basale Expression auch in Abwesenheit aktiver Entzündungsprozesse ist durch den konstanten Nachweis von CCR5 und CXCR3 in peripheren Lymphozyten belegt: CCR5 und CXCR3 konnten auf 15% respektive 35% aller peripheren CD3+ Lymphozyten nachgewiesen werden⁸⁹, sowie auf 35% respektive 50% aller peripheren CD4+ Gedächtniszellen⁴⁸. Patel et al. wiesen CCR5 mRNA in peripheren T-Zellen in einer Größenordnung von 10⁰ Kopien/ng RNA nach⁸³. In der vorliegenden Arbeit konnte bei allen untersuchten Probanden eine CCR5 Expression festgestellt werden. Ebenso gelang der Nachweis von CXCR3 mRNA in einer Größenordnung von 10⁰-10² Kopien/10³ Kopien GAPDH.

5.4 Zusammenhang der molekularbiologischen Marker untereinander

Verschiedene Arbeiten haben eine Assoziation bestimmter Chemokinrezeptoren mit Zellen des T_H1- und T_H2-Phänotyps propagiert. Hinter diesem Modell stand die Überlegung, dass durch die Expression eines spezifischen Chemokinrezeptormusters polarisierte T-Zellen mit unterschiedlicher Effektorfunktion in verschiedene Gewebe auswandern können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Korrelation der mRNA-Expression von IFN- γ mit der von

CXCR3 und CCR5 gefunden. Ebenso fand sich eine Assoziation zwischen der mRNA Expression von CXCR3 und CCR5. Diese Zusammenhänge waren jedoch nicht statistisch signifikant. Eine negative Korrelation zwischen CCR4 und IFN- γ bzw. CCR5 oder CXCR3 wurde nicht festgestellt. Mehrere Studien^{10,59,70,97} fanden nach *in vitro* Stimulation von T-Zellen unter T_H1-polarisierenden Bedingungen ebenfalls eine Assoziation von CCR5 und CXCR3 mit IFN- γ produzierenden Zellen. Demgegenüber fand sich nach Stimulation unter T_H2-polarisierenden Bedingungen eine Assoziation von CCR4 mit IL-4 produzierenden Zellen, welche nur zu einem geringen Teil die Rezeptoren CXCR3 und CCR5 exprimierten^{21,97}. Wie unter 5.3.4. ausgeführt, wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Assoziation von CXCR3 und CCR5 mit T_H1-assoziierten Erkrankungen festgestellt^{6,89,102}. Die Assoziation von CCR4 und seinen Liganden TARC und MDC mit IL-4-produzierenden T_H2-Zellen *in vitro*^{28,79} sowie mit T_H2-assoziierten Krankheiten *in vivo*^{28,71,76} ist in der Literatur mehrfach belegt. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Kollektiv konnte IL-4 in Vorversuchen mit Hilfe der real-time RT-PCR nicht nachgewiesen werden, weshalb zu diesem Zusammenhang keine Aussagen möglich sind.

Für das Fehlen eines eindeutigen Expressionsmusters in der vorliegenden Arbeit bieten sich eine Reihe möglicher Erklärungen: Periphere unstimulierte CD4-positive Zellen bestehen zu einem großen Anteil aus nicht-polarisierten T_H-Gedächtniszellen, die aufgrund fehlender IFN- γ - oder IL-4-Produktion weder dem T_H1- noch dem T_H2-Phänotyp zugerechnet werden können. In einer Arbeit zur Oberflächenexpression auf Einzelzellebene kamen Kim et al. zu dem Ergebnis, dass bis zu 80% aller peripheren, unstimulierten CCR4-positiven T_H-Zellen, sowie 50% aller CXCR3- und 45% aller CCR5-positiven Zellen weder dem T_H1- noch dem T_H2-Phänotyp zuzuordnen sind. Daneben fanden sich CCR4-positive T_H1-Zellen sowie CXCR3-positive T_H2-Zellen⁴⁸. Andrew et al. fanden mittels FACS-Analyse in peripheren unstimulierten CD4+ Zellen 5% CCR5/CCR4- sowie 11% CXCR3/CCR4-doppelt positive Zellen⁴. Diese Daten stehen zu der vorwiegend durch *in vitro* Versuche etablierten Zuordnung bestimmter Chemokinrezeptoren zum T_H1- oder T_H2-Phänotyp in Widerspruch. Es ist möglich, dass die unterschiedlichen *ex vivo* Stimulationen der Zellen ausschlaggebender für die Ausbildung des Phänotyps waren, als deren ursprüngliche Funktion. So konnten Loetscher et al.⁵⁹ nach Stimulation klonierter T_H-Zellen mit IFN- γ eine signifikant höhere Anzahl CCR5-positiver Zellen nachweisen, Sallusto et al.⁹⁷ hingegen nur nach Kostimulation mit IL-2. Die Stimulation naiver peripherer T_H-Zellen mit dem anti-CD3-Antikörper OKT3 führte bei Annunziato et al.⁵ zur vermehrten CCR4-Expression, bei Rabin et al.⁹⁰ hingegen nicht. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf unterschiedliche kostimulatorische Signale infolge verschiedener Stimulationsprotokolle oder auf unterschiedliche Ausgangspopulationen der verwendeten CD4+ Zellen zurückzuführen.

Neuere Daten sprechen ferner dafür, dass die klare funktionelle Trennung peripherer CD4+ Zellen in den T_H1- und T_H2 Phänotyp und damit ein ihnen zugeordnetes Chemokinrezeptormuster eine Vereinfachung darstellt. Dies belegen Daten, die zeigen, dass ein verminderter Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf T_H1- und T_H2- Zellen, und nicht ein Übergewicht des einen Phänotyps über den anderen zur Ausbildung allergischer bzw. autoimmuner Reaktionen führen kann^{16,35,50,96,100,110}.

In Einklang mit der Literatur weisen die Daten der vorliegenden Arbeit jedoch auf eine Assoziation der Rezeptoren CXCR3 und CCR5 mit IFN- γ produzierenden T_H1-Zellen *in vivo* in unstimulierten, peripheren Zellen hin.

5.5 Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit klinischen Parametern

5.5.1 Elterliche Atopie

Es wird eine starke Assoziation zwischen elterlicher Atopie und dem kindlichen Risiko, Erkrankungen des atopischen Formenkreises zu entwickeln, angenommen¹¹⁷. Das Vorliegen von Asthma bei beiden Elternteilen hatte in einer Arbeit von Martinez et al. einen positiv prädiktiven Wert von 60% für das Auftreten von Asthma bei den Kindern bis zum Alter von sechs Jahren⁶³. Dem gegenüber steht die Tatsache, dass die meisten Kinder mit atopischen Manifestationen aus Familien mit negativer Familienanamnese kommen⁷. Auf molekularer Ebene konnten Holt et al.⁴³ eine verminderte IFN- γ Produktion von T-Zellklonen aus Nabelschnurblut von Kindern mit positiver atopischer Familienanamnese im Vergleich zu Kindern mit negativer Familienanamnese zeigen. Entwickelten diese Kinder in den ersten Lebensjahren eine atopische Dermatitis so wurden nach *in vitro* Stimulation peripherer T_H-Zellen dieser Kinder weiterhin verminderte IFN- γ Spiegel gemessen. Manifestierte sich keine Dermatitis, erreichten die IFN- γ Spiegel im Vergleich zu T_H-Zellen gesunder Erwachsener gleich hohe Spiegel. Dies wurde als verzögerte Entwicklung eines protektiven T_H1 Phänotyps interpretiert⁸⁷. Der Einfluss der elterlichen Atopie auf die kindliche Chemokinrezeptorexpression peripherer T-Helferzellen wurde bislang nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Korrelation zwischen der CCR4 mRNA Expression in peripheren unstimulierten T_H-Zellen und der elterlichen Atopie festgestellt (Kruskal-Wallis Test). Kinder mit einfach positiver Familienanamnese hatten eine geringere mRNA Expression von CCR4 als Kinder mit negativer Familienanamnese. Kinder mit doppelt positiver Familienanamnese hatten jedoch eine signifikant höhere CCR4 mRNA Expression als Kinder mit einfach positiver Familienanamnese. Für CXCR3 wurde ebenfalls eine geringere mRNA Expression bei Kindern mit einfach positiver

Familienanamnese gegenüber denen mit negativer Familienanamnese gefunden. Kinder mit doppelt positiver Familienanamnese hatten jedoch eine signifikant höhere CXCR3 mRNA Expression gegenüber Probanden mit negativer oder einfach positiver Familienanamnese. Zu beobachten war darüber hinaus ein Fehlen der Proben mit der geringsten mRNA Expression von sowohl CCR4 als auch CXCR3 in der Gruppe mit zweifach positiver Familienanamnese. Diese Ergebnisse könnten auf eine vermehrte basale Expression sowohl T_H1- als auch T_H2-assoziiierter Chemokinrezeptoren auf T_H-Zellen im peripheren Blut von Hochrisiko-Kindern hindeuten. Der beschriebene intrinsische T-Zell-Defekt bei Kindern mit atopischer Prädisposition, der zu einer geringeren IFN- γ Expression gegenüber nicht-prädisponierten Kindern führt^{43,86,87}, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse waren ausschließlich durch *in vitro* Stimulation von Nabelschnurblut- oder peripheren T-Zellen generiert worden, was möglicherweise eine Verzerrung, sicher aber eine Verstärkung der *in vivo* Situation zur Folge hatte. In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Ausgangsmaterial, in dem eine niedrige basale *in vivo* IFN- γ mRNA Expression nachgewiesen wurde, konnte deshalb eine fehlende T_H1-Polarisierung anhand von IFN- γ nicht gezeigt werden.

5.5.2 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung von genetisch prädisponierten Menschen. Sie ist meist die erste Manifestation einer Erkrankung des atopischen Formenkreises und hat eine Prävalenz von 15-20% bei zweijährigen Kindern. Damit ist sie die häufigste Hauterkrankung in dieser Altersgruppe⁸. Ein Ungleichgewicht zwischen dem T_H1- und dem T_H2-Phänotyp mit überwiegender Aktivierung und Rekrutierung von T_H2-Zellen gilt als entscheidender Pathomechanismus. Nach einem Modell von Grewe et al.³⁴ überwiegen initial allergen-spezifische T_H2-Zellen. Die hierdurch aktivierten und rekrutierten Eosinophilen und Makrophagen produzieren IL-12, was wiederum zur Aktivierung von allergen-spezifischen und -unspezifischen Zellen des T_H1-Phänotyps führt. Hierdurch könnte es im chronischen Stadium der Erkrankung zu einem Entzündungsmilieu von T_H1- als auch T_H2-assoziierten Zytokinen, Chemokinen und ihren Rezeptoren kommen¹¹¹. In zahlreichen Arbeiten wurden im peripheren Blut erwachsener Patienten mit atopischer Dermatitis signifikant mehr IL-4-positive⁷² sowie signifikant weniger IFN- γ -positive T_H-Zellen² gefunden. In einer Arbeit wurden unstimulierte, periphere T-Zellen ein- bis fünfjähriger Kinder untersucht. Dabei wurde ein unveränderter IFN- γ mRNA Gehalt bei gleichzeitig verminderter IFN- γ Proteinexpression bei hautkranken Kindern im Vergleich

zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt, und ein post-transkriptionellen Proteinsynthesedefekt als Ursache vermutet⁵¹. Bei Erwachsenen mit Neurodermitis konnten signifikant mehr periphere CCR4-positive T_H-Zellen^{71,111,120} sowie erhöhte Serumspiegel seiner Liganden TARC¹¹¹ und MDC²⁸ nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Rezeptoren CCR5 sowie CXCR3 findet man widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits wurden diese auf signifikant weniger peripheren T_H-Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis gefunden^{76,120}, andererseits zeigte sich in einer Arbeit eine signifikante positive Korrelation der CCR5-Oberflächenexpression peripherer T_H-Zellen mit dem klinischen Schweregrad (*skin eruption score*) des atopischen Ekzems⁷⁶. Andere⁷¹ fanden keinen Unterschied in der Oberflächenexpression von CXCR3 bei Patienten mit bzw. ohne atopische Dermatitis. Zur Chemokinrezeptorexpression bei Kindern mit atopischer Dermatitis liegen bislang keine Daten vor. Leung et al. fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Serumkonzentration der CCR4-Liganden MDC und TARC und dem Schweregrad der atopischen Dermatitis, wohingegen eine Korrelation des CXCR3-Liganden IP-10 hiermit nicht gelang⁵⁵. In einer Arbeit von Frezzolini et al. zeigten sich signifikant höhere Serumkonzentrationen des CCR5-Liganden RANTES bei Kindern mit atopischem Ekzem gegenüber gesunden Kindern²⁷. Aufgrund der Promiskuität der Chemokine gegenüber ihren Rezeptoren lassen oben genannte Ergebnisse allerdings keine direkten Schlüsse auf die Chemokinrezeptorexpression zu. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation der mRNA Expression von IFN- γ und der Chemokinrezeptoren CCR4, CCR5 und CXCR3 mit der ärztlichen Diagnose einer atopischen Dermatitis oder mit von den Eltern beobachteten Symptomen einer atopischen Dermatitis gefunden werden. Es ist möglich das Veränderungen des Chemokinrezeptormusters in peripherem Blut erst bei langer und schwerer Krankheitsdauer messbar sind. So wurde eine Korrelation zwischen CCR4 und dem Vorliegen eines atopischen Ekzems als umso höher beschrieben, je schwerer die Krankheit ausgeprägt war⁷¹.

5.5.3 Wheezing

Wheezing ist das klinische Korrelat einer Bronchokonstriktion verbunden mit entzündlichen Atemwegsveränderungen⁸⁰. Ätiologisch kommen hierfür im Wesentlichen infektiöse und allergische Atemwegserkrankungen in Betracht, wobei die klinische Differenzierung bei Kindern im Alter von zwei Jahren schwierig ist⁴⁹. Der Zusammenhang der peripheren Zytokin- und Chemokinrezeptorexpression auf T_H-Zellen bei Kindern mit dem Symptomenkomplex „wheezing“ wurde bislang kaum untersucht. Aufgrund zu geringer

Fallzahlen konnte der Zusammenhang zwischen wheezing und den Molekülen IFN- γ sowie CCR4 und CXCR3 in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von wheezing und der CCR5 mRNA Expression peripherer unstimulierter T_H-Zellen festgestellt. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist aufgrund der kleinen Fallzahl (n = 3/23) stark eingeschränkt. Möglich wäre jedoch eine durch virale Infektionen induzierte Expansion der CCR5-positiven Subpopulation peripherer T_H-Zellen vom T_H1-Phänotyp oder ein erhöhtes Aktivitätsniveau dieser Zellen. Dies erscheint vor dem Hintergrund plausibel, dass in den ersten drei Lebensjahren wheezing ohne gleichzeitiges Auftreten von Atemwegsinfekten selten ist¹¹⁹. Das die frühe Ausprägung eines T_H1-Phänotyps einen protektiven Effekt auf die spätere Entwicklung asthmatischer Beschwerden hat, lässt eine aktuelle epidemiologische Studie vermuten, die das Auftreten mutmaßlich viral induzierter rhinitischer Symptome im ersten Lebensjahr als protektiv für die spätere Entwicklung von Asthma identifizierte⁵³. Zur weiteren Beurteilung dieses Zusammenhanges müssen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten an einer größeren Stichprobe untersucht werden.

5.5.4 IgE

Die Quervernetzung von auf der Mastzelloberfläche gebundenem IgE durch Allergene und die damit verbundene Freisetzung vasoaktiver und inflammatorischer Substanzen ist ein zentraler Prozess im Pathomechanismus allergischer Reaktionen⁴⁴. Bei der klinischen Interpretation von IgE wird zweierlei unterschieden: Das Gesamt-IgE im Serum zur Beurteilung der allergischen Disposition eines Organismus sowie das spezifisch gegen einzelne Allergene gerichtete IgE als Ausdruck der individuellen Sensibilisierung. Die Aussagekraft von erhöhtem Gesamt-IgE im Nabelschnurblut Neugeborener als prognostischer Parameter hinsichtlich der Ausbildung eines atopischen Phänotyps wird kontrovers diskutiert. Magnusson et al. ermittelten einen positiv prädiktiven Wert von 72% von erhöhtem Nabelschnur-IgE hinsichtlich der Ausbildung atopischer Symptome im Alter von 18 Monaten, und schrieben diesem eine hohe Aussagekraft zu⁶². Hansen et al. fanden bei gleicher Fragestellung einen positiv prädiktiven Wert von nur 21%³⁶. Rinas et al. fanden in Nabelschnurblut eine verminderte *in vitro* IFN- γ Produktion bei Kindern atopischer Eltern unabhängig von der Höhe des Nabelschnur-IgE⁹¹. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der CCR4-Liganden MDC und TARC sowie der CXCR3-Liganden IP-10 und MCP-1 in Nabelschnurblut unabhängig von der Höhe des dort gemessenen Gesamt-IgE waren⁵⁶. Der Zusammenhang zwischen der Höhe des Nabelschnur-IgE und der Zytokin-

sowie Chemokinrezeptorexpression im Alter von zwei Jahren wurde bisher nicht untersucht. Wir konnten keine Korrelation zwischen diesen Parametern feststellen.

In der vorliegenden Arbeit bestand keine Korrelation zwischen der IFN- γ mRNA-Expression und dem Gesamt- oder spezifischen IgE im Alter von zwei Jahren. Dies ist im Einklang mit Daten von Borres¹¹, Koning⁵¹ und Esnault et al.²⁴. Für die periphere Oberflächenexpression von CCR4 auf T_H-Zellen konnte eine signifikante Korrelation mit dem Serum Gesamt-IgE bei Patienten mit atopischer Dermatitis gezeigt werden, für CXCR3 und CCR5 hingegen nicht^{71,76}. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen der peripheren mRNA-Expression von CCR4, CCR5 und CXCR3 unstimulierter T_H-Zellen und dem Gesamt-IgE oder einzelnen spezifischen IgE finden. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist durch die kleine Fallzahl eingeschränkt. Möglicherweise gelänge in einem größeren Kollektiv eine Korrelation bestimmter Chemokinrezeptoren mit einzelnen spezifischen IgE. Dies wäre vor dem Hintergrund verschiedener Eintrittspforten der verschiedenen Allergene (Hausstaubmilben über den Respirationstrakt vs. Hühnereiweiß über den Gastrointestinaltrakt) und der diskutierten gewebspezifischen Rolle von beispielsweise CCR4 denkbar²². Eine Korrelation zwischen nahrungsmittelspezifischem IgE mit der Ausprägung der atopischen Dermatitis sowie zwischen Hausstaubmilben-IgE und allergischen Atembeschwerden konnte so gezeigt werden⁵⁴.

5.6 Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit der Exposition

Die zunehmende Prävalenz allergischer Erkrankungen in westlichen Industrienationen wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass die verbesserten hygienischen Bedingungen zu einer verminderten Interaktion des frühkindlichen Organismus mit starken T_H1-Stimuli in Form mikrobieller Antigene führen¹⁰⁶. Dies wiederum könnte eine Verschiebung des T_H1-/T_H2-Gleichgewichtes in Richtung eines T_H2-Phänotyps zur Folge haben, und damit die Entstehung allergischer Erkrankungen begünstigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Zeitpunkt⁴², Dosis²³, sowie Ort der Exposition eines Antigens im menschlichen Körper⁶⁴ wesentlich für die Ausbildung einer atopischen T_H2-, oder einer potentiell protektiven T_H1-Immunantwort sind. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurde in der vorliegenden Arbeit der Gehalt an Allergenen sowie der Endotoxinspiegel in den Muttermatratzen drei Monate nach Geburt der Kinder gemessen, und mit der peripheren IFN- γ sowie Chemokinrezeptorexpression auf T_H-Zellen im Alter von zwei Jahren korreliert. Matratzenstaub ist eine wesentliche Expositionsquelle dieser Substanzen für Kinder. Er gilt als Indikatorsubstanz für den Gehalt biogener Stoffe in Wohnungen, und wird hier in

konstanter Höhe unabhängig von saisonalen Einflüssen gefunden^{32,81}. Da alle Kinder in den ersten Monaten in den Betten der Mütter schiefen, kann der Gehalt der gemessenen Substanzen als aussagekräftig sowohl hinsichtlich der pränatalen, als auch der frühen postnatalen Exposition angesehen werden⁹.

5.6.1 Hausstaubmilben- und Katzenallergene

Die Exposition gegenüber Hausstaubmilbenantigenen im frühen Kindesalter ist ein Risikofaktor für die spätere Entwicklung von Asthma^{78,116}. Eine Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen der Exposition mit, und der Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben konnte gezeigt werden¹¹⁶. Ghammeaghami et al. konnten zeigen, dass Der p1 über eine Kappung des IL-2 Rezeptors (CD25) eine verminderte *in vitro* IFN- γ Produktion in T_H1-Zellen induziert. Dies begünstigte die Entwicklung eines T_H2-Phänotyps³³. Der Zusammenhang zwischen der peripheren Chemokinrezeptorexpression CD4-positiver Zellen wurde bislang nicht untersucht. Wir konnten keinen Zusammenhang hiermit feststellen. Ebenso fand sich kein Zusammenhang mit der IFN- γ Expression.

Der Einfluss frühkindlicher Katzenexposition auf die atopische Sensibilisierung wird kontrovers diskutiert. Wahn et al. konnten eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigen¹¹⁶. Andere hingegen fanden eine inverse Korrelation⁸⁵ sowie ein reduziertes Risiko für die Ausbildung eines atopischen Ekzems⁶⁹, für die atopische Sensibilisierung^{95,107}, die Entwicklung einer allergischen Rhinitis⁶⁹ oder Asthma³⁹ im späteren Leben. Dies wurde auf eine vermehrte T_H1-Antwort nach kindlicher Exposition gegenüber größeren Mengen an Katzenallergenen zurückgeführt⁹⁵. Im Gegensatz hierzu vermuteten Platts-Mills et al. die Ausbildung eines „toleranten“ T_H2-Phänotyps nach vermehrter Exposition gegenüber Katzenallergenen durch vermehrte Produktion von IgG4 statt IgE ohne Einfluss auf Zellen des T_H1-Phänotyps⁸⁵. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die keine Korrelation zwischen der mRNA Expression von IFN- γ oder den T_H1-assoziierten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 und der Exposition gegenüber Katzenallergenen zeigen konnte. CCR4 wird auf einer Subpopulation von T_H-Zellen exprimiert, welchen eine Rolle bei Zellwanderungsprozessen zwischen lymphatischem Gewebe und der Haut zugeschrieben wird. Diese Kompartimentalisierung könnte die fehlende Assoziation zwischen der Exposition gegenüber Aeroallergenen wie Der p1/f1 und Fel d1 und der Expression dieses Moleküls erklären.

5.6.2 Endotoxin

Endotoxin ist ein ubiquitär in der Natur vorkommender, stark immunogener Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Ein erhöhter Endotoxingehalt im Wohninnenraum wurde in Bauernfamilien gefunden, sowie in Haushalten, in denen Kinder regelmäßig Kontakt zu Tieren hatten, oder Haustiere gehalten wurden^{38,80,112}. In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde Endotoxin als protektiv hinsichtlich der atopischen Sensibilisierung^{12,13}, der Entstehung von Heuschnupfen^{12,13}, Neurodermitis³⁰ und Asthma¹³ bei Kindern identifiziert. *In vitro* Studien zeigen, dass Lipopolysaccharide und Endotoxin über ihren Rezeptor CD14 sowie über Rezeptoren aus der Familie der *toll-like* Rezeptoren (TLR) Antigen-präsentierende Zellen stimulieren. Diese produzieren daraufhin Zytokine wie IL-12, die eine Differenzierung und Proliferation von T_H1-Zellen induzieren⁶⁰. Gereda et al. fanden eine Korrelation zwischen der *in vitro* IFN- γ Expression peripherer T_H-Zellen bei 9-24 Monate alten Kindern und dem in der Wohnung gemessenen Endotoxingehalt³². Darüber hinaus zeigten CCR5-defiziente Mäuse ein besseres Überleben nach intraperitonealer Endotoxinexposition gegenüber CCR5-Wildtyp-Mäusen¹²⁶, was für einen funktionellen Zusammenhang von Endotoxin mit diesem Rezeptor spricht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Endotoxinspiegel, gemessen in den Muttermatratzen der Probanden, und der CCR5 mRNA Expression peripherer T_H-Zellen gefunden. Dieses Ergebnis lässt einen funktionellen Zusammenhang analog oben genannter Ergebnisse vermuten, und deutet darauf hin, dass sein Nachweis in peripheren unstimulierten T_H-Zellen zweijähriger Kinder gelingt. Eine Korrelation der Endotoxinexposition mit der IFN- γ - oder CXCR3-Expression wurde nicht gefunden. Möglicherweise kommt der CCR5-positiven Subpopulation von T_H1-Zellen entscheidende funktionelle Bedeutung bei der Interaktion mit Endotoxin zu.

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen der Endotoxinexposition mit dem T_H2-assoziierten Chemokinrezeptor CCR4 deutet ebenfalls auf eine funktionelle Rolle dieses Rezeptors bei der Interaktion mit Endotoxin hin. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Interaktion von LPS mit TLR4 notwendig für die Induktion einer T_H2-Antwort auf die inhalative Exposition mit Ovalbumin im *in vitro* Mausmodell ist²³. Im Mausmodell konnte darüber hinaus eine Migration CCR4-positiver T_H-Zellen nach LPS-Administration in durch *Propionibacterium acnes* induzierte Granulome der Leber gezeigt werden¹²⁵, und es fand sich eine verminderte Immunantwort von CCR4-defizienten Mäusen auf intraperitoneale Endotoxinadministration analog der von CCR5-defizienten Mäusen^{18,126}.

Hintergrund und Fragestellung:

Die Konfrontation des Immunsystems mit einem definierten Antigen löst eine spezifische Immunantwort aus. Die daran beteiligten T_H-Zellen können anhand der von ihnen sezernierten Zytokine in T_H1- und T_H2-Zellen sowie in weitere Subtypen differenziert werden. Dabei sind T_H1-Zellen durch die Synthese von IFN- γ charakterisiert, während T_H2-Zellen vorwiegend Interleukin-4 produzieren. Die gezielte Auswanderung von T_H-Zellen in inflammatorische Gewebe wird unter anderem durch Chemokinrezeptoren, welche chemotaktische Zytokine (sog. Chemokine) binden, gesteuert. T_H1-Zellen exprimieren bevorzugt CXCR3 und CCR5, T_H2-Zellen dagegen CCR3 und CCR4.

T_H-Zellen sind an der Pathogenese von Typ I Allergien entscheidend beteiligt. Für die Entwicklung der hinsichtlich der Ausbildung von Typ I Allergien protektiven T_H1-Zellen scheint die Auseinandersetzung des Immunsystems mit mikrobiellen Antigenen in der allerfrühesten Kindheit notwendig zu sein. Gleichzeitig sind im Kleinkindesalter bisherige klinische sowie laborchemische Parameter für die Diagnostik von Typ I Allergien häufig nicht aussagekräftig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, in einem Pilotprojekt an einem Normalkollektiv zweijähriger Kinder das Expressionsmuster oben genannter Chemokinrezeptoren auf peripheren T_H-Zellen zu analysieren. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob ein positiver Zusammenhang zwischen T_H2-assoziierten Chemokinrezeptoren und der Familienanamnese hinsichtlich atopischer Erkrankungen, der klinischen Diagnose einer atopischen Dermatitis und anderen in der Allergiediagnostik eingesetzten Parametern besteht, oder sich ein negativer Zusammenhang zwischen den T_H1-assoziierten Chemokinrezeptoren und oben genannten Parametern zeigen lässt. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob zwischen der Endotoxinexposition, als Proxy für die mikrobielle Exposition in den ersten Lebensmonaten, und dem Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren ein Zusammenhang nachgewiesen werden kann.

Methode:

Für die vorliegende Arbeit stand eine Subpopulation von 42 Kindern im Alter von zwei Jahren des zwischen 1998 und 1999 rekrutierten Normalkollektives der LISA-Studie (Einfluss von Lebensstilfaktoren auf die Entwicklung des Immunsystems und Allergien) zur Verfügung. Unstimulierte periphere mononukleäre Zellen wurden durch Dichtezentrifugation

aus Vollblut isoliert. Anschließend wurden CD4-positive T_H-Zellen durch die MACS[®]-Technologie angereichert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde mittels real-time RT-PCR die mRNA-Expression von IL-4 und IFN- γ sowie der T_H1-assoziierten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 und der T_H2-assoziierten Moleküle CCR3 und CCR4 in dieser Zellpopulation quantifiziert.

Ergebnisse:

Die Chemokinrezeptoren CCR4, CCR5 sowie CXCR3 waren bei allen Probanden nachweisbar. CCR3 konnte bei acht von 37, IFN- γ bei 33 von 42 untersuchten Probanden nachgewiesen werden. IL-4 war nicht nachweisbar. Da bei einigen Proben eine Kontamination mit genomischer DNA nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, oder es zum Auftreten von Primer-Dimeren in der RT-PCR kam, wurden diese Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen (IFN- γ n=16, CCR3 n=5, CCR4 n=14, CCR5 n=15, CXCR3 n=18).

Es bestand ein positiver Trend in der Korrelation zwischen der mRNA-Expression von IFN- γ und den Chemokinrezeptoren CCR5 ($r=0,571$) sowie CXCR3 ($r=0,386$). Ebenso zeigte sich ein positiver Trend in der Korrelation zwischen CCR5 und CXCR3 ($r=0,273$). Diese Zusammenhänge waren nicht statistisch signifikant.

Probanden mit zweifach positiver Familienanamnese hatten eine signifikant höhere mRNA Expression von CXCR3 gegenüber Probanden mit einfach positiver ($p=0,045$) oder negativer ($0,036$) Familienanamnese. Die CCR4 mRNA-Expression war bei Probanden mit zweifach positiver Familienanamnese gegenüber Probanden mit einfach positiver Familienanamnese signifikant erhöht ($p=0,015$). Probanden mit *wheezing* in der Anamnese hatten eine signifikant höhere CCR5 mRNA-Expression als Probanden ohne *wheezing* ($p=0,03$). Keine signifikanten Zusammenhänge bestanden zwischen den untersuchten Molekülen und den Parametern Symptome einer atopischen Dermatitis bis zum Alter von zwei Jahren, Diagnose einer atopischen Dermatitis durch einen Arzt in den ersten beiden Lebensjahren, Nabelschnur Serum-IgE, Gesamt-IgE oder spezifisches IgE im Alter von zwei Jahren und Höhe des in der Muttermatratze gemessenen Hausstaubmilben- sowie Katzenallergengehalts.

Dagegen korrelierte die CCR5 mRNA-Expression hochsignifikant ($p=0,001$) sowie die CCR4 mRNA-Expression grenzwertig signifikant ($p=0,046$) mit dem Endotoxingehalt in der Muttermatratze der Probanden.

Schlussfolgerungen:

- In unstimulierten peripheren T-Helferzellen zweijähriger Kinder ist die Quantifizierung der Chemokinrezeptoren CCR4, CCR5 sowie CXCR3 mit Hilfe der real-time RT-PCR möglich. IFN- γ ist in der überwiegenden Anzahl der untersuchten Probanden nachweisbar, CCR3 nur bei wenigen, IL-4 bei keinem der Probanden.
- Die mRNA-Expression T_H1-/T_H2-assoziierter Chemokinrezeptoren in unstimulierten, peripheren T-Helferzellen ist für die Differenzierung von Kindern mit von Kindern ohne atopische Dermatitis nicht hilfreich.
- Dagegen scheint die mRNA-Expression von CCR5 als möglichem Marker einer T_H1-Antwort mit dem Symptomenkomplex *wheezing* zu korrelieren. Dieser Befund muss in Studien mit großen Fallzahlen überprüft werden. *Wheezing* ist am häufigsten mit viralen Infektionen vergesellschaftet. Die weitere Nachuntersuchung der Kinder im Schulalter wird zeigen, bei welchen Kindern sich dennoch Asthma manifestiert.
- Die perinatale Endotoxin-Exposition ist mit einer erhöhten CCR5 mRNA-Expression peripherer T_H-Zellen assoziiert.
- Damit deuten die Befunde auf eine Verwertbarkeit der CCR5 mRNA-Expression als T_H1-Marker in unstimulierten peripheren T_H-Zellen hin.

7. Literaturverzeichnis

1. Einführung in die Biostatistik. 2004.
www.fundus-biologie.de/docs/all/biostat.doc
2. Aleksza,M., Lukacs,A., Antal-Szalmas,P., Hunyadi,J. & Szegedi,A. Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **147**, 1135-1141 (2002).
3. Alm,J.S., Swartz,J., Lilja,G., Scheynius,A. & Pershagen,G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* **353**, 1485-1488 (1999).
4. Andrew,D.P. *et al.* C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J. Immunol.* **166**, 103-111 (2001).
5. Annunziato,F. *et al.* Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 691-699 (1999).
6. Balashov,K.E., Rottman,J.B., Weiner,H.L. & Hancock,W.W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6873-6878 (1999).
7. Bergmann,R.L., Bergmann,K.E. & Wahn,U. Can we predict atopic disease using perinatal risk factors? *Clin. Exp. Allergy* **28**, 905-907 (1998).
8. Bolte,G. *et al.* Early endotoxin exposure and atopy development in infants: results of a birth cohort study. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 770-776 (2003).
9. Bolte,G. *et al.* Different effects of endotoxin versus mite and cat allergen exposure on T-cell differentiation in infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 634-640 (2002).
10. Bonecchi,R. *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* **187**, 129-134 (1998).
11. Borres,M.P., Einarsson,R. & Bjorksten,B. Serum levels of interleukin-4, soluble CD23 and IFN gamma in relation to the development of allergic disease during the first 18 months of life. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 543-548 (1995).
12. Braun-Fahrlander,C. *et al.* Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 28-34 (1999).
13. Braun-Fahrlander,C. *et al.* Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* **347**, 869-877 (2002).
14. Bustin,S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23-39 (2002).

15. Campbell, J.J. *et al.* The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* **400**, 776-780 (1999).
16. Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A. & Weiner, H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-1240 (1994).
17. Chiu, B.C., Shang, X.Z., Stolberg, V.R., Komuniecki, E. & Chensue, S.W. Population analysis of CD4+ T cell chemokine receptor transcript expression during in vivo type-1 (mycobacterial) and type-2 (schistosomal) immune responses. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 363-372 (2002).
18. Chvatchko, Y. *et al.* A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Exp. Med.* **191**, 1755-1764 (2000).
19. Cohen, C.D., Frach, K., Schlondorff, D. & Kretzler, M. Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int.* **61**, 133-140 (2002).
20. Collins-Williams, C. & Bremner, K. Comparison of skin tests and RAST in the diagnosis of atopic hypersensitivity. *Ann. Allergy* **36**, 161-164 (1976).
21. D'Ambrosio, D. *et al.* Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J. Immunol.* **161**, 5111-5115 (1998).
22. Eigenmann, P.A. T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells. *Pediatr. Allergy Immunol.* **13**, 162-171 (2002).
23. Eisenbarth, S.C. *et al.* Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **196**, 1645-1651 (2002).
24. Esnault, S. *et al.* Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clin. Exp. Immunol.* **103**, 111-118 (1996).
25. Fahlbusch, B. *et al.* Allergens in house-dust samples in Germany: results of an East-West German comparison. *Allergy* **54**, 1215-1222 (1999).
26. Fink, L. & Bohle, R.M. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nature Medicine* **4**, 1329-1333 (1998).
27. Frezzolini, A. *et al.* Circulating interleukin 16 (IL-16) in children with atopic/eczema dermatitis syndrome (AEDS): a novel serological marker of disease activity. *Allergy* **57**, 815-820 (2002).
28. Galli, G. *et al.* Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* **30**, 204-210 (2000).
29. Gause, W.C. & Adamovicz, J. The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl.* **3**, S123-S135 (1994).

30. Gehring,U. *et al.* Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 847-854 (2001).
31. Gerber,B.O. *et al.* Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. *Curr. Biol.* **7**, 836-843 (1997).
32. Gereda,J.E. *et al.* Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* **355**, 1680-1683 (2000).
33. Ghaemmaghani,A.M., Robins,A., Gough,L., Sewell,H.F. & Shakib,F. Human T cell subset commitment determined by the intrinsic property of antigen: the proteolytic activity of the major mite allergen Der p 1 conditions T cells to produce more IL-4 and less IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1211-1216 (2001).
34. Grewe,M. *et al.* A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol. Today* **19**, 359-361 (1998).
35. Groux,H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
36. Hansen,L.G. *et al.* Cord blood IgE. III. Prediction of IgE high-response and allergy. A follow-up at the age of 18 months. *Allergy* **47**, 404-410 (1992).
37. Hartel,C., Bein,G., Muller-Steinhardt,M. & Kluter,H. Ex vivo induction of cytokine mRNA expression in human blood samples. *J. Immunol. Methods* **249**, 63-71 (2001).
38. Heinrich,J. *et al.* Pets and vermin are associated with high endotoxin levels in house dust. *Clin. Exp. Allergy* **31**, 1839-1845 (2001).
39. Hesselmar,B., Aberg,N., Aberg,B., Eriksson,B. & Bjorksten,B. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin. Exp. Allergy* **29**, 611-617 (1999).
40. Holt,P.G. Environmental factors and primary T-cell sensitisation to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr. Allergy Immunol.* **6**, 1-10 (1995).
41. Holt,P.G. Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* **6**, 59-70 (1995).
42. Holt,P.G. Primary allergic sensitization to environmental antigens: perinatal T cell priming as a determinant of responder phenotype in adulthood. *J. Exp. Med.* **183**, 1297-1301 (1996).
43. Holt,P.G. *et al.* Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin. Exp. Allergy* **22**, 1093-1099 (1992).
44. Janeway,C.A. Immunobiology. Current Biology Publications, (1999).
45. Jones,P.D., Gibson,P.G. & Henry,R.L. The prevalence of asthma appears to be inversely related to the incidence of typhoid and tuberculosis: hypothesis to explain the variation in asthma prevalence around the world. *Med. Hypotheses* **55**, 40-42 (2000).

46. Kalliomaki,M. *et al.* Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**, 1076-1079 (2001).
47. Kalliomaki,M., Salminen,S., Poussa,T., Arvilommi,H. & Isolauri,E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **361**, 1869-1871 (2003).
48. Kim,C.H. *et al.* Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J. Clin. Invest* **108**, 1331-1339 (2001).
49. Kimpen,J.L. Viral infections and childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **162**, S108-S112 (2000).
50. Kitani,A., Chua,K., Nakamura,K. & Strober,W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J. Immunol.* **165**, 691-702 (2000).
51. Koning,H., Neijens,H.J., Baert,M.R., Oranje,A.P. & Savelkoul,H.F. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine* **9**, 416-426 (1997).
52. Kruse,N., Pette,M., Toyka,K. & Rieckmann,P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *J. Immunol. Methods* **210**, 195-203 (1997).
53. Kurukulaaratchy,R.J., Matthews,S., Holgate,S.T. & Arshad,S.H. Predicting persistent disease among children who wheeze during early life. *Eur. Respir. J.* **22**, 767-771 (2003).
54. Laan,M.P. *et al.* Markers for early sensitization and inflammation in relation to clinical manifestations of atopic disease up to 2 years of age in 133 high-risk children. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 944-953 (2000).
55. Leung,T.F. *et al.* Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **14**, 296-301 (2003).
56. Leung,T.F. *et al.* Helper T-Lymphocyte-Related Chemokines in Healthy Newborns. *Pediatr. Res.* (2003).
57. Leung,T.F. *et al.* Plasma TARC concentration may be a useful marker for asthmatic exacerbation in children. *Eur. Respir. J.* **21**, 616-620 (2003).
58. Lin,L., Nonoyama,S., Oshiba,A., Kabasawa,Y. & Mizutani,S. TARC and MDC are produced by CD40 activated human B cells and are elevated in the sera of infantile atopic dermatitis patients. *J. Med. Dent. Sci.* **50**, 27-33 (2003).
59. Loetscher,P. *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**, 344-345 (1998).
60. Macatonia,S.E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071-5079 (1995).
61. Maggi,E. *et al.* Role of interleukin-4 in the induction of human IgE synthesis and its suppression by interferon-gamma. *Ric. Clin. Lab* **17**, 363-367 (1987).

62. Magnusson,C.G. Cord serum IgE in relation to family history and as predictor of atopic disease in early infancy. *Allergy* **43**, 241-251 (1988).
63. Martinez,F.D. *et al.* Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N. Engl. J. Med.* **332**, 133-138 (1995).
64. Matricardi,P.M. & Bonini,S. High microbial turnover rate preventing atopy: a solution to inconsistencies impinging on the Hygiene hypothesis? *Clin. Exp. Allergy* **30**, 1506-1510 (2000).
65. Matricardi,P.M. *et al.* Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* **314**, 999-1003 (1997).
66. Matsumoto,Y. *et al.* Identification of highly expressed genes in peripheral blood T cells from patients with atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 327-340 (2002).
67. Morrison,T.B., Weis,J.J. & Wittwer,C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**, 954-8, 960, 962 (1998).
68. Murphy,P.M. *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 145-176 (2000).
69. Nafstad,P., Magnus,P., Gaarder,P.I. & Jaakkola,J.J. Exposure to pets and atopy-related diseases in the first 4 years of life. *Allergy* **56**, 307-312 (2001).
70. Nakajima,C. *et al.* Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1792-1801 (2002).
71. Nakatani,T. *et al.* CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 353-358 (2001).
72. Nakazawa,M. *et al.* Predominance of type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ cells in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 673-682 (1997).
73. Nanki,T. & Lipsky,P.E. Lack of correlation between chemokine receptor and T(h)1/T(h)2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int. Immunol.* **12**, 1659-1667 (2000).
74. Nanki,T. & Lipsky,P.E. Lack of correlation between chemokine receptor and T(h)1/T(h)2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int. Immunol.* **12**, 1659-1667 (2000).
75. Okazaki,H. *et al.* Characterization of chemokine receptor expression and cytokine production in circulating CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis: up-regulation of C-C chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 1236-1242 (2002).
76. Okazaki,H. *et al.* Characterization of chemokine receptor expression and cytokine production in circulating CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis: up-

- regulation of C-C chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 1236-1242 (2002).
77. Overbergh,L., Valckx,D., Waer,M. & Mathieu,C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* **11**, 305-312 (1999).
 78. Pajno,G.B., Peroni,D.G., Barberio,G., Pietrobelli,A. & Boner,A.L. Predictive features for persistence of atopic dermatitis in children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **14**, 292-295 (2003).
 79. Panina-Bordignon,P. *et al.* The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J. Clin. Invest* **107**, 1357-1364 (2001).
 80. Park,J.H., Gold,D.R., Spiegelman,D.L., Burge,H.A. & Milton,D.K. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**, 322-328 (2001).
 81. Park,J.H. *et al.* Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. *Environ. Health Perspect.* **108**, 1023-1028 (2000).
 82. Parronchi,P., Brugnolo,F., Sampognaro,S. & Maggi,E. Genetic and environmental factors contributing to the onset of allergic disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **121**, 2-9 (2000).
 83. Patel,L., Charlton,S.J., Chambers,J.K. & Macphee,C.H. Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations. *Cytokine* **14**, 27-36 (2001).
 84. Piali,L. *et al.* The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur. J. Immunol.* **28**, 961-972 (1998).
 85. Platts-Mills,T., Vaughan,J., Squillace,S., Woodfolk,J. & Sporik,R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* **357**, 752-756 (2001).
 86. Prescott,S.L. *et al.* Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J. Immunol.* **160**, 4730-4737 (1998).
 87. Prescott,S.L. *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* **353**, 196-200 (1999).
 88. Proudfoot,A.E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 106-115 (2002).
 89. Qin,S. *et al.* The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest* **101**, 746-754 (1998).
 90. Rabin,R.L. *et al.* Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J. Immunol.* **162**, 3840-3850 (1999).

91. Rinas,U., Horneff,G. & Wahn,V. Interferon-gamma production by cord-blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE-levels. *Pediatr. Allergy Immunol.* **4**, 60-64 (1993).
92. Ririe,K.M., Rasmussen,R.P. & Wittwer,C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **245**, 154-160 (1997).
93. Roche Molecular Biochemicals. LightCycler Operator's Manual. (2000).
94. Romagnani,S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol. Today* **13**, 379-381 (1992).
95. Roost,H.P. *et al.* Role of current and childhood exposure to cat and atopic sensitization. European Community Respiratory Health Survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 941-947 (1999).
96. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M. & Toda,M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151-1164 (1995).
97. Sallusto,F., Lenig,D., Mackay,C.R. & Lanzavecchia,A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* **187**, 875-883 (1998).
98. Sallusto,F., Mackay,C.R. & Lanzavecchia,A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**, 2005-2007 (1997).
99. Schultz,L.F. The Epidemiology of Atopic Dermatitis . Burr, M.L., (1993).
100. Sebastiani,S. *et al.* Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J. Immunol.* **166**, 996-1002 (2001).
101. Shaheen,S.O. *et al.* Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* **347**, 1792-1796 (1996).
102. Shields,P.L. *et al.* Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol.* **163**, 6236-6243 (1999).
103. Sloop K.W. Combined Hot-start and touch-down protocols PCR optimize amplification of difficult target. *Biochemica* 1/2001. 2001. Roche Applied Science. Ref Type: Magazine Article
104. Stanford,M.M. & Issekutz,T.B. The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 791-799 (2003).
105. Statistisches Bundesamt. **Spezialbericht Allergien: Gesundheitsberichterstattung des Bundes** - . Metzler-Poeschel, Stuttgart (2000).
106. Strachan,D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259-1260 (1989).

107. Svanes,C., Jarvis,D., Chinn,S. & Burney,P. Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 415-420 (1999).
108. Teo,I.A., Choi,J.W., Morlese,J., Taylor,G. & Shaunak,S. LightCycler qPCR optimisation for low copy number target DNA. *J. Immunol. Methods* **270**, 119-133 (2002).
109. Trepka,M.J., Heinrich,J. & Wichmann,H.E. The epidemiology of atopic diseases in Germany: an east-west comparison. *Rev. Environ. Health* **11**, 119-131 (1996).
110. Umetsu,D.T., Akbari,O. & DeKruyff,R.H. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 480-487 (2003).
111. Vestergaard,C. *et al.* A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest Dermatol.* **115**, 640-646 (2000).
112. von Mutius,E. *et al.* Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 1230-1234 (2000).
113. von Mutius,E., Weiland,S.K., Fritsch,C., Duhme,H. & Keil,U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* **351**, 862-866 (1998).
114. Vulcano,M. *et al.* Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* **31**, 812-822 (2001).
115. Wahn,U., Bergmann,R., Kulig,M., Forster,J. & Bauer,C.P. The natural course of sensitisation and atopic disease in infancy and childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* **8**, 16-20 (1997).
116. Wahn,U. *et al.* Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 763-769 (1997).
117. Wahn,U. & von Mutius,E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 567-574 (2001).
118. Weiner,H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**, 207-214 (2001).
119. Wright,A.L., Taussig,L.M., Ray,C.G., Harrison,H.R. & Holberg,C.J. The Tucson Children's Respiratory Study. II. Lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am. J. Epidemiol.* **129**, 1232-1246 (1989).
120. Yamamoto,J. *et al.* Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 568-574 (2000).
121. Yawalkar,N. *et al.* Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J. Invest Dermatol.* **113**, 43-48 (1999).
122. Yin,J.L. *et al.* Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.* **79**, 213-221 (2001).

123. Ying,S. *et al.* Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* **163**, 6321-6329 (1999).
124. Ying,S. *et al.* Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3507-3516 (1997).
125. Yoneyama,H. *et al.* Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. *J. Clin. Invest* **102**, 1933-1941 (1998).
126. Zhou,Y. *et al.* Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J. Immunol.* **160**, 4018-4025 (1998).

8. Anhang

8.1 Experimentelle Rohdaten

Nr.	Reinheit (%)	Zellzahl (/ ml)	GAPDH Kopien/ μ l	CCR4		CXCR3		IFN- γ		CCR5		CCR3	
				Kopien	Wertung	Kopien	Wertung	Kopien	Wertung	Kopien	Wertung	Kopien	Wertung
L77	91	250000	204,58	12,47	0	6,01	0		0	0,0409	1	n.n.	
L137	95	200000	290,09	16,29	0	11,29	0		0	0,0079	1	n.n.	
L82	96	250000	165,91	212,1	1	16,92	1	6,15	1	0,029	0	0,0032	
L140	99	k.A.	7,65	275,74	0	28,53	0		0	0,0663	0	n.n.	
L142	95	200000	101,39	132,57	1	4,15	1	5,19	1	0,0084	0	n.n.	
L156	95	240000	121,58	67,39	1	7,94	1		0	0,0148	1	n.n.	
L155	90	300000	221,69	71,84	1	40,25	1	0,14	1	0,0013	0	n.n.	
L31	94	150000	75,61	43,9	0	17,42	0		0	0,0126	1	n.n.	
L78	92	120000	68,33	95,75	1	3,95	1		0	0,0974	1	n.n.	
L83	96	850000	1436,13	114,74	1	9,17	1	4,67	1	0,0462	0	0,0024	
L85	96	370000	832,88	34,92	1	3,31	1	2,53	1	0,0207	0	0,0041	
L86	96	320000	618,96	22,33	0	5,9	0		0	0,0105	1	0,0007	
L96	96	200000	527,1	47,72	1	12,4	1	1,65	1	0,0379	0	0,0008	
L97	95	150000	156,34	81,62	1	13,88	1	6,66	1	0,0256	0	n.n.	
L98	94	170000	55,03	101,39	1	16,78	1		0	0,013	0	n.n.	
L130	95	350000	261,24	83,25	1	66,85	1	15,87	1	0,0175	0	0,0004	
L134	93	220000	262,15	42,38	0	15,15	0	2,92	1	0,0232	1	n.n.	
L29	93	180000	3,95	36,6	0	5,9	0	n.n.		n.u.		n.u.	
L32	93	140000	46,05	11,63	0	2,93	0		0	0,0313	1	n.n.	
L84	94	200000	30,5	96,43	1	11,01	1		0	n.u.		n.u.	
L133	94	320000	208,18	15,4	1	20,14	0		0	0,0077	1	0,001	
L44	90	100000	43,4	35,1	0	18,67	0		0	0,0515	1	n.n.	
L45	92	330000	87,56	97,54	1	4,52	1		0	0,0921	0	n.n.	
L68	95	300000	466,46	110,4	1	14,98	1	4,93	1	0,0182	1	n.n.	
L93	93	500000	80,52	156,85	1	24,24	1		0	0,0083	1	n.n.	
L92	94	800000	118,65	139,93	1	47,2	1		0	0,0242	1	n.n.	
L147	97	240000	164,18	37,96	1	27,06	0		0	0,0034	1	n.n.	
L153	96	350000	264,91	84,99	1	6,92	1	0,08	1	0,0042	0	0,0006	
L90	96	200000	109,87	39,58	1	27,59	1	10,35	1	0,0411	1	n.n.	
L94	92	800000	31,03	93,78	1	2,4	0		0	0,0044	1	n.n.	

0 = Nein, 1 = Ja. Eine 1 in den Spalten „Wertung“ zeigt die in die Quantifizierung eingegangenen Proben an. k.A. = keine Angaben, n.n. = nicht nachweisbar, n.u. = nicht untersucht. CCR4, CXCR3 sowie IFN- γ in Kopien / 1000 Kopien GAPDH. CCR3 und CCR5 in 2^(Δ CT).

Nr.	Reinheit (%)	Zellzahl (/ ml)	GAPDH Kopien/ μ l	CCR4		CXCR3		IFN- γ		CCR5		CCR3	
				Kopien	Wertung	Kopien	Wertung	Kopien	Wertung	Kopien	Wertung	Kopien	Wertung
L 132	95	200000	298.31	129.96	0	19.57	1	0.78	1	0.0047	1	n.n.	
L 123	94	150000	260.33	23.37	1	23.84	0		0	0.0103	1	n.n.	
L 135	92	100000	1	114.52	0	88.29	0	n.n.		n.u.		n.u.	
L 120	95	200000	172.4	53.28	0	17.08	0	4.32	1	0.0114	1	n.n.	
L 151	90	100000	20.2	32.64	1	12.22	0		0	0.0226	1	n.n.	
L 150	95	200000	95.21	30.57	1	6.6	1		0	0.0062	1	n.n.	
L 30	90	220000	3.7	17.22	0	3.15	0	n.n.		n.u.		n.u.	
L 101	94	320000	374.33	63.79	1	6.7	1	4.32	1	0.0041	1	n.n.	
L 110	92	100000	135.96	42.19	1	2.98	1	4.68	1	0.0093	1	n.n.	
L 131	95	300000	156.34	120.28	1	53.35	1	9.46	1	0.0231	1	n.n.	
L 136	93	450000	333.58	19.82	1	19.84	0		0	0.0188	1	n.n.	
L 144	93	k.A.	2.96	191.32	0	47.34	1		0	n.u.		n.u.	

0 = Nein, 1 = Ja. Eine 1 in den Spalten „Wertung“ zeigt die in die Quantifizierung eingegangenen Proben an. k.A. = keine Angaben, n.n. = nicht nachweisbar, n.u. = nicht untersucht. CCR4, CXCR3 sowie IFN- γ in Kopien / 1000 Kopien GAPDH. CCR3 und CCR5 in $2^{(Ct)}$.

8.2 Klinische Rohdaten

Nr.	Sex	FA	Diagnose		Symptome AD	Wheezing	NS-IgE		Gesamt-IgE		Spez. IgE Nachweis	Der p+f (ng/g)	Fel d 1 (µg/g)	Endotoxin (EU/g)
			AD	k.A.			(kU/l)	Nachweis	(kU/l)	Nachweis				
L77	2	1	0	1	1	1	n.n.	0	5.53	1	0	156.91	0.07	4654
L137	1	1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0	359.00	2	1	5228.28	0.15	637
L82	1	0	0	0	0	0	n.n.	0	35.80	1	1	1162.97	0.32	2945
L140	2	2	0	0	0	0	k.A.	0	13.30	1	0	122.65	0.03	85380
L142	1	0	0	0	0	0	n.n.	0	8.87	1	0	66.06	0.04	1373
L156	2	0	1	0	0	0	n.n.	0	n.n.	0	0	248.59	0.09	7034
L155	1	1	0	0	0	0	0.55	1	12.10	1	0	10.00	0.73	15391
L31	2	1	0	0	0	0	k.A.	0	4.50	1	0	1897.25	0.03	109
L78	1	1	0	0	0	1	1.99	1	34.40	1	0	2060.93	4.50	12650
L83	2	1	1	1	0	0	n.n.	0	11.80	1	1	11697.80	0.93	7531
L85	2	0	0	0	0	0	0.40	1	25.50	1	0	3246.03	0.36	2988
L86	1	1	0	0	0	0	0.50	1	60.30	2	1	697.60	0.15	4080
L96	2	0	0	0	0	0	k.A.	0	5.71	1	0	10.00	n.n.	408
L97	2	0	0	0	0	0	k.A.	0	30.70	1	0	15103.27	0.28	19888
L98	1	2	0	0	0	0	n.n.	0	26.20	1	0	176.97	0.22	2565
L130	1	2	1	1	0	0	n.n.	0	81.40	2	1	1932.18	49.34	3235
L134	2	1	1	0	0	0	n.n.	0	3.30	1	0	6238.62	0.16	2987
L29	2	1	0	1	0	0	k.A.	0	2.07	1	0	2394.42	0.03	1441
L32	2	0	0	0	1	0	k.A.	0	3.85	1	0	160.70	0.10	4168.00
L84	2	1	0	k.A.	0	0	k.A.	0	13.20	1	0	4882.16	0.11	7563
L133	1	1	1	1	0	0	k.A.	0	9.76	1	1	10.00	0.35	1393
L44	2	0	0	0	0	0	n.n.	0	6.02	1	0	3606.78	1.42	8915
L45	2	1	1	0	0	0	k.A.	0	24.20	1	1	524.47	n.n.	4500
L68	1	0	1	1	0	0	k.A.	0	242.00	2	1	959.19	n.n.	2738
L93	1	2	0	0	0	0	k.A.	0	132.00	2	0	468.08	0.07	1003
L92	2	2	0	0	0	0	k.A.	0	50.80	1	0	184.42	3191.10	12554
L147	1	1	0	0	0	0	n.n.	0	58.60	1	0	10.00	0.41	205
L153	2	0	0	0	0	0	k.A.	0	n.n.	0	0	301.45	0.05	4262
L90	1	1	0	0	0	0	k.A.	0	39.70	1	0	182.80	0.41	2496
L94	2	0	0	0	0	0	k.A.	0	1217.00	2	0	10.00	0.07	1002

0 = Nein, 1 = Ja. Eine 1 in den Spalten „Wertung“ zeigt die in die Quantifizierung eingegangenen Proben an. k.A. = keine Angaben, n.n. = nicht nachweisbar, n.u. = nicht untersucht. CCR4, CXCR3 sowie IFN-γ in Kopien / 1000 Kopien GAPDH. CCR3 und CCR5 in 2^(-ΔCt). In der Spalte Familienanamnese (FA) gilt: 0 = negative FA, 1 = einfach positive FA, 2 = doppelt positive FA. In der Spalte Wertung unter Gesamt-IgE gilt: 0 = nicht nachweisbar, 1 = nachweisbar, 2 = erhöht nachweisbar.

Nr.	Sex	FA	Diagnose		Symptome AD	Wheezing	NS-IgE		Gesamt-IgE		Spez. IgE Nachweis	Der p+f (ng/g)	Fel d 1 (µg/g)	Endotoxin (EU/g)
			AD	AD			(kU/l)	Nachweis	(kU/l)	Nachweis				
L 132	1	2	0	1	0	0	n.n.	0	16.70	1	0	k.A.	k.A.	287
L 123	2	1	1	0	0	0	k.A.	1	17.50	1	1	139.14	0.03	881
L 135	2	2	0	0	0	0	0.61	1	25.70	1	0	1141.96	0.08	41339
L 120	1	1	0	0	0	0	1.18	1	41.00	1	0	94436.68	0.03	2535
L 151	2	1	0	1	0	0	k.A.	1	23.60	1	0	19548.20	0.35	300
L 150	1	0	k.A.	0	0	0	k.A.	1	25.10	1	0	356.35	1.06	3527
L 30	1	1	0	0	0	0	n.n.	0	7.36	1	0	10.00	0.13	1197
L 101	2	1	0	0	0	k.A.	k.A.	1	24.70	1	0	163.03	1.32	1780
L 110	2	1	0	0	0	0	n.n.	0	4.15	1	0	476.71	0.10	599
L 131	2	0	0	0	0	0	k.A.	0	n.n.	0	0	19638.97	1.92	491
L 136	1	1	0	0	0	0	n.n.	0	22.70	1	0	212.37	15.59	2309
L 144	1	0	0	0	0	0	n.n.	0	17.80	1	0	203.57	3.62	

0 = Nein, 1 = Ja. Eine 1 in den Spalten „Wertung“ zeigt die in die Quantifizierung eingegangenen Proben an. k.A. = keine Angaben, n.n. = nicht nachweisbar, n.u. = nicht untersucht. CCR4, CXCR3 sowie IFN-γ in Kopien / 1000 Kopien GAPDH. CCR3 und CCR5 in 2^(-ΔCt). In der Spalte Familienanamnese (FA) gilt: 0 = negative FA, 1 = einfach positive FA, 2 = doppelt positive FA. In der Spalte Wertung unter Gesamt-IgE gilt: 0 = nicht nachweisbar, 1 = nachweisbar, 2 = erhöht nachweisbar.

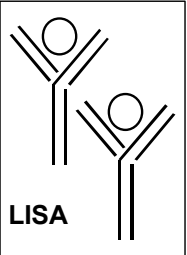
8.3 Zusammenhang der molekularbiologischen Ergebnisse mit klinischen Parametern

	CCR4		CXCR3		CCR5		IFN- γ		95% CI		GM	
	N	GM	95% CI	N	GM	95% CI	N	GM	95% CI	N	GM	95% CI
Elterliche Atopie												
Keine	11	79.78	56.49-112.69	11	11.67	6.90-19.74	7	16.04	8.42-30.56	8	2.75	0.95-7.98
Einfach oder doppelt	17	59.06	42.20-82.65	13	14.26	8.28-24.55	18	13.37	8.93-20.02	9	3.03	1.20-7.67
Einfach	13	47.90	33.35-68.79	8	8.92	4.69-16.94	15	14.23	9.04-22.38	7	2.90	1.04-8.12
Doppelt	4	116.67	87.71-155.18	5	30.20	17.94-50.84	3	9.81	3.83-25.15	2	3.52	0.18-67.40
Arzt Diagnose AD												
Ja	7	59.02	32.52-107.13	5	12.69	5.18-31.10	5	13.77	9.36-20.27	4	5.72	2.82-11.58
Nein	20	72.04	54.90-94.52	18	13.60	8.75-21.13	17	14.24	9.10-22.29	13	2.35	1.01-5.45
Symptome AD												
Ja	5	55.57	25.72-120.08	4	20.59	8.99-47.15	5	14.35	6.72-30.63	4	4.11	1.22-13.89
Nein	22	68.07	52.08-88.96	19	11.91	7.70-18.44	19	14.43	9.66-21.55	13	2.60	1.14-5.91
Wheezing												
Ja	1	95.75	-	1	3.95	-	3	49.96	25.52-97.78	0		
Nein	26	65.65	50.37-85.56	22	14.15	9.60-20.86	20	12.74	9.25-17.53	16	2.82	1.37-5.81
Sensibilisierung												
Ja	7	69.52	34.62-139.63	5	14.77	6.20-35.20	5	10.37	7.65-14.04	4	6.89	3.94-12.03
Nein	21	65.48	51.14-83.84	19	12.58	8.22-19.25	20	15.19	10.08-22.88	13	2.22	0.97-5.07

n= Anzahl der auf Korrelation untersuchten Fälle, GM = geometrisches Mittel, CI = Konfidenzintervall. Ergebnisse von IFN- γ , CCR4 sowie CXCR3 angegeben in Kopien/1000

Kopien GAPDH, Ergebnisse von CCR5 zur einfacheren Darstellung mit Faktor 1000 multipliziert.

8.4 Auszug aus dem 2-Jahres Fragebogen der LISA-Studie

		Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich		
		<i>2-Jahresfragebogen</i>		
		ID-Nummer		
1	Geburtsdatum des Kindes	Tag	Monat	Jahr
		. .		
2	Geschlecht	männlich <input type="checkbox"/>	weiblich <input type="checkbox"/>	
8	Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> einen Hautausschlag?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	
		<i>Wenn 'NEIN', gehen Sie bitte weiter zu Frage 9.</i>		
8.1	<u>Wenn 'JA'</u> , Ist der Hautausschlag mit Unterbrechungen <u>wiederholt</u> aufgetreten?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	
8.2	Wie lange hat der Hautausschlag angedauert? (Bitte geben Sie die Dauer der längsten Episode an)	weniger als 7 Tage	<input type="checkbox"/>	
		7-14 Tage	<input type="checkbox"/>	
		15-28 Tage	<input type="checkbox"/>	
		mehr als 28 Tage	<input type="checkbox"/>	
8.3	War der Hautausschlag mit einem Juckreiz verbunden?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>	
8.4	<u>Wenn 'JA'</u> , wie häufig hat sich Ihr Kind tagsüber gekratzt?	ständig	<input type="checkbox"/>	
		oft	<input type="checkbox"/>	
		selten	<input type="checkbox"/>	
8.5	Trat dieser Hautausschlag bei Ihrem Kind an einer			

<p>der folgenden Körperstellen auf:</p>			
	im Gesicht, am Hals, im Nacken	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	an den Streckseiten von Armen, Beinen	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	in den Ellenbeugen oder Kniekehlen	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	an Händen, Füßen, Hand- oder Fußgelenken	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Am Rumpf, nicht am Po	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	an anderen Stellen	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
9	<p>Hatte Ihr Kind <u>irgendwann</u> einmal beim Atmen pfeifende oder keuchende Geräusche im Brustkorb? <i>Wenn 'NEIN', gehen Sie bitte weiter zu Frage 13.</i></p>	Ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
10	<p>Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> beim Atmen pfeifende oder keuchende Geräusche im Brustkorb? <i>Wenn 'NEIN', gehen Sie bitte weiter zu Frage 13.</i></p>	Ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
11	<p>Wie viele Anfälle von pfeifender oder keuchender Atmung hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u>?</p>	keinen Anfall <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		1 - 3 Anfälle <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		4 - 12 Anfälle <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		mehr als 12 Anfälle <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12	<p>Wie oft ist Ihr Kind im Durchschnitt <u>in den letzten 12 Monaten</u> wegen pfeifender oder keuchender Atmung aufgewacht?</p>	nie deswegen aufgewacht <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		weniger als 1 Nacht pro Woche <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		1 oder mehrere Nächte pro Woche <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13	<p>Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> irgendwann einmal Anfälle von Kurzatmigkeit oder Atemnot?</p>	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
14	<p>Hatte Ihr Kind <u>irgendwann einmal</u> Asthma?</p>	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
15	<p>Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> pfeifende oder keuchende Atemgeräusche im Brustkorb während oder nach körperlicher Anstrengung?</p>	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>

16	Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> jemals nachts einen trockenen Reizhusten, obwohl es keine Erkältung oder Bronchitis hatte?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
17	Hatte Ihr Kind <u>irgendwann einmal</u> Niesanfalle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war? <i>Wenn 'NEIN', gehen Sie bitte weiter zu Frage 23.</i>	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
18	Hatte Ihr Kind irgendwann einmal Heuschnupfen?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
19	Hatte Ihr Kind <u>irgendwann einmal</u> einen juckenden Hautausschlag, der stärker oder schwächer <u>über</u> mindestens 6 Monate auftrat? <i>Wenn 'NEIN', gehen Sie bitte weiter zu Frage 30.</i>	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
19.2	Trat dieser juckende Hautausschlag bei Ihrem Kind <u>irgendwann einmal</u> an einer der folgenden Körperstellen auf: In den Ellenbeugen oder Kniekehlen, an den Hand- oder Fugelenken, im Gesicht, am Hals?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
19.4	Ist dieser juckende Hautausschlag <u>in den letzten 12 Monaten</u> jemals vollständig verschwunden?	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
20	Hatte Ihr Kind <u>irgendwann einmal</u> Neurodermitis? (Atopisches Ekzem, Endogenes Ekzem?)	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
21	Hat ein <u>Arzt</u> bei Ihrem Kind <u>im 1. oder 2. Lebensjahr</u> eine der folgenden Krankheiten festgestellt? <i>Sehen Sie bitte auch im gelben Vorsorgeheft Ihres Kindes - jeweils unter @ - bei 'Sonstigen Bemerkungen' nach.</i>		
	Bronchitis	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Obstruktive, asthmoide oder spastische Bronchitis	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Asthma	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Lungenentzündung	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Pseudokrupp, Krupphusten	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Nahrungsmittelallergie	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>
	Neurodermitis, allergisches oder atopisches Ekzem	ja <input type="checkbox"/>	nein <input type="checkbox"/>

Ekzem ohne nähere Angabe

ja **nein**

Heuschnupfen

ja **nein**

**ganzjährig allergischer Schnupfen, z.B. Hausstaub-
milbenallergie**

ja **nein**

9. Danksagung

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. Susanne Krauss Etschmann für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation.

Herrn Nikos Konstantopoulos aus dem Dr. von Haunerschen Kinderspital danke ich für die Einarbeitung in die Methodik zu Beginn der Arbeit und seinen kritischen Rat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. G. Bolte aus dem Institut für Epidemiologie der Universität Ulm, die im Rahmen der LISA-Studie die statistische Auswertung der klinischen Daten durchgeführt und mir diese freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Ebenso gilt mein Dank den Koordinatoren der LISA-Studie, Herrn Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann sowie Herrn Dr. J. Heinrich, beide aus dem Institut für Epidemiologie der GSF, Neuherberg.

Herrn Dr. H. Nitschko aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, die real-time RT-PCR an einem Gerät seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und zugleich für die konstruktive Kritik und Anregungen bei methodischen Problemen.

Mein größter Dank an dieser Stelle gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir durch ihre ununterbrochene Förderung, Unterstützung und Zuneigung das Medizinstudium und damit diese Promotion erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Name: Daniel Zecher
Adresse: Rumfordstr. 48
80469 München

Geburtsdatum: 20.02.1976
Geburtsort: Stuttgart-Bad Cannstatt
Familienstand: ledig

Ausbildung

Seit 07/03 Arzt im Praktikum an der Medizinischen Poliklinik der LMU München
(Prof. D. Schlöndorff)

05/2003 Drittes Staatsexamen, Gesamtnote 2,0

04 / 02 – 04 / 03 Praktisches Jahr
Innere Medizin am Baylor College of Medicine, Houston / Texas und
an der New York University / New York City, USA
Chirurgie am Kantonsspital Chur, Schweiz
Neurologie an der Neurologischen Klinik der TU München

04 / 2002 Zweites Staatsexamen

2000 - 2002 Medizinstudium am Klinikum Rechts der Isar der TU München

1999 – 2000 Viertes Studienjahr an der Université de Nice–Sophia Antipolis in
Nizza, Frankreich
Stipendium des Bezirkstags von Oberbayern

08 / 1999 Erstes Staatsexamen

1998 – 1999 Klinisches Studium am Klinikum Rechts der Isar der TU München

08 / 1998 Physikum

1996 –1998 Vorklinisches Studium an der TU München

Schule

05/1995 Abitur, Note 1, 4
1986 – 1995 Besuch des Chiemgau-Gymnasiums, Traunstein

Fremdsprachen

Französisch und Englisch fließend in Wort und Schrift