

Aus der Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

**Forschungszentrum Kubus des von Haunerschen Kinderspitals der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Dietrich Reinhardt

**Thema der Dissertation:
Modulation allergischer Erkrankungen durch mikrobielle Stimulation
- eine Studie an Zellen des Nabelschnurbluts**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von**

Sabine Wagner-Höppler, geb. Höppler

aus

Trostberg

Jahr

2010

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

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bianca Schaub

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Przybilla

Prof. Dr. Holger Schulz

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. EINLEITUNG | 6 |
| 1. Stand der Forschung allergischer Erkrankungen im Kindesalter | 6 |
| 1.1 Epidemiologie | 6 |
| 1.2 Pathogenese | 7 |
| 1.3 Immunsystem | 9 |
| 1.3.1 T-Helferzellen Typ 1 und 2 | 9 |
| 1.3.2 Regulatorische T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ T-Zellen; CD4 ⁺ CD25 ^{hoch} T-Zellen) | 10 |
| 1.3.3 Lymphozytensubtypen und ihre Expression von CD-Oberflächenantigenen | 11 |
| 2. Mütterliche Atopie – wichtigster Risikofaktor für allergische Erkrankungen im Kindesalter? | 11 |
| 3. Bedeutung der mikrobiellen Stimulation | 12 |
| 3.1 Potenzieller Schutz vor allergischen Erkrankungen durch Endotoxinexposition im Kindesalter? | 12 |
| 3.2 „Hygiene-Hypothese“ | 13 |
| 3.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs) | 14 |
| 4. Möglicher Einfluss mikrobieller Stimulation auf das Immunsystem | 15 |
| 4.1 Möglicher schützender Einfluss mikrobieller Stimulation auf das kindliche Immunsystem bezüglich allergischer Erkrankungen | 15 |
| 4.2 Mononukleäre Zellen im Nabelschnurblut (CBMCs) | 17 |
| | |
| 2. ZIELSETZUNG | 18 |
| | |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 1. Laborgeräte | 19 |
| 2. „Verbrauchsmaterialien“ und Reagenzien | 20 |
| 3. Untersuchungskollektiv | 23 |
| 4. Charakteristika des Immunsystems (Nabelschnurblut) | 24 |
| 4.1 Bestimmung Gesamt- und spezifisches IgE im mütterlichen Serum | 24 |
| 4.2 Nabelschnurblut | 25 |
| 4.3 Bestimmung der Proliferation der mononukleären Zellen (CBMCs) | 28 |
| 4.4 Zytokine | 29 |
| 4.4.1 Hintergrund/Prinzip | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.4.2 Optimierungsexperimente | 32 |
| 4.4.3 Durchführung des Assays | 33 |
| 4.5 CD-Oberflächenantigene/ T-Helferzellsubtypen | 37 |
| 4.5.1 Herstellung der Lösungen | 37 |
| 4.5.2 Durchflusszytometrische Messung | 40 |
| 5. Statistische Methoden | 41 |
| | |
| 4. ERGEBNISSE | 42 |
| 1. Epidemiologische Charakteristika | 42 |
| 1.1 Deskription der PAULINA Studienpopulation | 42 |
| 1.1.1 Mütter | 42 |
| 1.1.2 Neugeborene | 44 |
| 1.1.3 Epidemiologische Daten zur Geburt | 46 |
| 1.1.4 Väter | 46 |
| 2. Charakteristika des Immunsystems (Nabelschnurblut) | 48 |
| 2.1. Aktivierte T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Interleukin-10 | 48 |
| 2.2 Lymphozytensubtypen | 51 |
| 2.3 Th1-Zytokine | 53 |
| 2.4 Th2-Zytokine | 54 |
| 2.5 Proinflammatorische Zytokine | 56 |
| 2.6 Proliferation der mononukleären Zellen | 57 |
| | |
| 5. DISKUSSION | 59 |
| | |
| 6. AUSBLICK | 75 |
| | |
| 7. ZUSAMMENFASSUNG | 77 |
| | |
| 8. ANHANG | 79 |
| 1. Abkürzungen und Begriffserläuterungen | 79 |
| 2. Kriterien zur Studienteilnahme | 82 |
| 2.1 Einschlusskriterium | 82 |
| 2.2 Ausschlusskriterien Mutter | 82 |
| 2.3 Ausschlusskriterien Kind | 82 |

| | |
|--|----|
| 3. Einverständniserklärung der PAULINA-Studie | 82 |
| 4. Fragebogen der PAULINA-Studie | 83 |
| 5. Epidemiologische Daten aus dem Klinikum der Maistraße | 86 |
| 5.1 Mutter | 86 |
| 5.2 Geburt | 87 |
| 5.3 Neugeborenes | 87 |
| 6. Gesamt-IgE | 87 |
| 7. Spezifisches IgE | 88 |
| | |
| 9. LITERATURVERZEICHNIS | 89 |
| | |
| 10. DANKSAGUNG | 96 |

1. EINLEITUNG

1. Stand der Forschung allergischer Erkrankungen im Kindesalter

1.1 Epidemiologie

In der westlichen Welt war in den letzten Jahren eine ansteigende Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen im Kindesalter zu beobachten [1].

Die weltweiten Trends der Prävalenz der allergischen Erkrankungen Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis und atopisches Ekzem wurden im Rahmen der ISAAC-Studie untersucht [2], [3].

Für Deutschland ergab sich hierbei innerhalb von 5 Jahren (zwischen 2002 und 2003) ein Anstieg der Prävalenz für alle drei Symptomgruppen, in beiden Altersgruppen (6-7 und 13-14 Jahre) der Studie (siehe Abb.1) [2].

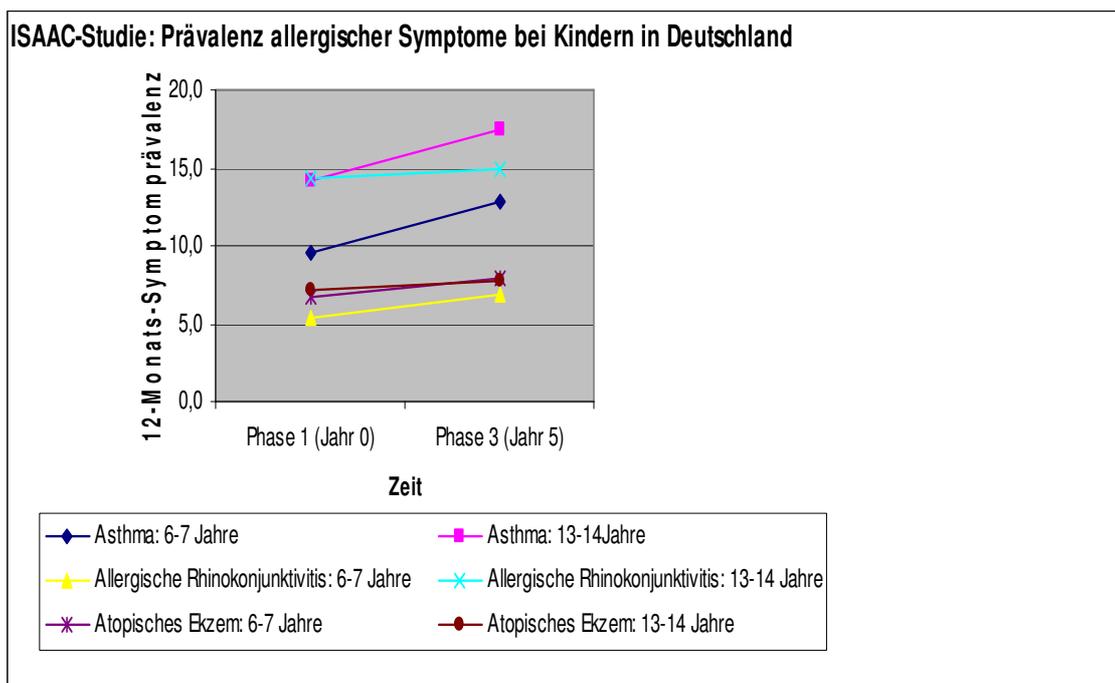


Abbildung 1: ISAAC-Studie: Prävalenz allergischer Symptome bei Kindern in Deutschland [2]

Die genauen Ursachen der Atopieentwicklung und ihrer steigenden Prävalenz sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Der Anstieg ist jedoch vermutlich auf eine multifaktorielle Genese zurückzuführen. Hierbei spielen Umwelt- und soziale Faktoren ebenso eine Rolle wie genetische Faktoren.

Umwelt- und soziale Faktoren umfassen die verbesserten Hygienebedingungen, sowie die erniedrigte Endotoxinexposition im frühen Kindesalter, auf die in dieser Arbeit näher eingegangen wird (siehe 2.2 Hygiene-Hypothese).

Durch die Zunahme der Häufigkeit allergischer Erkrankungen ergeben sich ansteigende Kosten für das Gesundheitswesen. Allein für Asthma bronchiale im Kindesalter betragen die geschätzten Ausgaben im Jahr 2004 innerhalb der Europäischen Union drei Milliarden Euro [4]. Zusätzlich sind die erheblichen Einschränkungen in der Aktivität der Betroffenen zu erwähnen, die zu Schulausfall oder Arbeitsunfähigkeit führen können [1]. Folglich steigt der Bedarf für präventive Maßnahmen. Diese könnten das Auftreten allergischer Erkrankungen reduzieren und so die Lebensqualität der Betroffenen erhöhen und Kosten sparen. Um präventive Maßnahmen realisieren zu können, ist es notwendig die Erforschung der Ursachen allergischer Erkrankungen zu fördern. Die PAULINA-Studie, in deren Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, soll einen Teil hierzu beitragen. PAULINA steht für „Paediatric Alliance for unselected longitudinal Investigation of Neonates for Allergies“ und untersucht Einflussfaktoren, die sich auf allergische Erkrankungen im Kindesalter auswirken können.

1.2 Pathogenese

Zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreis gehören die Trias:

- allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen),
- allergisches Asthma bronchiale,
- atopisches Ekzem (Neurodermitis).

Alle drei Erkrankungen sind mit einer atopischen Disposition, das heißt mit einer Überempfindlichkeit gegenüber bestimmten Allergenen, verbunden. Diese Überempfindlichkeit wird als Sofortreaktion, auch Typ I Reaktion nach den Immunologen Coombs und Gell bezeichnet und manifestiert sich als akute IgE-vermittelte Freisetzung von Entzündungsmediatoren [5].

Bei Erstkontakt mit einem Allergen, wie z.B. Pollen oder Hausstaubmilben, wird dieses, nachdem es die äußeren unspezifischen Barrieren (Epithelien der Haut und Schleimhäute) überwunden hat, von Antigen präsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten) über Endozytose aufgenommen und den Endosomen zugeführt. Im Anschluss an ihre Fusion mit den intrazytoplasmatischen Lysosomen beginnt die Degradation, bei der Fragmente, so genannte Peptide (T-Zell-Epitop) entstehen. Diese werden an MHC II- Moleküle gebunden zur Zelloberfläche von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) transportiert und dort präsentiert.

Angeborenes Immunsystem – Erworbenes Immunsystem

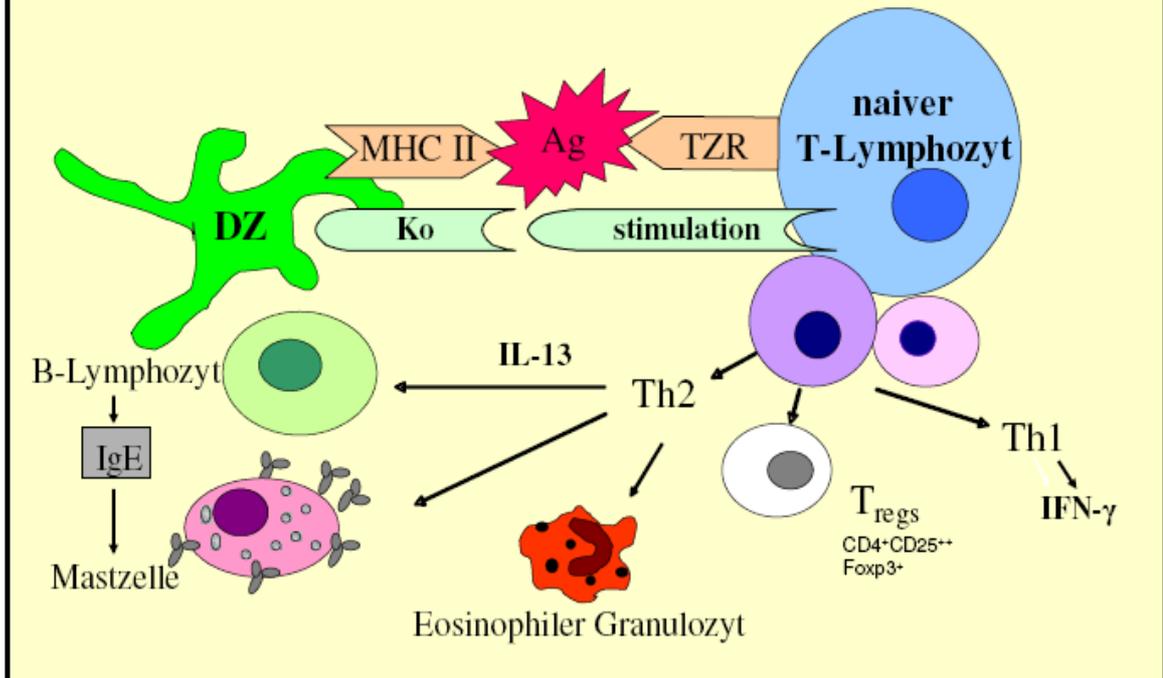


Abbildung 2: Immunregulation – Übersicht¹ (dendritische Zelle: DZ, hier repräsentativ für alle Antigen-präsentierenden Zellen (APZ); Allergen/Antigen: Ag)

Die APZ wandern nach der Allergenaufnahme in lokal drainierende Lymphknoten und präsentieren dort die T-Zell-Epitope den ruhenden, naiven T-Zellen.

Der MHC II Peptidkomplex kann von T-Zellen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) erkannt werden (allergenabhängiges Signal). Dieser benötigt dafür ein kostimulierendes Signal wie zum Beispiel CD28 auf T-Zellen sowie B7-Moleküle (CD80 und CD86) auf APZ. Zusätzlich stabilisiert der Korezeptor CD4 die Interaktion der T-Helferzelle mit der APZ, in dem er mit einer MHC II Domäne interagiert.

Dies führt zur Aktivierung der naiven T-Zelle zur Effektor T-Zelle. (Siehe Abb.2)

Bei atopischen Patienten kommt es zu einer Th2-Differenzierung mit überwiegender Produktion von Th2-Zytokinen, wie Interleukin-4, -5, -13 und der daraus resultierenden überschießenden Produktion von Immunglobulin E (IgE).

Die Ausbildung einer allergenspezifischen T-Helfer-2-Zell-Antwort (Th2) ist das Resultat aus einer komplexen Interaktion verschiedener Determinanten mit daraus resultierender Förderung einer Th2-Antwort und Inhibition einer Th1-Antwort.

¹ (modifiziert nach B. Schaub)

Über die freigesetzten Interleukine der aktivierten Th2-Zellen (Interleukin-4, -5) werden B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen dazu veranlasst IgE (Antikörper) zu synthetisieren.

Dies entspricht der Phase der Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Allergen.

Durch Anlagerung an IgE-Rezeptoren auf Mastzellen, sowie auf basophilen und eosinophilen Granulozyten führen diese Antikörper dazu, dass bei erneutem Allergenkontakt Histamin, Leukotriene, Prostaglandine und Zytokine (Entzündungsmediatoren) ausgeschüttet werden und zu einer allergischen Entzündung führen.

[1], [6]

1.3 Immunsystem

1.3.1 T-Helferzellen Typ 1 und 2

Bei aktivierten T-Zellen sind verschiedene Effektorfunktionen möglich, die vor allem durch die freigesetzten Zytokine definiert werden (siehe Tab.1).

Das sogenannte Th1/Th2-Modell (Th1/Th2-Dichotomie) hat seinen Ursprung in murinen Studien [7], [8]. Die beiden Effektor-T-Zell-Populationen Th1 und Th2 unterscheiden sich bezüglich ihrer sezernierten Zytokine (siehe Tabelle 1).

| Effektorpopulation | Th1 | Th2 |
|--------------------|--|-----------------------|
| Zytokine | IFN- γ IL-2 TNF- α | IL-4,-5, IL-13,-10 |
| Induktoren | IL-12, IFN- γ , IL-27 | IL-4 |

Tabelle 1: Th-1- und Th-2-Effektorzellen [9]

Diese Einteilung mittels Zytokinsekretion bietet einen nützlichen Rahmen zum Verständnis der frühen Entwicklung von Immunantworten [10].

Immunologische Th2-Antworten wirken sich atopiefördernd, Th1-Antworten atopieantagonisierend aus [11]. Vorhandene Atopie ist also mit der Produktion von Th2-Zytokinen assoziiert, Nicht-Atopiker dagegen produzieren vor allem Th1-Zytokine [12].

Zell-vermittelte Immunantworten vom Th2-Typ gegen harmlose Antigene (Allergene) spielen bei atopischen Allergien eine auslösende Rolle [13]. Th2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, 5, 6, 9, 10, 13 und TGF- β [1], [13], [6]. Sie fördern die Produktion von IgE und Eosinophilie [14].

Die Leitzytokine der Th1-Zellen sind Interleukin-2 und Interferon γ [1], [6]. Interferon γ hemmt das Wachstum von Th2-Zellen [14]. Interleukin-12 besitzt eine starke Th1 induzierende Aktivität und führt zur IFN- γ Produktion in menschlichen T-Zellen [15].

Die Polarisierung der T-Helferzellen ist jedoch komplexer, als noch vor einigen Jahren angenommen. Unter anderem können Th1- und Th2-Zytokine in ein und derselben T-Helferzelle koexprimiert werden [16], [17]. Es können T-Zellen mit einem Zytokinmuster nachgewiesen werden, das typisch sowohl für Typ1 als auch für Typ2-T-Zellen ist, weshalb diese Zellen gelegentlich als Typ0-Zellen bezeichnet werden [1], [16], [10].

Zudem werden inzwischen eine Reihe anderer Effektorzellen der T-Helfer-Lymphozyten beschrieben [9].

Das Th1/Th2-Modell, welches initial von in-vitro und murinen Studien abgeleitet wurde, scheint außerdem zu einfach strukturiert, um zelluläre Mechanismen im menschlichen Organismus zu erklären, man geht inzwischen von dem Ergebnis einer komplexeren Fehlregulation des Immunsystems aus [18]. Im Mittelpunkt der neuen These stehen die regulatorischen T-Zellen [13], die Th1- und Th2-Antworten ausbalancieren [19] beziehungsweise hemmen können [20]. Dennoch ist man bei der Allergieforschung noch nicht ganz vom Th1/Th2 Modell der Allergie abgekommen.

1.3.2 Regulatorische T-Zellen ($CD4^+CD25^{++}$ T-Zellen; $CD4^+CD25^{hoch}$ T-Zellen)

Natürliche Regulatorische T-Zellen ($CD4^+CD25^{hoch}$, Foxp3⁺), auch Suppressor T-Zellen genannt, machen 5 bis 10% des peripheren T-Zellpools beim erwachsenen Menschen aus [21]. Auch im Nabelschnurblut von Neugeborenen wurden bereits regulatorische T-Zellen beschrieben [22].

Genetisch ist der suppressive Phänotyp der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 assoziiert [23], der bisher als spezifischster Marker für $CD25^+$ regulatorische T-Zellen gilt [24], [25], [26], [27], [28].

Während bei der Maus die Population der $CD4^+CD25^{niedrig}$ und der $CD4^+CD25^{hoch}$ T-Zellen regulatorische Fähigkeiten besitzen, ist es beim Menschen lediglich die $CD4^+CD25^{hoch}$ T-Zell-Population [29]. Beim Menschen besitzt die $CD25^{hoch}$ -Fraktion der $CD4^+CD25^+$ Population der Lymphozyten im peripheren Blut also höhere suppressive Aktivität als die $CD25^{niedrig}$ Fraktion [30].

Regulatorische T-Zellen sind wahrscheinlich zentral an der Limitierung einer Immunantwort gegenüber Fremdanigenen und an der Erhaltung der Toleranz gegenüber

Selbst-Antigenen beteiligt [1]. Sie sind in der Lage Th2- und Th1-Antworten des Immunsystems zu unterdrücken [31] und scheinen daher bei der Allergieentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen.

1.3.3 Lymphozytensubtypen und ihre Expression von CD-Oberflächenantigenen

Die Expression von CD-Oberflächenantigenen findet auf verschiedenen Zellen des Immunsystems statt. CD4 ist ein Ligand für MHC II Moleküle und dient als Marker für T-Helferzellen. CD25 stellt die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors dar und wird von mit Lipopolysacchariden (LPS) stimulierten Monozyten exprimiert. Es ist ein Marker für aktivierte Immunzellen. CD4⁺CD25⁺ Zellen entsprechen aktivierten T-Helferzellen, CD4⁺CD25^{hoch} Zellen den bereits erwähnten regulatorischen T-Zellen. CD19 ist ein Korezeptormolekül für die Aktivierung von B-Lymphozyten und dient somit als Marker für diese. CD8 ist ein Ligand für MHC I Moleküle und dient als Marker für zytotoxische T-Zellen. [1]

Der Anteil und Einfluss der einzelnen Lymphozytensubtypen bei der Allergieentwicklung ist noch nicht vollständig geklärt.

2. Mütterliche Atopie – wichtigster Risikofaktor für allergische Erkrankungen im Kindesalter?

Ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter ist die Atopie der Eltern [32], [33].

J.J. Cogswell gab das allgemeine Allergierisiko für das Jahr 2000 in der britischen Bevölkerung mit 20% an, das Risiko bei einem atopischen Elternteil mit 50% und das bei beiden atopischen Elternteilen mit 66% [34].

Vermutlich spielt aber der atopische Status der Mutter eine größere Rolle als der des Vaters, überträgt also ein höheres Risiko einer Veranlagung für allergische Erkrankungen auf das Kind [35]. Mütterliche Allergien können die Umgebung des Kindes und somit auch das kindliche Immunsystem bereits zusätzlich in utero beeinflussen [36].

Für die PAULINA-Studie wurden mononukleäre Zellen im Nabelschnurblut (CBMCs) von Kindern mit Müttern mit und ohne atopische Erkrankungen untersucht. Der ärztlich diagnostizierte Atopiestatus der Eltern wurde durch standardisierte (ISAAC-adaptierte) Fragebögen ermittelt.

3. Bedeutung der mikrobiellen Stimulation

Pathogene bilden das Immunsystem aus und sorgen für eine balancierte Th1/Th2-Antwort [37]. Der Kontakt mit mikrobiellen Substanzen wie Endotoxin soll nicht-allergische Th1-Immunantworten fördern [18]. Die mikrobielle Stimulation des kindlichen Immunsystems ist somit wichtig für eine normale, also nicht-allergische Entwicklung des Immunsystems [38].

3.1 Potenzieller Schutz vor allergischen Erkrankungen durch Endotoxinexposition im Kindesalter?

Bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter spielen unter anderem Umwelt- und soziale Faktoren eine Rolle. In einigen epidemiologischen Studien konnte ein protektiver Effekt der Lebensbedingungen auf einem Bauernhof (erhöhte Endotoxinexposition) für die Entwicklung allergischer Erkrankungen beobachtet werden. Bei Kindern, die auf einem Bauernhof aufwuchsen, war die Prävalenz von Asthma, allergischer Rhinokonjunktivitis und atopischer Sensibilisierung für inhalative Allergene deutlich geringer als bei Kindern, die nicht auf einem Bauernhof aufwuchsen [39], [40] (siehe Abbildung 3).

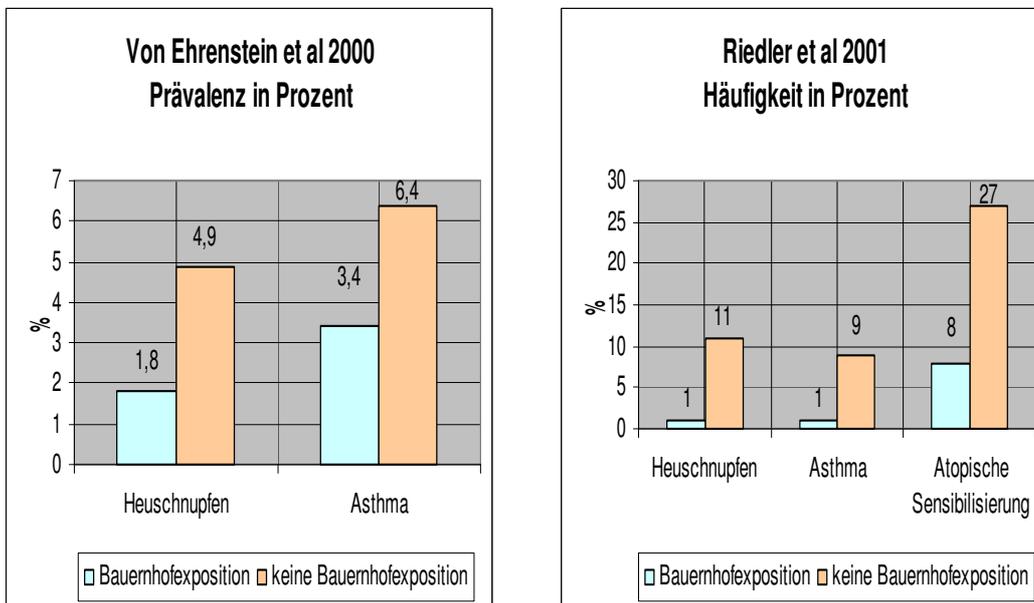


Abbildung 3: A Prävalenz allergischer Erkrankungen in Prozent (%) [39];

B Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Prozent (%) [40]

Als Hinweis für einen kausalen Zusammenhang wurde in einer weiteren Studie eine inverse Beziehung der Prävalenz von Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen, atopischer Sensibilisierung und der Endotoxinbelastung in den Matratzen von Kindern

zwischen 6 und 13 Jahren festgestellt [41]. Hohe Endotoxinbelastung korrelierte hier erneut mit einer niedrigen Krankheitsprävalenz. Auch das Aufwachsen mit Haustieren scheint bei Kindern über eine höhere Endotoxinbelastung zu einer niedrigeren Prävalenz von Atopie und Asthma zu führen [42]. Tse et al berichten über eine Korrelation von Bauernhofexposition, Tierexposition, Genuss nicht-pasteurisierter Milch und/oder Endotoxinexpositionen während der Kindheit und einer reduzierten Inzidenz allergischer Erkrankungen [43].

3.2 „Hygiene-Hypothese“

Der Epidemiologe Dr. Strachan formulierte die „Hygiene-Hypothese“ im Jahre 1989. Er betrachtete Infektionen in früher Kindheit als mögliche Allergieprävention. Die Infektionen werden durch den Kontakt mit älteren Geschwistern oder bereits pränatal durch die Mutter übertragen.

Dr. Strachan erklärte den Anstieg der Asthma-/Rhinokonjunktivitisprävalenz (zwischen 1970 und 1981) [44] und des atopischen Ekzems (zwischen 1946-1970) [45] in Großbritannien durch ein Abnehmen der Familiengröße, Verbesserung der Lebensbedingungen und höhere Standards der persönlichen Sauberkeit. Aufgrund dessen waren die Möglichkeiten der Infektionsübertragung in jungen Familien reduziert, was laut Dr. Strachan zu einem ansteigenden Auftreten atopischer Erkrankungen geführt haben könnte. [46]

Die sogenannte „Hygiene-Hypothese“ gibt seither Anlass zu Diskussionen.

Bisher wurden eine Reihe von Faktoren wie sauberes Wasser und Nahrung, Hygiene, Antibiotika und Impfstoffe, Geburtspraktiken und zufälligen Faktoren wie der Umzug aus ländlichen Gegenden in die Stadt untersucht, welche zu der veränderten mikrobiellen Exposition geführt haben könnten [47].

Aktuell wird vor allem die sinkende mikrobielle Exposition für die ansteigende Atopieinzidenz der letzten Jahre verantwortlich gemacht [47].

Die Hygiene-Hypothese soll die Leistung der gesteigerten Hygiene für die sinkende Prävalenz von Infektionserkrankungen jedoch keineswegs schmälern.

Der Einfluss von mikrobiellen Substanzen auf das Immunsystem erfolgt über Toll-like Rezeptoren.

3.3 Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Toll-like-Rezeptoren sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Mikroorganismen.

Das erste, so genannte Toll-Protein wurde bei der Drosophila-Fliege gefunden, bei der bisher 9 dieser Proteine bekannt sind (Toll, 18-wheeler, Toll-3 bis -9) [48], [49].

Beim Menschen wurden bisher 10 (TLR 1-10) [6], [50], [49], bei der Maus 12 Toll-like-Rezeptoren (TLR 1-9 und 11-13) beschrieben [51], [52].

Nach Erkennung ihrer Liganden induzieren TLRs die Expression einer Reihe von Abwehrgenen. Diese beinhalten entzündliche Zytokine und Chemokine, antimikrobielle Peptide, kostimulierende Moleküle, MHC Moleküle und andere Faktoren, die nötig sind, um die Wirtszelle vor dem eindringenden Pathogen zu schützen. [53], [6].

Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4)

Der Toll-like-Rezeptor 4 ist das menschliche Homolog zum Drosophila Toll Protein [53] und stellt eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar [54]. Exprimiert wird er vor allem auf der Oberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen [55], [6], also Antigen präsentierenden Zellen. Die wichtige Rolle des TLR4 besteht in der Erkennung von Hauptkomponenten gramnegativer Bakterien [53], den Lipopolysacchariden (LPS) [56]. Er ist der signaltransduzierende Rezeptor für LPS [1].

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien und deren Hauptvirulenzfaktor [57]. Sie bestehen aus Lipid A (Endotoxin), Kern Oligosaccharid und O-Antigen [58].

In murinen Studien wurde gezeigt, dass Mäuse mit einer Deletion des TLR4 Gens nicht in der Lage sind, auf die Stimulation mit Lipopolysacchariden mit einer Immunantwort zu reagieren [53].

Beim Menschen sind Mutationen des TLR4 Gens mit einer Hyporeagibilität gegenüber Endotoxin assoziiert [59].

Der Einfluss von Lipid A als TLR4-Agonist steht in dieser Arbeit im Zentrum des Interesses. Die Antwort auf Endotoxin soll über eine Interaktion zwischen der Lipid A Komponente und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (u.a. TLR4) vermittelt werden und zu einer starken Th1-Antwort führen [18]. Man nimmt an, dass TLR4

Agonisten durch diese Induktion von Th1-Antworten allergische Th2-Antworten senken können [60]. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den protektiven Effekt von Endotoxin sein (siehe 3.).

Auch regulatorische T-Zellen scheinen über den Toll-like-Rezeptor 4 indirekt aktivierbar zu sein. Laut Caramalho et al exprimieren regulatorische T-Zellen von Mäusen TLR4 und eine Stimulation mit dem TLR4-Agonisten LPS aktiviert das Überleben/ die Proliferation der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen [61].

TLR4 kann beim Menschen auf einer Vielzahl von Zellen, einschließlich Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophiler Granulozyten, Mastzellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden [1], unter anderem auch auf regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25^{hoch}) [62].

Mikrobielle Moleküle (wie LPS), die mit dem angeborenen Immunsystem interagieren, modifizieren allergische Antworten, indem sie regulatorische T-Zellen fördern [18]. Dies könnte eine zusätzliche Erklärung für den protektiven Effekt von Endotoxin bei der Allergieentwicklung sein (siehe 3.).

Lipid A, das für die biologische Aktivität [63] und die proinflammatorischen Effekte [55] von Lipopolysacchariden verantwortlich ist, wurde für die PAULINA-Studie als mikrobieller Stimulus für CBMCs eingesetzt.

4. Möglicher Einfluss mikrobieller Stimulation auf das Immunsystem

Bakterielle Endotoxine sollen in der Lage sein, die Produktion von Interferon- γ und Interleukin-12 (Zytokine vom Th1-Typ) zu induzieren und besitzen möglicherweise das Potenzial allergische Sensibilisierung zu vermindern [42], [64].

4.1 Möglicher schützender Einfluss mikrobieller Stimulation auf das kindliche Immunsystem bezüglich allergischer Erkrankungen

Vor allem die ersten Lebensjahre sind entscheidend für die Reifung des Immunsystems und somit auch für „Fehlentwicklungen“ wie sie zum Beispiel bei der Atopieentstehung vorkommen. Man geht schon lange von einer Art „Sensibilisierungsfenster“ für Allergene während dieser Zeit aus [65].

Van der Velden folgte nach einer Verlaufsstudie, dass die ersten 6 Monate des Lebens ein kritisches Zeitfenster für die Initiierung von immunologischen Veränderungen darstellen, die in einer Atopieentwicklung resultieren können [66]. Folglich könnten

auch andere Einflüsse der Umwelt auf das Immunsystem, wie zum Beispiel die Endotoxinexposition zu diesem Zeitpunkt von besonderer Bedeutung sein.

Seit 1998 geht man davon aus, dass ein Neugeborenes ein Th2-ausgerichtetes Immunsystem hat [67]. Wenn in frühester Kindheit das Immunsystem noch ausreift, könnte die Induktion einer starken Antwort vom Th1-Typ dazu führen, dass andere Immunantworten als die vom Th2-Typ bevorzugt werden [18] und somit die Entstehung allergischer Th2-vermittelter Erkrankungen verhindert wird. Dies könnte durch Infektionen und die Exposition nicht-pathogener Mikroorganismen geschehen [67], die somit protektiv auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter wirken.

In einer Studie von Riedler und Braun-Fahrlander et al wurde beobachtet, dass für diesen protektiven Effekt von Endotoxin bei der Atopieentwicklung mehrere Faktoren ausschlaggebend sind: Der Zeitpunkt der Endotoxinexposition in oder sogar vor dem ersten Lebensjahr, die Menge und die Dauer der Exposition. Verglichen mit Kindern, bei denen keine Stallexposition in den ersten fünf Lebensjahren vorlag, war die Häufigkeit von Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung bei Kindern, die während ihres ersten Lebensjahres mehr als 20 Minuten (Median) pro Tag im Stall verbracht hatten, am geringsten [40].

Endotoxine sind Bestandteile von Lipopolysacchariden und diese wiederum sollen laut Tulic et al auch in der Lage sein das Auftreten einer allergischen Entzündung in der nasalen Mucosa atopischer Kinder zu verhindern, indem sie die lokalen Immunantworten (durch TLR4 vermittelt) von Th2 nach Th1 verschieben [54].

Möglicherweise wird das Immunsystem eines Kindes zu einem noch früheren Zeitpunkt, also bereits pränatal beeinflusst. In der pränatalen Phase spielt zum einen die genetische Prädisposition durch den Atopiestatus der Mutter beziehungsweise der Eltern eine große Rolle, zum anderen ist die „in utero-Umgebung“ von Bedeutung.

Der Th1-fördernde Effekt von Endotoxin wird als potenziell schützend erachtet, wenn die Exposition bereits früh im Leben, also vor der Entstehung von Asthma und Allergien stattfindet [18].

Douwes et al fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Bauernhofexposition der Mutter während der Schwangerschaft und dem erniedrigten Auftreten von Asthma, allergischer Rhinokonjunktivitis und atopischen Ekzem bei ihrem Nachwuchs [68].

Im Rahmen der PARSIFAL-Studie fand man zusätzlich eine negative Assoziation zwischen Stallexposition der Mutter während der Schwangerschaft mit der atopischen Sensibilisierung ihrer Kinder (im Alter zwischen 5 und 13 Jahren) und eine positive Assoziation mit ihrer Genexpression von TLR4 [69]. Ege et al schlussfolgerten, dass der Umgang der Mutter mit einer Umwelt voller mikrobieller Substanzen während der Schwangerschaft ihren Nachwuchs vor der Entwicklung atopischer Sensibilisierung in der Kindheit schützen und zu einer Hochregulation der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems führen könnte [69].

4.2 Mononukleäre Zellen im Nabelschnurblut (CBMCs)

Die Reifung des fetalen Immunsystems beginnt früh. Lymphozyten sind bereits nach sieben Wochen im fetalen Thymus vorhanden und das fetale Immunsystem ist in der 15. Woche in der Lage auf uterine Faktoren zu reagieren [34].

Die allergen-spezifischen Immunantworten des Feten wurden in Studien mit Hilfe von Nabelschnurblutproben erforscht [34]. Zur Identifikation der frühesten Immunantwort wurde in der PAULINA-Studie Nabelschnurblut verwendet. Die Immunantworten der extrahierten mononukleären Zellen wurden vor und nach Endotoxin- und Mitogenstimulation untersucht. Mitogene regen die Proliferation von Zellen an [70]; bei der Untersuchung diente daher das Mitogen Phytohämagglutinin als potenter Stimulus für das Zellwachstum und als Positivprobe.

Lipid A (Endotoxin) entspricht einem Stimulus des angeborenen, PHA (ein Mitogen) einem Stimulus des erworbenen Immunsystems.

2. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen mütterlicher Atopie, dem Hauptrisikofaktor für die Entwicklung atopischer Erkrankungen bei Kindern und der Immunantwort der Neugeborenen im Nabelschnurblut zu erforschen.

Die Immunantwort der Neugeborenen wurde im Speziellen vor und nach in vitro Stimulation mit Endotoxin als Agonist des Toll-like Rezeptor 4 sowie nach Mitogenstimulation untersucht.

Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die Prävalenz atopischer Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten einen starken Anstieg zu verzeichnen hatte, bei Exposition mit mikrobiellen Substanzen wie TLR4-Agonisten aber eine Verringerung atopischer Erkrankungen bekannt ist (z.B. niedrigere Prävalenz und Häufigkeit von allergischem Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis bei Kindern, die auf einem Bauernhof aufwachsen [39], [40]).

Diese Arbeit wurde im Rahmen der prospektiven Geburtskohortenstudie PAULINA durchgeführt. Es wurden sowohl epidemiologische als auch experimentelle Daten erhoben.

Die PAULINA-Studie soll einen Beitrag zur Aufklärung immunologischer Vorgänge der Entwicklung atopischer Erkrankungen leisten.

Ziel der Studie war es:

- Die Annahme, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen bei atopischen Individuen bzw. Personen mit erhöhtem Atopierisiko erniedrigt ist, zu untersuchen.
- Mögliche Unterschiede auf zellulärer Ebene im Nabelschnurblut von Kindern mit atopischer und nicht atopischer Familienanamnese (vor und nach Stimulation) festzustellen.
- Endotoxinbelastung in vitro zu simulieren und deren angenommenen protektiven Effekt hinsichtlich der Zytokinproduktion und Expression von CD-Oberflächenantigenen zu überprüfen.
- Herauszufinden, wie die Immunantworten der mononukleären Zellen im Nabelschnurblut nach Endotoxinstimulation durch die mütterliche Atopie beeinflusst werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

1. Laborgeräte

| Geräte | Firma |
|--|---|
| Sterilhood | LaminAir HBB2472 |
| Neubauer-Zählkammer | Assistent |
| Mikroskop Laborlux D | Leitz |
| Zentrifuge Zellkultur Rotanta/S | Hettich |
| Zentrifuge allgemeines Labor | Heraeus |
| Eppendorf-Zentrifuge 5415R | Eppendorf |
| Wärmeschrank Zellkultur | Fa. Thermo, Electron, LED, GmbH |
| Wärmeschrank Immunologie | Heraeus 6000 |
| Kühlschrank Eco Star | Siemens |
| Kühlschrank ***; Economic ***; Eisschrank -20°C Economic | Bosch |
| Hood UV Umluft (Immunologie) | Unbekannt |
| Kombi Zell-Harvester | Skatron |
| Beta-Counter LS 6000IC | Beckmann Coulter |
| Szintillationsröhrchen (3071401) | Zinsser-Analytik |
| Filterpapier (Filtermats 11731) | Skatron |
| Vortex Genie 2 | Scientific industries |
| Mikroplattenrüttler: Type Rotamax 120 | Fa. Heidolph |
| Absauggerät (Biorad Vacuum Regulator) - Wanne - Ventil | Biorad Millipore REGO Burlington N.C. |
| Luminex-Gerät 100; SD | Luminex |
| Bio-Plex Manager Software 4.1 | Biorad |
| FACScan (3-Farben-Durchflusszytometer) | Becton-Dickinson, Germany |
| Cell-Quest Software | Becton-Dickinson, Germany |
| Postacquisition analysis: Win MDI 2.8 software | Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA |
| Wasserstrahlpumpe für FACS-Färbung (1 Liter Glasgefäß) | Schott-Duran oder Millipore |

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

2.,,Verbrauchsmaterialien“ und Reagenzien

| Pipette | Volumen | Firma |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Pipette | 10ml | Sarstedt; Eppendorf Easypet 4421 |
| Pipette | 2-20µl, 20-200µl, 300-1000µl | Eppendorf RESEARCH® |
| 8-Kanal Pipette | 30-300µl | Eppendorf RESEARCH® Multichannel |
| Multipipette (Nichiryo 8100) | . | Süd-Laborbedarf |
| Multipipette® plus | 1µl-10ml | Eppendorf |
| Pipettenspitzen/ -aufsätze | . | Sarstedt oder Eppendorf |

Tabelle 3: Pipetten und –zubehör

| Gefäß | Volumen | Firma |
|--|----------------|-------------------------------------|
| Konisches Röhrchen (Falcon Polypropylene) | 15ml, 50ml | BLUE MAX tm Jr, Becton Dickinson |
| Standard micro Test Tubes | 1,5ml | Eppendorf |
| Multiply® pro Gefäß | 0,2ml | Sarstedt |
| Propylen Röhrchen (zum Aufbewahren bei -80°C) | 2,0ml | Corning Cryogenic Vial |
| Polypropylen (FACS-) Röhrchen | 5,0ml | BD biosciences (Falcon™) |
| Petrischale (tissue culture dish) | Ø 60mm | IWAKI, Japan |
| Multiwell™ Platte 6well für Zellkultur (Zytokine und CD-Oberflächenantigene) | Flachboden | BD, USA Falcon |
| Microtest™ Platte 96well für Zellkultur (Proliferation) | Flachboden | BD, USA Falcon |
| Platte 96well (für Luminex) | Filterboden | Millipore |
| Trog: Tip-Tub | . | Eppendorf |

Tabelle 4: verwendete Laborgefäße

| Verwendungszweck | Material | Firma |
|--------------------------------------|--|--------------|
| Venöses Nabelschnurblut | 4 Monovetten neutral 9ml | Sarstedt |
| Liquemin N 7500 (Heparin-Natrium) | Liquemin für Monovetten 7500 I.E. (5 Tropfen) | Roche |
| Venöses Blut der Mütter | 4,9 ml, Z-Gel, S-Monovette | Sarstedt |

Tabelle 5: Material zur Blutentnahme

| Substanzen | Konzentration | Proliferation (μl) | Zytokine; CD- Antigene (μl) | Firma |
|-------------------|----------------------|--|---|--------------|
| PHA* | 5ug/ml | 3 | 5 | Sigma |
| Lipid A # | 0.1ug/ml | 3 | 5 | Sigma |

Tabelle 6: Substanzen zur Stimulation der Zellen (* Phytohämagglutinin (Mitogen); # Lipid A von diphosphoryl Salmonella minnesota Re 595)

| Reagenzien | Hersteller |
|--|-----------------------|
| PBS (Phosphate buffered saline); RPMI#; Trizol | Invitrogen |
| Ficoll-Paque plus ® | GE Healthcare |
| Humanserum; Tryptanblau 0,4% | Sigma |
| 10% PSG* | GIBCO |
| ACK Lysepuffer | BioWhittaker, Cambrex |

Tabelle 7: Reagenzien für die Zellkultur (#Roswell Park Medical Institute mit Glutamin); (*hier: Penicillin, Streptomycin)

Herstellung des Humanserum 10%

880ml RPMI mit 20ml PSG und 100ml Humanserum mischen und in 50ml Röhren abfüllen.

| Reagenzien | Hersteller |
|--|-------------------|
| Tritium Methyl-H3-Thymidin | Fa. Amersham |
| Szintillationsflüssigkeit: Rotszint® eco | Roth |

Tabelle 8: Reagenzien zur Messung der Proliferation

| Reagenzien | Firma |
|---|--------|
| Zytokinkit (Human-Cytokine-Multiplex-Assay-Kit) | Biorad |
| Bio Plex Sheath-Flüssigkeit für Luminex-Gerät | Biorad |

Tabelle 9: Reagenzien zur Durchführung der Zytokinmessung

| Reagenzien | Hersteller |
|--|-------------------------|
| Human Serum | Fa Sigma, H1388 |
| PBS (Phosphate buffered saline); RPMI | Invitrogen |
| 0,5% Tween 20 | Fa Merck |
| Natriumazid 10% | Serva |
| PFA (Paraformaldehyd); Natriumhydroxid (NaOH) 10N | Sigma |
| Natriumhypochlorid (1:10 verdünnt) | Merck (Nr.100983(2,5l)) |

Tabelle 10: Reagenzien für das Durchflusszytometrieprotokoll

Waschpuffer für FACS (Flourescens activated cell sorting)

25ml 10-fach PBS mit H₂O auf 250ml auffüllen. 12,5ml Humanserum und 1,25ml Tween (Polyaethylenglykolsorbitanmonolaurat) zufügen und mischen.

PBS für FACS

100ml 10-fach PBS mit 900ml H₂O auffüllen und 1ml Natriumazid (zur Sterilität) hinzugeben und mischen.

PFA 1% für FACS

10g PFA mit 900ml destilliertem Wasser und 80 µl 10N NaOH mischen und zirka 30 Minuten bei 65°C erwärmen, bis die Lösung klar ist. Zugabe von 100ml 10-fach PBS mit Hydrochlorid auf pH 7,4 einstellen und steril filtrieren. Lagerung bei -20°C.

| Antikörper | Firma |
|-------------------|------------------|
| CD4 FITC | Beckmann Coulter |
| CD19 RPE-Cy5 | Beckmann Coulter |
| CD8 PC5 | Beckmann Coulter |
| CD25 PC5 | Beckmann Coulter |

Tabelle 11: Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Isotypenkontrollen | Firma |
|---------------------------|-----------------|
| IgG1 FITC | DAKO Cytomation |
| IgG2a RPE-Cy5 | BD |
| IgG1 PC5 | BD |
| IgG2a PC5 | BD |

Tabelle 12: Isotypenkontrollen für die Durchflusszytometrie

| Reagenzien | Firma |
|-------------------|----------------|
| Sheath (FACSFlow) | BD Biosciences |
| FACSClear | BD Biosciences |
| Clean (FACSRinse) | BD Biosciences |

Tabelle 13: Reagenzien für die Messung am Durchflusszytometer

3. Untersuchungskollektiv

Die Mütter wurden während der Schwangerschaft in der ersten Frauenklinik der Ludwig-Maximilian-Universität Maistrasse im Rahmen der Studie PAULINA (im Zeitraum von Oktober 2004 bis Februar 2007) rekrutiert.

Dies wurde von Gynäkologen der ersten Frauenklinik in der Maistrasse, LMU München übernommen.

Vorraussetzung für die Studienteilnahme der Mütter war eine unkomplizierte termingerechte Geburt. Ausgeschlossen wurden Mütter mit:

- schweren Erkrankungen, insbesondere Autoimmunerkrankungen und/oder
- Infektionen/Antibiotika-Therapie im letzten Trimenon der Schwangerschaft oder

während der Geburt und/oder

- Komplikationen und/oder Fieber während der Geburt und/oder
- erhöhtem C-reaktiven Protein (>0,5mg/dl) und/oder
- Hepatitis

sowie Neugeborene, die

- eine Antibiotikatherapie oder
- Intensivstation nach Geburt

benötigten.

Nach Einhaltung der Ausschlusskriterien waren von allen 161 Müttern bei 118 (73%) Müttern und ihren Neugeborenen die epidemiologischen Daten vollständig sowie genügend Nabelschnurblut für die immunologischen Testungen vorhanden.

Die PAULINA-Studie wurde durch die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer genehmigt.

Die werdenden Mütter beantworteten einen ISAAC-adaptierten Fragebogen und gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie (Fragebogen und Einverständniserklärung siehe Anhang).

Nach der Geburt wurden aus den Krankenhausakten die Kindsdaten, sowie die Informationen über den Geburtsverlauf und ggf. zusätzliche Informationen über die Mutter erhoben (siehe Anhang).

4. Charakteristika des Immunsystems (Nabelschnurblut)

Zur Bestimmung der Parameter des Immunsystems wurde venöses Blut aus der Nabelschnur der Neugeborenen, sowie venöses Blut ihrer Mütter verwendet. In Vorstudien konnte gezeigt werden, dass bei Verarbeitung des Blutes innerhalb eines Zeitrahmens von 24 Stunden optimale Ergebnisse erzielt werden konnten. Das Blut wurde somit innerhalb 24 Stunden nach Blutentnahme bzw. nach Geburt prozessiert.

4.1 Bestimmung Gesamt- und spezifisches IgE im mütterlichen Serum

- Venöses Blut der Mütter bei 1200rpm 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand (Serum) abpipettieren und in 4 1,5ml Röhrchen füllen.

- Aufbewahrung des Serum bis zur Messung des Gesamt- und spezifischen IgE bei minus 80°C.

Die Messung des Gesamt-IgE wurde im Allergielabor der LMU München mittels ELISA vorgenommen. Die Messung des spezifischen IgE wurde mittels RAST-Test (RA 2, Atopy- Screen; ADL Matritech Freiburg; siehe Anhang) für die 20 häufigsten Allergene durchgeführt (Frau Kempa). Hierbei wurden Werte >0,7 IU/ml auf mindestens ein Allergen als atopisch definiert [71], [72].

4.2 Nabelschnurblut

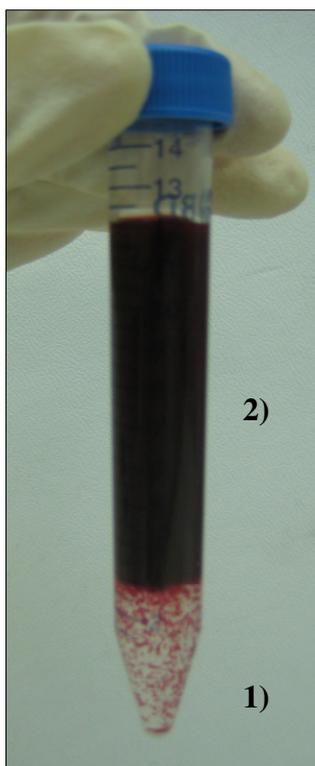
Das Nabelschnurblut wurde von den Mitarbeitern des Kreißsaals in maximal 4 Liquemin-Röhrchen abgenommen.

Die Verarbeitung des Nabelschnurblutes wurde nach maximal 24 Stunden von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schaub nach einem vorgeschriebenen Protokoll durchgeführt.

Im Vorfeld wurden kinetische und Titrationsstudien durchgeführt, um die optimale Inkubationsdauer und Konzentration, der für die Experimente nötigen Reagenzien und Stimuli in Erfahrung zu bringen (Daten nicht gezeigt).

Alle folgenden Arbeiten fanden in einer Steril-Hood statt.

Isolation von Mononukleären Zellen im Nabelschnurblut (CBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation



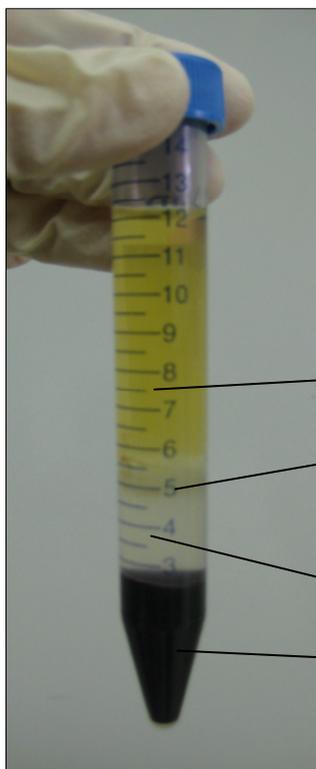
- Blut abmessen und in 50 ml Röhrchen überführen.
- Anschließend PBS im Verhältnis 1:2 zugeben.
- 3 ml Ficoll **1**) in 15 ml Röhrchen vorlegen.
- 8-9 ml PBS-Blut-Gemisch **2**) langsam auf die Ficollphase aufschichten, um diese nicht zu durchbrechen.
- Röhrchen bei 20°C, 1400 rcf und Bremse 0-2 für 30 Minuten zentrifugieren.

Abbildung 4: PBS – Blut - Gemisch auf Ficoll

Vorbereitung der 96 well Platten für die Proliferation

- Je 300 µl Humanserum in 3 Petrischalen pipettieren.
- In eine Petrischale 3 µl Phytohämagglutinin hinzufügen.
- In eine zweite Petrischale 3 µl Lipid A hinzugeben.
- Die dritte Petrischale bleibt ohne Zugabe eines Stimulus.
- Je zwei Vertiefungen der Proliferationsplatte mit jeweils 100 µl des passenden Humanserum-Stimulus-Gemisches aus einer Petrischale füllen.

Nach der Zentrifugation sehen die verschiedenen Lagen des Ficoll-Gemisches folgendermaßen aus (siehe Abbildung 5).



Gelb: Serum mit Thrombozyten

Weiß: CBMC-Ring (mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut: T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen)

Klar: Ficoll-Schicht

Rot: Erythrozyten und Granulozyten.

Abbildung 5: Nabelschnurblut nach Ficoll-Dichtegradient-Zentrifugation.

Zählung der Zellen

- Weißen CBMC-Ring mit Pipette entfernen und in 15 ml Röhrchen überführen.
- Mit dem Zellkulturmedium RPMI auf 14 ml auffüllen und mischen.
- Anschließend bei 20°C ,1100 rcf und Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand entfernen und 10ml RPMI zugeben, erneut mischen.
- 50 µl entnehmen und in ein kleines konisches Gefäß überführen.
- 50 µl Lysepuffer hinzufügen und das Gefäß für 7,5 Minuten auf Eis stellen.

- Anschließend 50 µl Tryptanblaulösung zur Anfärbung der Zellen beifügen.
- Nach dem Mischen der Zelllösung, 10 µl auf die Neubauer Zählkammer auftragen und die Zellen zählen.
- Zellen einer Reihe (4 große Kästchen des mittleren Feldes) 2 Mal zählen und durch 2 dividieren.
- Zum Beispiel 100 gezählt: $100/2 = 50 \rightarrow 50 \cdot 4 \cdot 3 \cdot 10 \cdot 10.000 = 60 \cdot 10^6$

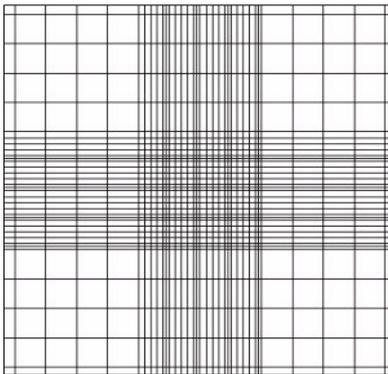


Abbildung 6: Neubauer Zählkammer

- Währenddessen verbliebenes Zell-RPMI-Gemisch bei 20°C ,1100 rcf und Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand des Gemisches abnehmen und die Menge an Humanserum zufügen, die nötig ist, um nach Zählung der Zellen eine Konzentration von 5 Millionen Zellen pro Milliliter zu erhalten und anschließend mischen.
- Zum Beispiel: $60 \cdot 10^6$ gezählte Zellen/ $5 \cdot 10^6 = 12$.
- 12 ml Humanserum hinzufügen und mischen.

Füllen der 96 well Platten für die Proliferation

- Je 100 µl dieser Zelllösung in die bereits gefüllten Vertiefungen der Zellkulturplatte pipettieren.
- Fertige Platte für zirka 72 Stunden im Wärmeschrank bei 5%CO₂ und 37°C inkubieren.

Füllen der 6 well Platten für die Zytokine

- Zwei Vertiefungen der 6 well Platte für die Zytokine mit je ein, besser zwei Milliliter der Zellmischung füllen.
- In die erste der Vertiefungen 5 µl Phytohämagglutinin (PHA) hinzufügen und mischen.
- In die zweite der Vertiefung 5 µl Lipid A (LpA) hinzufügen und mischen.
- Platte für zirka 72 Stunden in den Inkubator (5%CO₂ und 37°C) stellen.

Gewinnung des Überstandes der unstimulierten Zellen für die Zytokinmessung

- 2ml der Zell-Mischung ohne Zugabe von Antigen bei 20°C ,1100 rcf und Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand abnehmen, in zwei 1,5 ml Röhren verteilen und bis zur Zytokinmessung bei minus 80°C lagern.

Gewinnung der Zellkultur-Überstände der stimulierten Zellen für die Zytokinmessung

- Nach zirka 72 Stunden Zellen in den betreffenden Vertiefungen mittels Zellschaber vom Boden ablösen und Humanserum-Zell-Gemisch in 15 ml Röhren füllen.
- Bei 20°C ,1100 rcf und Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand abnehmen, in je zwei 1,5 ml Röhren (PHA und LpA für die spätere Zytokinmessung) verteilen und bei -80°C aufbewahren.

Die verbliebenen Zellen werden für weitere Versuche im Rahmen der PAULINA-Studie verwendet.

4.3 Bestimmung der Proliferation der mononukleären Zellen (CBMCs)

Grundprinzip und Durchführung

Die Bestimmung der Proliferation findet unter Verwendung von Radioaktivität statt. Es wird das Prinzip der ³H-Thymidin-Inkorporation angewandt. Das Verfahren ist in der klinischen Diagnostik auch als Lymphozytentransformationstest bekannt [1].

- Proliferationsplatte (96wells) nach zirka 72 Stunden aus dem Wärmeschrank entnehmen.

- Anschließend die gefüllten Vertiefungen der Proliferationsplatte mit je 25 μl radioaktivem ^3H -Thymidin markieren (mit Pipette pipettieren) und für 6-10 Stunden erneut bei 5% CO_2 und 37°C inkubieren.

Während der Inkubation dringt das radioaktive ^3H -Thymidin in die Zellen ein.

- Danach Zellen mittels „Erntegerät“ (Zell-Harvester) auf Filterpapier absaugen und mindestens zwei Stunden trocknen lassen.
- Filterpapierplättchen nach der Trockenzeit in vorgesehene Röhren geben, mit Szintillationsflüssigkeit auffüllen und in den β -Counter (Abbildung 7) legen, um die Radioaktivität zu messen.



Die Radioaktivität wird mittels Beta-Counter im Filterpapier in „counts per minute“ (cpm), Zählungen pro Minute gemessen.

Abbildung 7: β -Counter

Um die relative Proliferation, also die Steigerung der Zellzahl nach Stimulation zu beurteilen, wird ein Stimulationsindex verwendet. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten des Mittelwertes der cpm der stimulierten Probe und der cpm der unstimulierten Probe.

4.4 Zytokine

Die Zytokinkonzentrationen wurden in den Zellkulturüberständen des Nabelschnurblutes gemessen. Zur Zytokinmessung wurde das humane Multiplex-Assay-Kit von Biorad verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich die Konzentrationen mehrerer Zytokine im LUMINEX-Gerät parallel in einer Probe zu messen. Somit ist weniger Probenmaterial, sowie ein geringerer Zeitaufwand nötig.

Für jede Messung einer Platte (96 wells) wurde eine Standardreihe aller Zytokine in Duplikaten pipettiert.

Die Sensitivität für die Messung der jeweiligen Zytokine war durch ihre unteren Detektionsgrenzen vorgegeben.

Aus organisatorischen Gründen wurde die Messung in zwei Teilen vorgenommen. Nach der Messung des zweiten Probenanteils wurden deutliche Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen (bis in den Bereich mehrerer Zehnerpotenzen) zwischen den beiden Messgruppen festgestellt. Es stellte sich heraus, dass der gelieferte Standard der ersten Messgruppe fehlerhaft war. Daraufhin folgte eine erneute Messung dieser Proben mit neuem Standard.

4.4.1 Hintergrund/Prinzip

Es werden mit Fluoreszenz gefärbte Partikel verwendet, an welche Biomoleküle gebunden werden. Diese farbig kodierten Partikel stellen die feste Phase der Reaktion, daher können mehrere Partikel zeitgleich in demselben Versuch verwendet werden. Das heißt, es ist möglich mehrere Zytokine gleichzeitig in derselben Probe zu messen.

Jedes Partikel kann mit einem spezifischen Reaktionspartner konjugiert werden. Jeder Reaktionspartner ist für ein anderes Zielmolekül spezifisch.

Ein Durchflusszytometer mit zwei Lasern und die damit verbundene Optik messen biochemische Reaktionen, die auf der Oberfläche der Partikel ablaufen.

Die Bio-Plex Zytokin-Assays sind in einem „capture sandwich immunoassay“ Format kreiert.



Abbildung 8: Zytokinantikörper (schwarzes Y) an Partikel gebunden

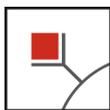


Abbildung 9: Zytokin (rot) im Zellkulturüberstand der Nabelschnurblutprobe

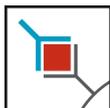
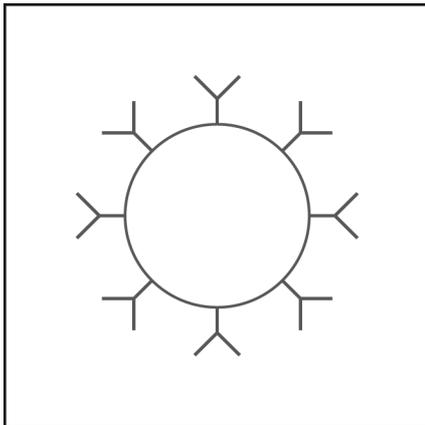
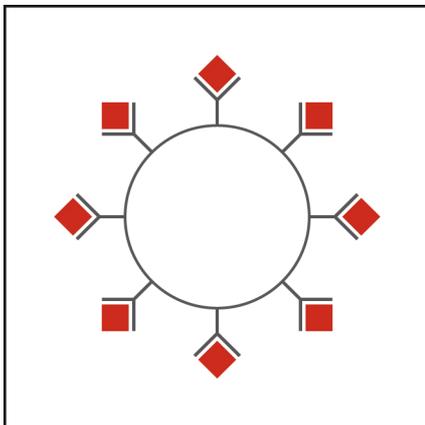


Abbildung 10: Biotinylierter Antikörper (blaues Y)



Antikörper, die spezifisch gegen Zytokine (des Interesses) gerichtet sind, werden kovalent an farbkodierte 5,6µm Polystyren-Partikel gebunden.

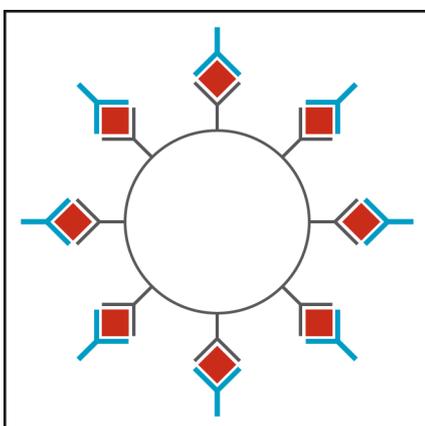
Abbildung 11: Antikörper kovalent an Partikel gebunden



Die mit dem Antikörper gekoppelten Partikel können mit einer Probe, dessen Zytokinmenge unbekannt ist oder mit einer Standardlösung, deren Menge bekannt ist, reagieren.

Abbildung 12: Antikörper reagieren mit Zytokinen der Probe

Einige Waschstschritte werden durchgeführt, um ungebundene Proteine zu entfernen. Danach wird den Partikeln ein biotinylierter Antikörper zugefügt. Dieser ist für ein anderes Epitop auf dem Zytokin spezifisch.



Das Ergebnis ist ein Sandwich aus Antikörpern um das Zytokin herum.

Abbildung 13: Sandwich aus Antikörpern um das Zytokin herum

Die Reaktionsmischung wird durch die Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) erkannt. Es bindet an die biotinylierten Erkennungs-Antikörper. Die Bestandteile jeder Vertiefung werden in das flussbasierte Luminex-Gerät hochgesaugt. Dieses identifiziert und quantifiziert jede auf Partikelfarbe und -Fluoreszenz basierende spezifische Reaktion.

Die Stärke dieser Reaktion wird gemessen, indem fluoreszierend markierte Reportermoleküle verwendet werden. Diese sind mit jedem Zielprotein verbunden. Unbekannte Zytokinkonzentrationen werden automatisch von der Bio-Plex Manager Software ermittelt. Hierbei verwendet das System eine Standardkurve aus einem rekombinanten Zytokinstandard.

[73] (Abbildungen modifiziert nach Biorad)

4.4.2 Optimierungsexperimente

Eine Messung der sensiblen Zytokine ist nur bei optimalen Bedingungen möglich. Um diese gewährleisten zu können, wurden bereits vor der ersten Probenmessung zahlreiche Experimente durchgeführt. Hierfür wurden Zellkulturüberstände aus Nabelschnurblutproben von Neugeborenen, die aus der Studie ausgeschlossen waren sowie aus Blutproben von Mitarbeitern aus dem Forschungszentrum Kubus des Haunerschen Kinderspitals verwendet.



Einstellung am Luminexgerät

Um die optimale Eintauchtiefe der Messnadel zu gewährleisten, wurde diese in ihrer Anbringshöhe nach Vorschrift justiert. Es musste eine Anpassung an die verwendeten Filterplatten erfolgen, um diese während des Messvorganges nicht mit der Nadelspitze zu beschädigen, somit ein Auslaufen der Probenflüssigkeit/Waschpufferflüssigkeit zu verhindern und eine gleichmäßige Aufnahme der Proben in das Gerät zu ermöglichen.

Abbildung 14: Messnadel des Luminexgerätes

Durchführung des Protokolls

Eine Herausforderung stellte die Suche nach einer gleichmäßigen Absaugmöglichkeit für die verwendeten Filterplatten dar. Nur ein gleichmäßiges Absaugen der Filterplatten, bei dem die Filter am Boden der Platte genügend, aber nicht zu viel Feuchtigkeit behalten, führt zu konstanten Zytokinmessungen ohne Fehlermeldungen. Auch hier musste eine Beschädigung des Filterplattenbodens durch zu starkes Absaugen vermieden werden.

Erfolgreiche Vorexperimente zur Überprüfung der Reliabilität des Kit wurden mit Hilfe von zwei mitogenstimulierten Proben durchgeführt: Eine Probe aus Erwachsenenblut und eine Nabelschnurblutprobe (Daten nicht gezeigt).

Durchführung der Messung

Laut Hersteller kann die Messung einer fertig pipettierten Platte nach bis zu 24 Stunden erfolgen. Dies konnte durch wiederholte Messungen der Optimierungsplatten bestätigt werden. Trotzdem wurden, um einer Entkopplung der Antikörper und somit einer möglichen Abschwächung der ZytokinKonzentrationen (und des Standards) über Nacht vorzubeugen, alle Proben am Tag der Protokolldurchführung gemessen.

Aufgrund von kleinen Probenmengen und aus Kostengründen waren für einen Großteil der Proben nur Einzelbestimmungen möglich. Diese Einzelmessungen wurden jedoch erst durchgeführt, als nach Versuchsoptimierung die Messung in Duplikaten vergleichbare Werte zeigten (Daten nicht gezeigt).

Vom Hersteller werden 8 Standards für die Durchführung der Messung empfohlen. Für die PAULINA-Studie wurde eine Standardreihe mit 10 Verdünnungen verwendet, um einen noch genaueren Verlauf der Konzentrationskurve zu ermöglichen. Der Leerwert (Humanserum 10%) wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet.

4.4.3 Durchführung des Assays

Die Bestimmung der Zytokinausschüttung der CBMCs vor und nach Stimulation des prozessierten Nabelschnurblutes wird mittels des Luminex-Gerätes durchgeführt.

Dazu verwendet wird, wie bereits unter **2.2** erwähnt, der jeweilige Zellkultur-Überstand des Stimulus-Zell-Niederschlag-Humanserumgemisches und der Multiplex Zytokin-Assay der Firma Biorad (siehe Anhang).

Der Human-Cytokine-Multiplex-Assay wird gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt (Bio-Rad, München, Deutschland).

Herstellung der Standardlösungen

- Zytokinstandard in 500 µl Humanserum auflösen und kurz vortexen.
- Für 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- Während dessen die Standardlösung in acht 1,5 ml Eppendorf Röhrchen vorlegen.
- Das erste Gefäß mit 72 µl, die übrigen 7 mit je 150 µl bestücken.
- Nach der Inkubation 128 µl des Zytokinstandards in das erste Gefäß überführen und mit Humanserum vermischen.
- Anschließend 50 µl aus diesem Gefäß in das zweite überführen und gut mischen.
- Den Vorgang bis zum 10. Gefäß wiederholen, so dass Standards 1 bis 10 mit absteigender Konzentration entstehen.

Standards bis zur Verwendung auf Eis stellen und vor Licht schützen.

Vorbereitung der Filterplatten

- Jede Vertiefung der Filterplatte (96 Vertiefungen von unten durch Filterpapier begrenzt) mit 100 µl des Assay Puffers füllen.
- Anschließend den Puffer durch ein unterhalb der Platte angelegtes Vakuum (1-2mmHg) wieder entfernen.

Dies geschieht mittels einer Vakuumpumpe (siehe Abbildung 15), auf dessen Wanne die Filterplatte aufgesetzt wird.



Abbildung 15: Vakuumpumpe (Wanne)

- Den Boden der Platte mit einem Papiertuch trocknen.
- Vortexen der Multiplex-Partikel-Arbeitslösung für 15-20 Sekunden.
- 50 μ l der Lösung in jede der Vertiefungen pipettieren.
- Anschließend wieder absaugen.
- Je 100 μ l des Bio-Plex Waschpuffers mit der 8-Kanal-Pipette aus einem Trog in die Vertiefungen der Filterplatte pipettieren.
- Mit Vakuumpumpe absaugen.

Diesen Waschschrift wiederholen und Boden der Platte erneut mit einem Papiertuch trocknen.

Zugabe der Standards sowie der Proben und anschließende Inkubation

- Je 50 μ l der Standards und Proben nach leichtem Schütteln in die zugehörigen Vertiefungen pipettieren.
- Anschließend Filterplatte mit Klebealufolie abkleben, in Alufolie hüllen und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikroplattenrüttler inkubieren. In den ersten 30 Sekunden bei 1100 rpm, dann 60 Minuten bei 300 rpm. (Inkubation)
- Nach der Inkubation Inhalt der Vertiefungen per Vakuumpumpe entfernen.
- Platte 3 Mal mit 100 μ l des Bio-Plex Waschpuffers waschen. Nach jedem Waschschrift den Puffer per Vakuumpumpe (mit 1 bis 2 mmHg) entfernen. Boden der Platte erneut mit einem Papiertuch trocknen. (Waschen)

Zugabe der Erkennungs-Antikörper und Inkubation

- Bio-Plex detection Antikörper Arbeitslösung leicht vortexen und 25 µl in jede Vertiefung geben.
- Anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikroplattenrüttler inkubieren.
- Nach Inkubation den Inhalt der Vertiefungen wieder per Vakuumpumpe entfernen.
- Waschen.

Streptavidinzugabe

- Streptavidin-PE mit Assay Puffer in einem Verhältnis von 1:100 verdünnen und 50 µl in jede Vertiefung geben.
- Anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikroplattenrüttler inkubieren.
- Nach Inkubation den Inhalt der Vertiefungen wieder per Vakuumpumpe entfernen.
- Waschen.
- Partikel in jeder Vertiefung mit 125 µl des Bio-Plex Assay Puffers resuspendieren.
- Anschließend die Platte mit Klebealufolie abkleben, in Alufolie hüllen und die Platte vor Beginn der Testung im Luminex-Gerät bei Raumtemperatur für 30 Sekunden bei 1100 rpm auf einem Mikroplattenrüttler stellen.
- Klebefolie vor dem Einbringen der Platte in das Luminex-Gerät entfernen.

Vor der Messung (mittels Luminex Software)

- Gerät kalibrieren.
- „Low setting“ verwenden, um eine große Konzentrationsspanne der Standardkurve zu gewährleisten.
- Zu messenden Zytokine und ihre Partikel-Regionen sowie das Pipettierschema der jeweiligen Platte in das Programm eingeben.
- Starten der Messung.

Zytokinkonzentrationen unterhalb der geringsten Konzentration des entsprechenden Standards wurden als Wert von 0,01pg/ml festgesetzt, um sie in die Datenanalyse einschließen zu können.

Die Konzentrationen von Interleukin-6 und -13 lagen teilweise außerhalb der oberen Grenze des Messbereichs und wurden als Wert von 180000 pg/ml bzw. 5100 pg/ml festgesetzt, um sie in die Datenanalyse einschließen zu können.

| Zytokine | pg/ml |
|--------------------------------|-------|
| Interleukin-2 | 1,1 |
| Interleukin-4 | 0,5 |
| Interleukin-5 | 0,8 |
| Interleukin-6 | 1,1 |
| Interleukin-10 | 0,9 |
| Interleukin-12 | 0,5 |
| Interleukin-13 | 2,1 |
| Interferon- γ | 19,3 |
| Tumor Nekrose Faktor- α | 3,0 |
| GM-CSF | 4,5 |

Die Sensitivität des Tests war durch die unteren Detektionsgrenzen vorgegeben (siehe Tabelle 15 [74]).

Tabelle 14: Untere Detektionsgrenzen der gemessenen Zytokine in pg/ml

4.5 CD-Oberflächenantigene/ T-Helferzellsubtypen

4.5.1 Herstellung der Lösungen

In Vorstudien wurde eine Optimierung der Konzentrationen der verwendeten Antikörper und ihrer Negativkontrollen vorgenommen (Daten nicht gezeigt).

- Das Nabelschnurblut wie oben angegeben bis **4.2 Nabelschnurblut** einschließlich **Zählung der Zellen** aufbereiten.
- Zusätzlich zu der Platte für Zytokine eine Platte für die anschließende Durchflusszytometrie vorbereiten.
- In eine der sechs Vertiefungen 1-2 ml des Humanserum-Zell-Gemisches und 5 μ l PHA pipettieren und mischen.

- In eine zweite Vertiefung 1-2 ml des Humanserum-Zell-Gemisches und 5 μ l LpA pipettieren und mischen.
- Anschließend für zirka 72 Stunden inkubieren.

Unstimulierte Zellen

- Für die unstimulierten Zellen Humanserum-Zell-Gemisches anschließend ohne Inkubation weiter verarbeiten.
- Mit RPMI auf 10^7 Zellen pro Milliliter einstellen.
- Weiter ab: Hinzufügen der Antikörper und Negativkontrollen.

Zellen nach Mitogen- und Endotoxin-Stimulation

- Nach der 72 stündigen Inkubation mit Hilfe eines Schabers die Zellen in den betreffenden Vertiefungen (PHA und LpA) vom Boden ablösen und Humanserum-Zell-Gemisch in 2 beschriftete (PHA und LpA) konische 15 ml Röhren füllen.
- Bei 1100 rcf, Bremse 9 und 20°C für 10 Minuten zentrifugieren.
- Überstand mit Pipette abnehmen, in je 2 mit PHA und LpA markierte 1,5 ml Röhren (für die spätere Zytokinmessung) verteilen und bei minus 80°C einfrieren.

Zählen der Zellen

- Zellniederschlag in 5 ml RPMI aufnehmen und mischen.
- 50 μ l entnehmen und in ein kleines konisches Gefäß (Sarstedt 0,2ml) überführen.
- 50 μ l Lyse Puffer hinzufügen und Gefäß anschließend für 7,5 Minuten auf Eis stellen.
- Danach 50 μ l Trypanblaulösung beifügen.
- 10 μ l des Gemisches auf die Zählkammer auftragen und Zellen unter dem Mikroskop zählen (siehe oben).
- Währenddessen das Zell-RPMI-Gemisch bei 1100rcf für 10 Minuten bei 20°C, Bremse 9 zentrifugieren.

- Anschließend Einstellen der Zellen auf 100 Millionen Zellen pro Milliliter mit RPMI.
- Zum Beispiel: bei $50 \cdot 10^6$ gezählten Zellen 500 μl RPMI hinzufügen, um eine Konzentration von 10^7 Zellen pro Milliliter zu erhalten.

Hinzufügen der Antikörper und Negativkontrollen

- Pipettieren des folgenden Schemas in Eppendorf-Röhrchen jeweils für PHA und LpA und unstimuliert (siehe Tabelle).

| Farbstoffe | Waschpuffer (μl) | Zellen (μl) | Antikörper bzw. Isotypenkontrollen (μl) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--|
| Ungefärbt | 75 | 25 | . |
| CD4 einfach | 73 | 25 | 2 CD4 FITC |
| CD19 einfach | 73 | 25 | 2 CD19 PE |
| CD8 einfach | 74 | 25 | 1 CD8 PC5 |
| CD25 einfach | 74 | 25 | 1 CD25 PC5 |
| FITC | 74 | 25 | 1 IgG1 FITC |
| PE | 74 | 25 | 1 IgG2a PE |
| PC5 | 74 | 25 | 1 IgG1 PC5 |
| PC5 | 73,5 | 25 | 0,5 IgG2a PC5 |
| CD4 + CD25 | 44 | 50 | 4 CD4 FITC + 2 CD25 PC5 |

Tabelle 15: Pipettierschema für die Durchführung der Durchflusszytometrie (FACS)

- Anschließend abdecken und für 30 Minuten im Kühlschrank (4°C) inkubieren.
- PFA (Paraformaldehyd) für FACS in Warmwasserbad auftauen.
- Nach Inkubation die Eppendorf-Röhrchen bei 1400 rcf und 4°C für 5 Minuten zentrifugieren.
- Überstand mit Wasserstrahlpumpe abnehmen.
- Niederschlag in jedem Röhrchen mit 200 μl Waschpuffer mischen und erneut zentrifugieren.
- Anschließend Niederschlag in jedem Röhrchen mit 400 μl Waschpuffer resuspendieren und in bereits beschriftete FACS-Röhrchen überführen.

- 400 µl des aufgetauten PFA zufügen.

Bis zur Messung am FACScan bei 4°C dunkel (in Alufolie gehüllt) aufbewahren.

4.5.2 Durchflusszytometrische Messung

Verwendet wurde ein 3-Farben-Durchflusszytometer FACScan von Becton-Dickinson, Deutschland.

Für die Erfassung der Teilmenge der $CD4^+CD25^{++}$ ($CD4^+CD25^{hoch}$) Zellen wurde ein „Gate“ bei der Auswertung der $CD4^+CD25^+$ Zellen gesetzt. Das Setzen des „Gates“ (siehe Abb.) erfolgte visuell.

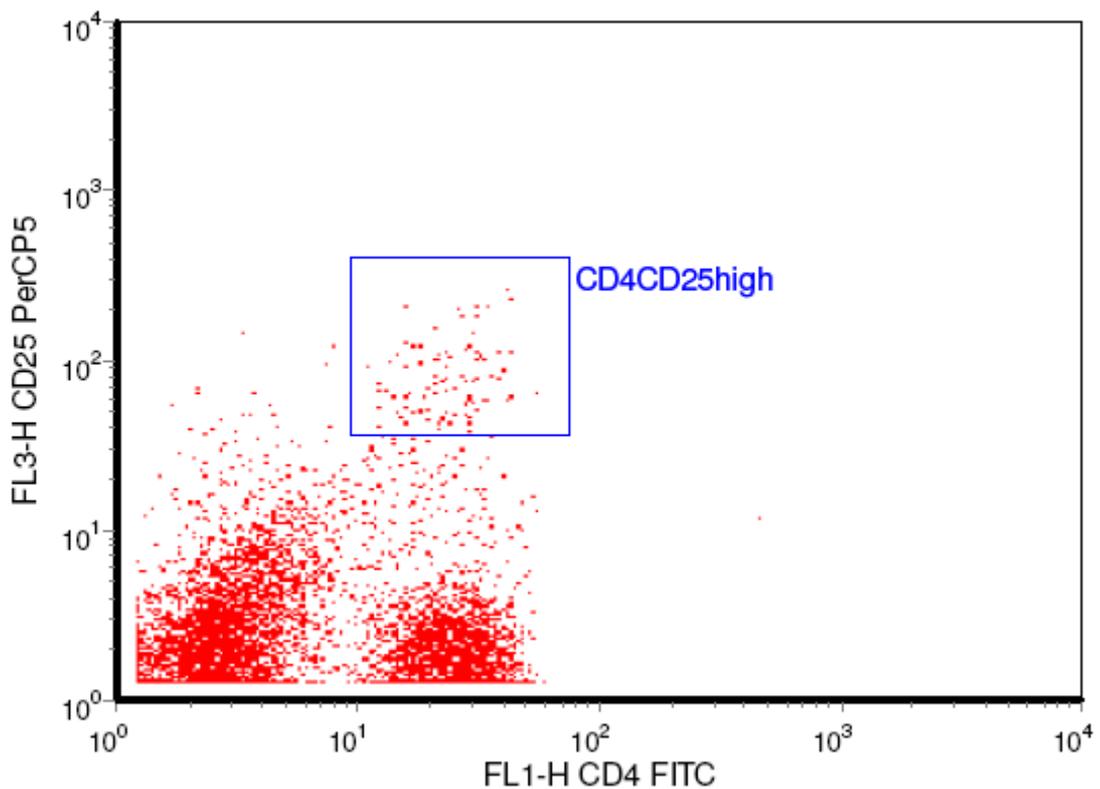


Abbildung 16: Setzen des „Gates“ für $CD4^+CD25^{hoch}$ -Zellen bei der Durchflusszytometrie

5. Statistische Methoden

Die Analyse der Durchflusszytometriedaten erfolgte mit Hilfe der Cell-Quest Software. Die anschließende Analyse der Ergebnisse wurde mit der WinMDI 2.8 Software durchgeführt.

Zur Auswertung sämtlicher Daten wurden Excel für Windows 2003, SPSS 12.0 sowie SAS 9.1 und SigmaStat 3.5 verwendet.

Statistische Tests

Lineare, logistische Regressionsanalysen wurden durchgeführt und berücksichtigten die potenziellen Störfaktoren (Confounders) Körpergröße, Geburtsgewicht und Kopfumfang der Neugeborenen und väterliche Atopie (Daten nicht gezeigt).

Die deskriptiven Daten wurden bezüglich ihrer Häufigkeit (Anzahl und Prozent) und entsprechend ihrer Verteilung mittels Median und Interquartilbereich (IQR) oder Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Bei nicht normalverteilten Messergebnissen konnte keine normalisierende Transformation durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne vorhandene maternale Atopie wurden mittels nicht parametrischem Test (Mann-Whitney-U-Test oder Wilcoxon-Test) auf Signifikanz getestet.

Bei normalverteilten Daten wurde der parametrische T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert kleiner gleich 0,05 wurde als signifikant gewertet.

4. ERGEBNISSE

1. Epidemiologische Charakteristika

1.1 Deskription der PAULINA Studienpopulation

1.1.1 Mütter

Die Neugeborenen und ihre Mütter wurden entsprechend der Hauptvariable „mütterliche Atopie“ in zwei Gruppen eingeteilt. Mütter, die positiv bezüglich der Arzt diagnose eines allergischen Asthma bronchiale und/oder eines atopischen Ekzem und/oder einer allergischen Rhinokonjunktivitis, also als atopisch eingestuft wurden, bildeten die Gruppe der atopischen Mütter. Alle anderen Mütter wurden der Gruppe der nicht atopischen Mütter zugeteilt. Die atopischen Mütter zeigten signifikant höhere Gesamt-IgE-Werte und 85% von Ihnen zeigten einen positiven RAST Test (siehe Anhang). Das spezifische IgE der nicht atopischen Mütter war vergleichbar mit dem anderer bereits erfolgten epidemiologischen Studien [71], [72].

| Mutter | Gesamt | Keine Atopie | Atopie | p-Wert |
|----------------------------------|-------------|--------------|---------------|--------|
| N (%) | 118 (100,0) | 70 (59,3) | 48 (40,7) | |
| Alter Mutter * | 33 (31; 36) | 33 (31; 36) | 32,5 (31; 36) | 0,81 |
| Herkunft Mutter | 114 (96,6) | 68 (97,1) | 46 (95,8) | 0,69 |
| – europäisch | | | | |
| – nicht europäisch | 4 (3,4) | 2 (2,9) | 2 (4,2) | |
| Ausbildung Mutter | | | | 0,90 |
| – Hauptschule | 6 (5,1) | 3 (4,3) | 3 (6,2) | |
| – Realschule | 17 (14,4) | 10 (14,3) | 7 (14,6) | |
| – Gymnasium/ Fachoberschule | 15 (12,7) | 10 (14,3) | 5 (10,4) | |
| – Universität/ Fachhochschule | 80 (67,8) | 47 (67,1) | 33 (68,8) | |
| Rauchen Mutter | . | . | . | |
| – Nichtraucherin | 103 (87,3) | 59 (84,3) | 44 (91,7) | 0,24 |
| – während SS geraucht | 7 (5,9) | 4 (5,7) | 3 (6,3) | 0,79 |
| – aufgehört als SS bekannt | 8 (6,8) | 7 (10,0) | 1 (2,1) | |
| Anzahl der Zigaretten ** | | 0 (0/20) | 0 (0/10) | |

Tabelle 16: Daten der Mütter (* Median und Interquartilbereich; ** Median und Minimum/Maximum); SS (Schwangerschaft)

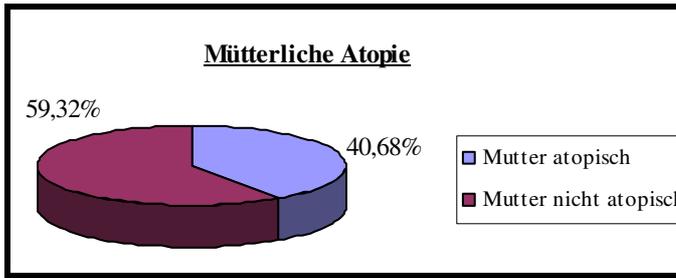


Abbildung 17: Maternale Atopieprävalenz der Paulinapopulation in %.

| Mutter | Gesamt | Keine Atopie | Atopie | p-Wert |
|----------------------------|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| N (%) | 118 (100,0) | 70 (59,3) | 48 (40,7) | |
| Kinder | . | . | . | 0,35 |
| 0 | 71 (60,2) | 44 (62,9) | 27 (56,3) | |
| 1 | 38 (32,2) | 23 (32,9) | 15 (31,3) | |
| 2 | 8 (6,8) | 3 (4,3) | 5 (10,4) | |
| 3 | 1 (0,9) | 0 (0) | 1 (2,1) | |
| Fehlgeburt | . | . | . | 0,52 |
| – Keine | 92 (78,0) | 56 (80,0) | 36 (75,0) | |
| – Eine | 25 (21,2) | 13 (18,6) | 12 (25,0) | |
| – Mehr als eine | 1 (0,8) | 1 (1,4) | 0 (0) | |
| Gesamt IgE Mutter * | 32,6 (14,6; 74,4) | 21,18 | 60,54 | <0,0001 |
| Spezif. IgE Mutter | | | | |
| > 0,7 IU/ml (%) | | 43,5 | 85,4 | <0,001 |

Tabelle 17: Daten der Mütter (*Median)

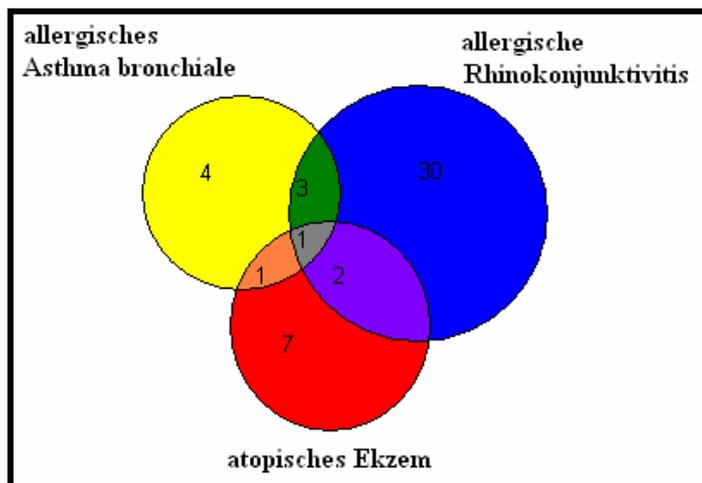


Abbildung 18: Anzahl der Mütter in Atopie-Untergruppen.

| Mutter | Nichtraucher | Rauchen während SS | Nichtraucher seit SS | Gesamt |
|--------------------|--------------|--------------------|----------------------|--------|
| Keine Atopie N (%) | 59 (84,29%) | 4 (5,71%) | 7 (10,00%) | 70 |
| Atopie N (%) | 44 (91,70%) | 3 (6,25%) | 1 (2,10%) | 48 |

Tabelle 18: Kreuztabelle Rauchen der Mutter; SS (Schwangerschaft)

Das Durchschnittsalter der rekrutierten Mütter lag bei 33 Jahren. Dies ist höher als das Durchschnittsalter werdender Mütter in Deutschland, das laut Statistischem Bundesamt Deutschland im Jahre 2007 bei 30,2 Jahren lag [75]. Ein anderer Faktor der nicht für die Gesamtbevölkerung repräsentativ war, war die Ausbildung der Mütter. 80,51% der Frauen hatten Abitur bzw. Fachabitur oder waren Universitäts- bzw. Fachhochschulabsolventen. Nahezu alle Mütter waren europäischer Herkunft.

60,2% der teilnehmenden Mütter waren Erstgebärende und 22% der Frauen hatten bereits mindestens eine Fehlgeburt erlittenen.

1.1.2 Neugeborene

| Mutter N (%) | Gesamt | keine Atopie | Atopie | p-Wert |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| | 118 (100,00) | 70 (59,32) | 48 (40,68) | |
| Geschlecht – männlich | 62 (52,5) | 34 (48,6) | 28 (58,3) | 0,30 |
| – weiblich | 56 (47,5) | 36 (51,4) | 20 (41,7) | |
| Geburtsgewicht (g) * | 3530 (3210; 3800) | 3450 (3150; 3700) | 3695 (3485; 3937) | 0,008 |
| Körpergröße (cm) * | 52 (51; 53) | 52 (50; 53) | 53 (51; 54) | 0,02 |
| Kopfumfang (cm) * | 35 (34;36) | 35 (35; 36) | 35,4 (35; 36,75) | 0,02 |
| Gestationsalter * | 40 (39,1; 40,7) | 40 (39,1; 40,7) | 39,9 (38,9; 40,9) | 0,99 |
| Apgar 5 Min >8 | 118 (100,0) | 70 (100,0) | 48 (100,0) | 1,0 |
| Nabelschnurblut-pH | 7,31 (7,26; 7,38) | 7,3 | 7,34 | 0,34 |

Tabelle 19: Daten der Neugeborenen; g (Gramm); cm (Zentimeter); min (Minuten);

*Median und Interquartilbereich

Neugeborene von Müttern mit Atopie waren signifikant schwerer, größer und hatten einen signifikant größeren Kopfumfang (**p= 0,008/0,02/0,02**) als Neugeborene nicht atopischer Mütter (siehe Abb.15, 16 und 17).

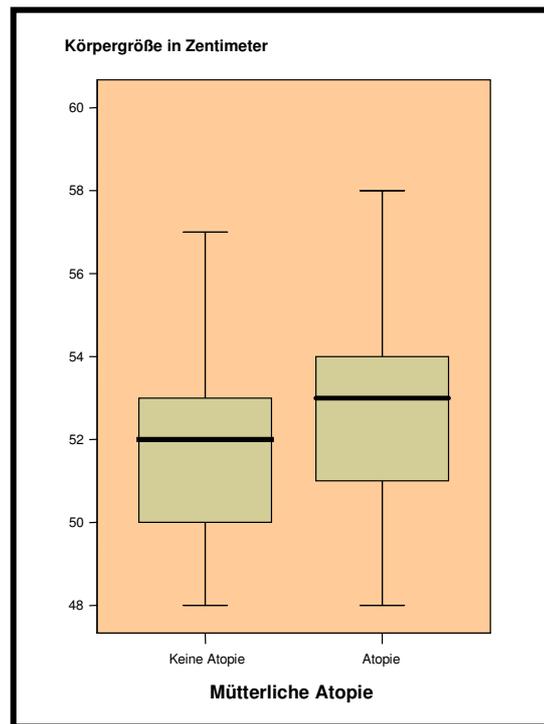
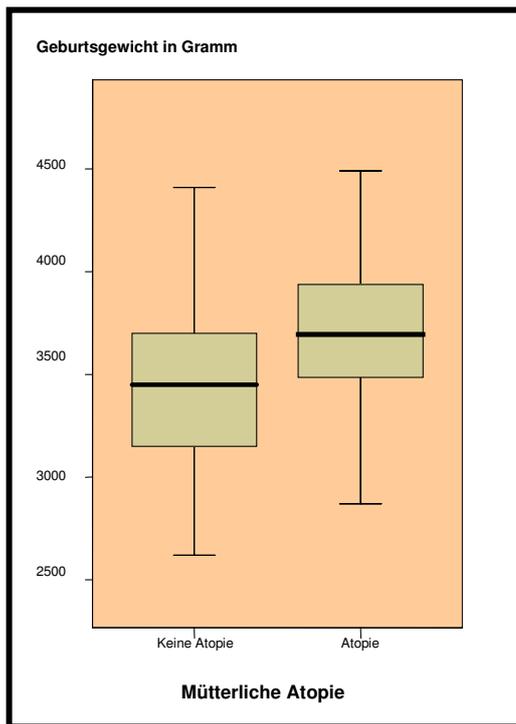


Abbildung 19 und 20: Geburtsgewicht und Körperlänge² in den Gruppen mit und ohne mütterliche Atopie (0 nicht atopisch; 1 atopisch)

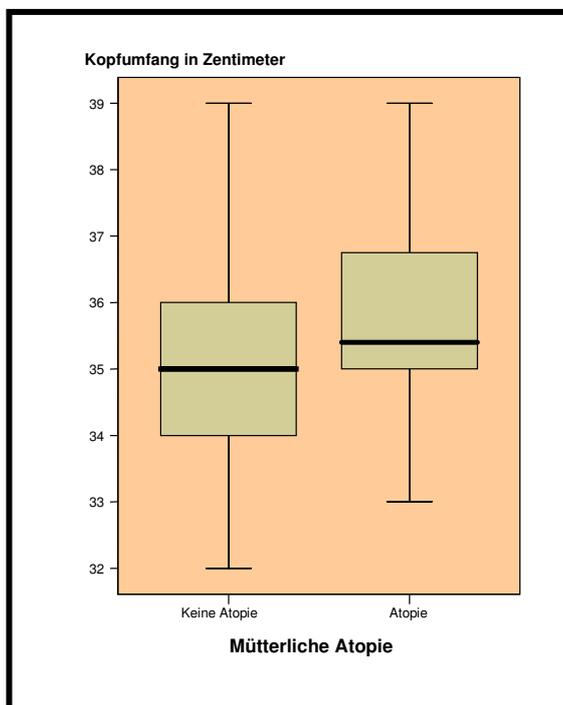


Abbildung 21: Kopfumfang in den Gruppen mit und ohne mütterliche Atopie (0 nicht atopisch; 1 atopisch)

Alle in die Studie eingeschlossenen Neugeborenen zeigten nach der Geburt einen 5-Minuten Apgar-Wert (siehe Anhang) von mindestens 9.

² Abbildungen jeweils ohne Ausreißer

1.1.3 Epidemiologische Daten zur Geburt

| Mutter N (%) | Gesamt | Keine Atopie | Atopie | p-Wert |
|--|----------------|-----------------|---------------|--------|
| | 118 (100,00) | 70 (59,32) | 48 (40,68) | |
| PDA | 72 (61,0) | 43 (61,4) | 29 (60,4) | 0,912 |
| Entbindungsmodus | | | | |
| - vaginal | 108 (91,5) | 64 (91,4) | 44 (91,7) | 0,91 |
| - sectio | 10 (8,5) | 6 (8,6) | 4 (8,3) | |
| Entbindungsmodus Untergruppen | | | | |
| Sectio/Kaiserschnitt | 10 (8,5) | 6 (8,6) | 4 (8,3) | 0,96 |
| Vakuumentextraktion | 19 (16,1) | 13 (18,6) | 6 (12,5) | 0,38 |
| Zangengeburt | 1 (0,9) | 0 (0) | 1 (2,1) | 0,23 |
| Ohne weitere Angabe | 88 (74,6) | 51 (72,9) | 37 (77,1) | 0,61 |
| Geburtsdauer (h) * | 7 (4,0; 10,0) | 6 (4,0; 10,0) | 8 (4,5; 10,5) | 0,42 |
| Blasensprung (h) * | 3,5 (1,0-10,0) | 3,5 (1,0; 12,0) | 3,5 (1,0-7,0) | 0,74 |

Tabelle 20: Geburtsparameter; h (Stunden); * Median; PDA (Periduralanästhesie)

1.1.4 Väter

Die Väter waren zu 97,2% europäischer Herkunft.

| Vater; N (%) | Gesamt | Keine Atopie | Atopie |
|--------------------|---------------|--------------|--------------|
| | 118 (100,00%) | 80 (67,80%) | 38 (32,20%) |
| Herkunft | | | |
| - europäisch | 115 (97,46%) | 77 (96,25%) | 38 (100,00%) |
| - nicht-europäisch | 3 (2,54%) | 3 (3,75%) | 0 (0,00%) |

Tabelle 21: Daten der Väter.

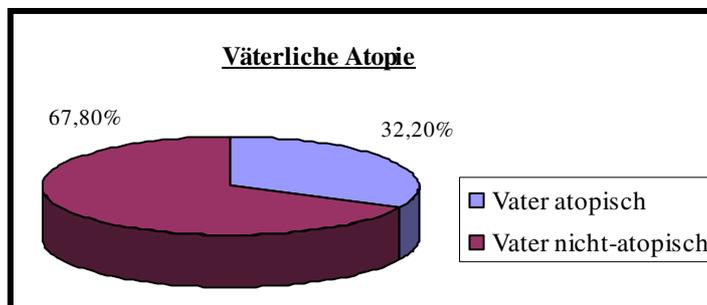


Abbildung 22: Atopieanamnese der Väter in Prozent (NA nicht atopisch; A atopisch)

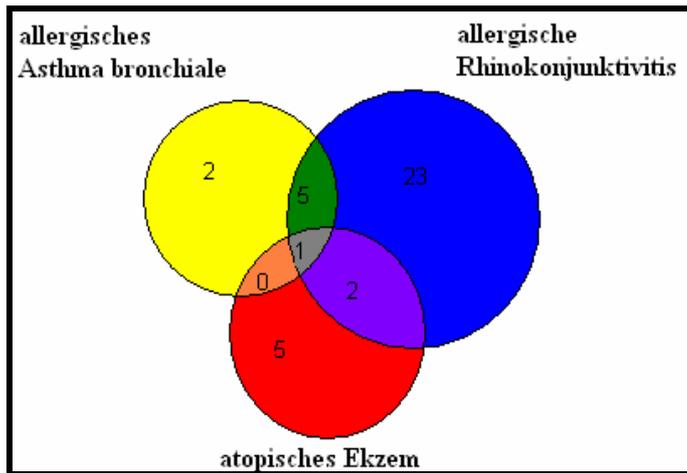


Abbildung 23: Väter Atopie-Untergruppen n

Bei vorhandener Atopie der Mütter war ein größerer Anteil der Väter atopisch (43,75%) als bei gesunden Müttern (24,29%). Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,027$).

| | Vater Atopie * |
|---------------------------|----------------|
| Mutter keine Atopie N (%) | 17 (24,29) |
| Mutter Atopie N (%) | 21 (43,75) |
| Gesamt N (%) | 38 (32,20) |

Tabelle 22: Kreuztabelle Vater Atopie – Mutter Atopie; *($p=0,027$).

2. Charakteristika des Immunsystems (Nabelschnurblut)

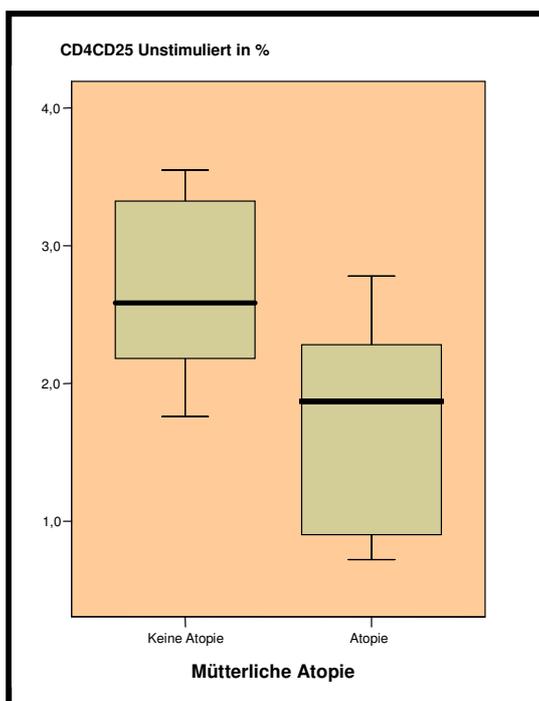
Es wurden die deskriptive Statistik der Ergebnisse sowie eine Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorhandene maternale Atopie und nicht vorhandene maternale Atopie durchgeführt. Bei den Zellen des Immunsystems wurde der t-Test verwendet, bei den Zytokinen der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test oder der Wilcoxon-Test verwendet.

2.1. Aktivierte T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Interleukin-10

Aktivierte T-Zellen (CD4⁺CD25⁺)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|--|----|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|-------------|
| | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | |
| CD4⁺CD25⁺ (%) | | | | | | | |
| Unstimuliert | | 2,28 | | 2,68 | | 1,74 | 0,03 |
| | 14 | (± 0,23) | 8 | (± 0,24) | 6 | (± 0,32) | |
| PHA | | 31,46 | | 26,81 | | 37,28 | 0,29 |
| | 9 | (± 4,59) | 5 | (± 5,46) | 4 | (± 7,51) | |
| LpA | | 1,80 | | 1,84 | | 1,75 | 0,89 |
| | 13 | (± 0,29) | 7 | (± 0,32) | 6 | (± 0,55) | |

Tabelle 23: CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (%); SEM (Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes)



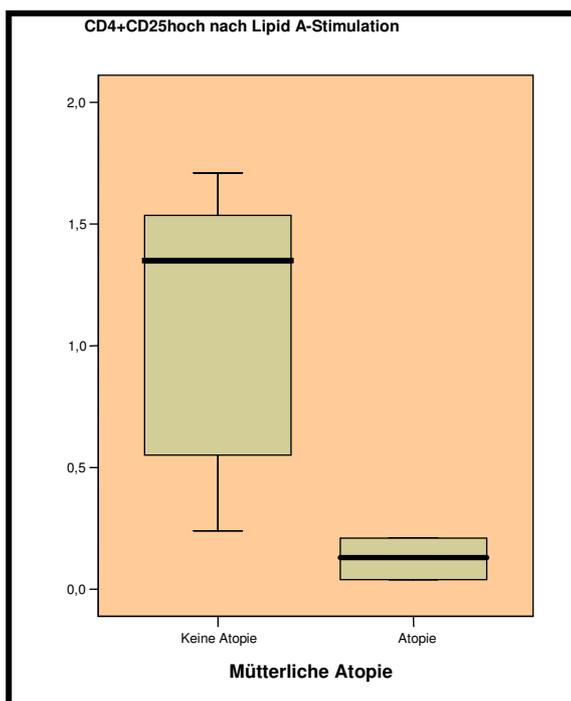
CD4⁺CD25⁺ Zellen entsprechen den aktivierten T-Zellen. Diese waren im unstimulierten Nabelschnurblut bei Neugeborenen atopischer Mütter signifikant niedriger als bei Neugeborenen nicht atopischer Mütter (**p=0,03**) (siehe Abb.19).

Abbildung 24: CD4⁺CD25⁺(%) (0= Mutter keine Atopie; 1= Mutter Atopie)

Regulatorische T-Zellen ($CD4^+CD25^{++}/CD4^+CD25^{\text{hoch}}$)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---|----|------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------|--------------|
| | | Mittelwert (\pm SEM) | | Mittelwert (\pm SEM) | | Mittelwert (\pm SEM) | |
| CD4⁺CD25⁺⁺ (%) | | | | | | | |
| Unstimuliert | 14 | 0,72 (\pm 0,18) | 8 | 0,86 (\pm 0,30) | 6 | 0,51 (\pm 0,14) | 0,36 |
| PHA | 11 | 15,79 (\pm 2,61) | 5 | 13,30 (\pm 3,43) | 6 | 17,87 (\pm 3,90) | 0,41 |
| LpA | 13 | 0,66 (\pm 0,18) | 7 | 1,35 (\pm 0,55) | 6 | 0,13 (\pm 0,21) | 0,005 |

Tabelle 24: $CD4^+CD25^{++}$ T-Zellen (%); SEM (Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes)



Die regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^{++}$) waren nach Endotoxinstimulation in der Gruppe der atopischen Mütter signifikant reduziert ($p=0,005$) (Siehe Abb.20).

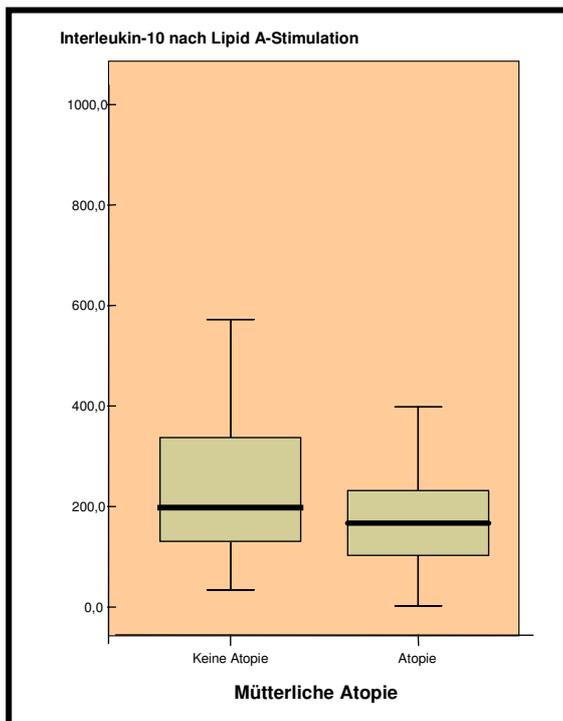
Abbildung 25: $CD4^+CD25^{++}$ Expression³ nach Endotoxinstimulation; n=13; (0= Mutter keine Atopie; 1= Mutter Atopie)

³ Abbildung ohne Ausreißer

Interleukin-10

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|-----|-----------------------------------|----|-----------------------------------|----|-----------------------------------|-------------|
| IL-10 | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| Unstimuliert | 117 | 0,15 (0,1; 0,23) | 69 | 0,16 (0,12; 0,24) | 48 | 0,15 (0,10; 0,21) | 0,18 |
| PHA | 107 | 131,39 (56,8; 234,84) | 65 | 145,06 (69,30; 234,86) | 42 | 103,14 (55,35; 215,85) | 0,27 |
| LpA | 115 | 190,59 (114,73; 290,44) | 68 | 197,88 (130,58; 337,15) | 47 | 167,01 (101,93; 236,37) | 0,05 |

Tabelle 26: Interleukin-10 (pg/ml)); IQR (Interquartilbereich)



Im unstimulierten Nabelschnurblut war IL-10 in sehr niedrigen Konzentrationen messbar.

Nach Stimulation mit Lipid A wurde Signifikanz erreicht (**p=0,05**): Im Nabelschnurblut atopischer Mütter war Interleukin-10 signifikant niedriger (siehe Abb.21).

Abbildung 25: Interleukin-10 Konzentration⁴ nach Endotoxinstimulation; (0= Mutter keine Atopie; 1= Mutter Atopie)

⁴ Abbildung ohne Ausreißer

2.2 Lymphozytensubtypen

Die Anzahl der Probanden, bei welchen die gemessen wurden betrug maximal 14. Die Messung der Lymphozytensubtypen mittels CD-Oberflächenantigene zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Atopierisikogruppen.

T-Helfer-Zellen (CD4⁺)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|----------------------------|----|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|--------|
| | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | |
| CD4⁺ (%) | | | | | | | |
| Unstimuliert | 13 | 44,78 (± 2,19) | 8 | 46,57 (± 2,59) | 5 | 41,93 (± 3,92) | 0,32 |
| PHA | 9 | 42,82 (± 3,55) | 5 | 44,38 (± 4,22) | 4 | 40,86 (± 6,62) | 0,65 |
| LpA | 12 | 42,28 (± 4,03) | 7 | 41,21 (± 2,99) | 5 | 43,78 (± 9,36) | 0,80 |

Tabelle 26: CD4⁺ T-Zellen (%);SEM (Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes)

Aktivierte Immunzellen (CD25⁺)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|-----------------------------|----|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|--------|
| | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | |
| CD25⁺ (%) | | | | | | | |
| Unstimuliert | 14 | 3,13 (± 0,33) | 8 | 3,61 (± 0,42) | 6 | 2,49 (± 0,41) | 0,089 |
| PHA | 11 | 40,77 (± 6,46) | 5 | 33,59 (± 6,90) | 6 | 46,76 (± 10,26) | 0,36 |
| LpA | 13 | 2,73 (± 0,38) | 7 | 3,03 (± 0,50) | 6 | 2,38 (± 0,61) | 0,42 |

Tabelle 27: CD25⁺ T-Zellen (%);SEM (Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes)

Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|----------------------------|----|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|--------|
| | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | |
| CD8⁺ (%) | | | | | | | |
| Unstimuliert | 14 | 17,82 (± 1,65) | 8 | 17,87 (± 2,52) | 6 | 17,76 (± 2,19) | 0,97 |
| PHA | 11 | 26,86 (± 2,93) | 5 | 24,61 (± 4,50) | 6 | 28,74 (± 4,04) | 0,51 |
| LpA | 13 | 20,79 (± 2,71) | 7 | 23,15 (± 4,45) | 6 | 18,04 (± 2,77) | 0,37 |

Tabelle 28: CD8⁺ T-Zellen (%);SEM (Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes)

B-Lymphozyten (CD19⁺)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|-----------------------------|----|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|--------|
| | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | | Mittelwert (±SEM) | |
| CD19⁺ (%) | | | | | | | |
| Unstimuliert | 14 | 13,23 (± 1,77) | 8 | 12,72 (± 1,28) | 6 | 13,90 (± 3,96) | 0,79 |
| PHA | 10 | 9,20 (± 1,97) | 5 | 6,91 (± 2,05) | 5 | 11,50 (± 3,25) | 0,27 |
| LpA | 12 | 9,56 (± 1,35) | 7 | 9,72 (± 1,79) | 5 | 9,32 (± 2,29) | 0,89 |

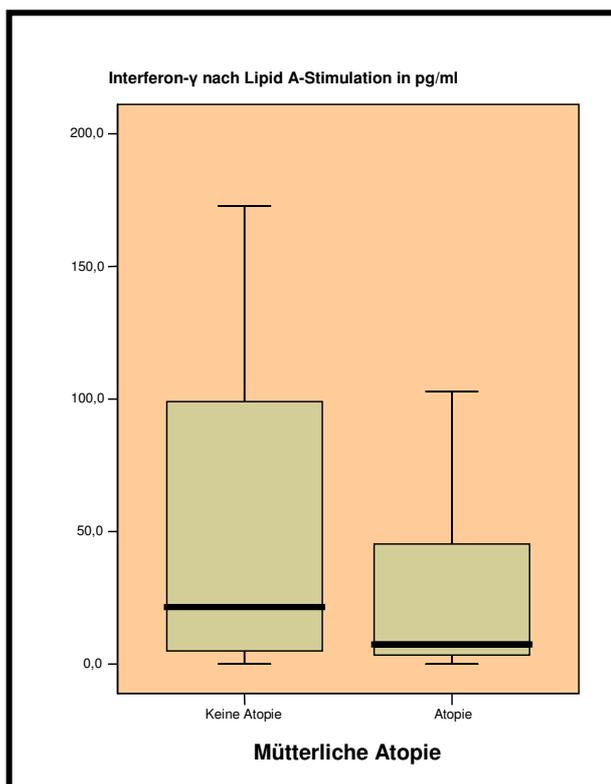
Tabelle 29: CD19⁺ T-Zellen (%);SEM (Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes)

2.3 Th1-Zytokine

Interferon- γ

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|--------------------------------|-----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|-------------------------------|-------------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| IFN-γ | | | | | | | |
| Unstimuliert | 117 | 0,01 (0,01; 1,01) | 69 | 0,01 (0,01; 0,74) | 48 | 0,01 (0,01; 1,99) | 0,61 |
| PHA | 107 | 115,91 (16,2; 224,74) | 65 | 132,2 (20,50; 261,64) | 42 | 95,73 (13,34; 160,34) | 0,30 |
| LpA | 115 | 21,16 (3,95; 100,72) | 68 | 27,74 (5,35; 128,42) | 47 | 12,38 (3,32; 69,33) | 0,04 |

Tabelle 30: Interferon- γ (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)



Die Konzentration von Interferon- γ im Überstand des mit Lipid A stimulierten Nabelschnurblutes erreichte mit niedrigeren Werten in der Gruppe der atopischen Mütter zwischen den beiden Gruppen Signifikanz (**p=0,04**) (siehe Abb.22).

Abbildung 27: Interferon- γ Konzentration⁵ nach Endotoxinstimulation, n=115 (0= Mutter keine Atopie; 1= Mutter Atopie)

⁵ Abbildung ohne Ausreißer

Interleukin-12

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|----|----------------------|----|----------------------|----|----------------------|--------|
| IL-12 | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | |
| Unstimuliert | 70 | 0,74 (0,25; 1,38) | 43 | 0,62 (0,18; 1,27) | 27 | 0,94 (0,25; 1,53) | 0,21 |
| PHA | 66 | 1,69 (1,05; 2,75) | 40 | 1,63 (1,04; 2,76) | 26 | 1,73 (1,05; 2,61) | 0,86 |
| LpA | 66 | 1,08 (0,52; 1,77) | 41 | 1,07 (0,52; 1,62) | 25 | 1,10 (0,67; 1,83) | 0,70 |

Tabelle 31: Interleukin-12 (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

Bei Neugeborenen atopischer Mütter war die Synthese von Interleukin-12 vor und nach Stimulation tendenziell etwas höher als bei Neugeborenen gesunder Mütter.

Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach Stimulation war ein leichter Konzentrationsanstieg bemerkbar.

2.4 Th2-Zytokine

Interleukin-4

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|----|----------------------|----|----------------------|---|----------------------|--------|
| IL-4 | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| Unstimuliert | 15 | 0,22 (0,01; 0,30) | 10 | 0,20 (0,01; 0,23) | 5 | 0,29 (0,20; 0,30) | 0,46 |
| PHA | 14 | 1,60 (0,64; 3,38) | 9 | 1,65 (0,64; 3,38) | 5 | 1,05 (0,77; 2,08) | 0,89 |
| LpA | 13 | 0,23 (0,13; 0,50) | 8 | 0,20 (0,01; 0,51) | 5 | 0,36 (0,14; 0,5) | 0,42 |

Tabelle 32: Interleukin-4 (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

Interleukin-5

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|-----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|--------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| IL-5 | | | | | | | |
| Unstimuliert | 117 | 0,13 (0,02; 0,22) | 69 | 0,13 (0,06; 0,19) | 48 | 0,15 (0,02; 0,23) | 0,45 |
| PHA | 107 | 38,10 (17,87; 82,03) | 65 | 54,23 (22,94; 92,14) | 42 | 29,20 (16,77; 64,68) | 0,25 |
| LpA | 115 | 8,28 (3,39; 23,90) | 68 | 8,72 (3,44; 26,19) | 47 | 6,46 (3,39; 15,30) | 0,34 |

Tabelle 33: Interleukin-5 (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

Interleukin-13

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|-----|--------------------------------|----|-------------------------------|----|---------------------------------|--------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| IL-13 | | | | | | | |
| Unstimuliert | 117 | 0,47 (0,26; 0,79) | 69 | 0,51 (0,29; 0,76) | 48 | 0,45 (0,20; 0,80) | 0,46 |
| PHA | 107 | 756,46 (122,90; 2623,28) | 65 | 559,93 (68,02; 2553,73) | 42 | 911,57 (126,97; 2699,796) | 0,44 |
| LpA | 115 | 6,18 (2,24; 14,61) | 68 | 8,78 (2,51; 16,04) | 47 | 5,65 (1,91; 14,42) | 0,34 |

Tabelle 34: Interleukin-13 (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

Die Sekretion der Th2-Zytokine Interleukin-4, -5 und -13 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Neugeborenen mit hohem und Neugeborenen mit niedrigem Atopierisiko. Interleukin-4 zeigte bei allen Neugeborenen einen minimalen Konzentrationsanstieg nach PHA-Stimulation, der nach LpA-Stimulation ausblieb. Die Konzentration von Interleukin-5 und -13 dagegen stiegen nach Endotoxinstimulation leicht und nach Mitogenstimulation mäßig an.

2.5 Proinflammatorische Zytokine

Die Konzentrationen von Interleukin-6 (das u.a. auch zu den Th2-Zytokinen gezählt wird) und TNF- α zeigten unstimuliert und nach Stimulation keine signifikanten Gruppenunterschiede. Bei beiden Zytokinen war ein Sekretionsanstieg nach Stimulation zu beobachten.

Interleukin-6

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------------|----|--------------------------------------|--------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| IL-6 | | | | | | | |
| Unstimuliert | 70 | 4,74 (1,22; 15,37) | 43 | 4,23 (1,03; 17,68) | 27 | 5,95 (2,11; 11,24) | 0,95 |
| PHA | 66 | 30000 (18269,92; 180000) | 40 | 30454,88 (21227,56; 180000,00) | 26 | 27267,24 (17526,97; 180000,00) | 0,39 |
| LpA | 66 | 30000 (15760,05; 626222,51) | 41 | 30000 (18053,64; 51748,49) | 25 | 30000 (13700,57; 108110,81) | 0,96 |

Tabelle 35: Interleukin-6 (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

Tumor Nekrose Faktor- α

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|--------------------------------|-----|---------------------------------|----|---------------------------------|----|---------------------------------|--------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| TNF-α | | | | | | | |
| Unstimuliert | 117 | 1,12 (0,39; 1,38) | 69 | 1,12 (0,53; 1,35) | 48 | 0,97 (0,27; 1,38) | 0,46 |
| PHA | 107 | 739,43 (214,02; 1798,42) | 65 | 704,99 (214,02; 1805,68) | 42 | 761,35 (300,33; 1767,69) | 0,83 |
| LpA | 115 | 1131,02 (530,60; 2120,75) | 68 | 1066,43 (542,09; 2234,74) | 47 | 1294,48 (433,90; 1970,03) | 0,90 |

Tabelle 36: Tumor Nekrose Faktor- α (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

GM-CSF (Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktor)

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|-----|------------------------|----|------------------------|----|------------------------|--------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| Unstimuliert | 117 | 0,01 (0,01; 1,02) | 69 | 0,01 (0,01; 1,02) | 48 | 0,01 (0,01; 2,77) | 0,85 |
| PHA | 108 | 10,97 (0,01; 96,31) | 66 | 6,92 (0,01; 103,33) | 42 | 17,63 (0,71; 83,53) | 0,32 |
| LpA | 115 | 3,13 (0,01; 25,20) | 68 | 1,65 (0,01; 23,29) | 47 | 6,34 (0,01; 27,09) | 0,83 |

Tabelle 37: GM-CSF (pg/ml); IQR (Interquartilbereich)

Im unstimulierten Nabelschnurblut ließen sich nur sehr geringe Mengen des Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktors detektieren. Nach Endotoxin- und vor allem nach PHA-Stimulation war eine Sekretionssteigerung zu erkennen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den Atopierisikogruppen.

2.6 Proliferation der mononukleären Zellen

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|-----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|--------|
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| Unstimuliert | 118 | 3790,64 (2425,03; 6135,44) | 70 | 3828,77 (2439,63; 6598,71) | 48 | 3440,18 (2377,93; 5305,81) | 0,36 |
| PHA | 107 | 75437,58 (56040,56; 91643,42) | 65 | 64017,93 (54642,89; 85020,17) | 42 | 78825,08 (59613,61; 93946,72) | 0,06 |
| LpA | 117 | 3948,86 (2788,86; 6323,82) | 69 | 4060,5 (2934,24; 6699,67) | 48 | 3631,31 (2730,89; 5520,16) | 0,4 |
| | | | | | | | |
| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
| | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| PHA | 107 | 17,59 (12,10; 32,27) | 65 | 16,07 (9,70; 23,82) | 42 | 19,26 (12,37; 37,27) | 0,08 |
| LpA | 117 | 1,07 (0,79; 1,42) | 69 | 1,03 (0,78; 1,45) | 48 | 1,09 (0,86; 1,34) | 0,76 |

Tabelle 38: Proliferation und Stimulationsindex; IQR (Interquartilbereich)

Interleukin-2

| Mutter | N | Gesamt | N | Keine Atopie | N | Atopie | p-Wert |
|---------------------|------------|----------------------|----|----------------------|----|----------------------|--------|
| IL-2 | | Median (IQR) | | Median (IQR) | | Median (IQR) | U-test |
| Unstimuliert | 118 | 0,01 (0,01; 0,30) | 70 | 0,01 (0,01; 0,01) | 48 | 0,01 (0,01; 1,14) | 0,48 |
| PHA | 105 | 0,01 (0,01; 1,39) | 65 | 0,01 (0,01; 1,39) | 40 | 0,01 (0,01; 0,94) | 0,90 |
| LpA | 116 | 0,01 (0,01; 3,83) | 69 | 0,01 (0,01; 3,88) | 47 | 0,01 (0,01; 3,78) | 0,63 |

Tabelle 39: Interleukin-2; IQR (Interquartilbereich)

Weder bei den direkt gemessenen Proliferationswerten, noch bei den berechneten Stimulationsindizes (SI) waren signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe atopischer Mütter und Gruppe nicht atopischer Mütter zu beobachten.

Die Messwerte von Interleukin-2 waren im Nabelschnurblut aller Neugeborenen sehr niedrig.

5. DISKUSSION

Hauptergebnisse: Die Hauptergebnisse der PAULINA-Studie umfassen zum einen Unterschiede der T-Zellsubpopulationen im Nabelschnurblut von atopischen gegenüber nicht atopischen Müttern. Der Anteil der regulatorische T-Lymphozyten (T_{regs} , $CD4^+CD25^{++}$, $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$) ($p=0,005$) sowie die Konzentration von Interleukin-10 ($p=0,05$) und des Th1-Leitzytokins Interferon- γ ($p=0,04$) waren nach Endotoxinstimulation (mit Lipid A) in der Gruppe der atopischen Mütter signifikant reduziert. Außerdem war die Anzahl der aktivierten T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD25^+$) im unstimulierten Nabelschnurblut atopischer Mütter signifikant reduziert ($p=0,03$).

Zum anderen konnte die Studie signifikante epidemiologische Unterschiede zwischen den atopischen und den nicht atopischen Müttern aufzeigen. Kinder aus der Gruppe der atopischen Mütter waren signifikant schwerer, größer und hatten einen größeren Kopfumfang als Kinder aus der Gruppe der gesunden Mütter ($p=0,008/0,02/0,02$).

Bei vorhandener Atopie der Mutter war zusätzlich ein signifikant größerer Anteil der Väter atopisch ($p=0,027$). Diese Faktoren hatten jedoch keinen Einfluss auf die immunologischen Parameter und nach Adjustierung für diese möglichen Störfaktoren (Confounders) zeigte sich keine signifikante Änderung der Ergebnisse.

Die Sekretion des Th1-induzierenden Zytokins Interleukin-12, der Th2-Zytokine (Interleukin- 4, -5 und -13), der proinflammatorischen Zytokine (Interleukin-6 und Tumor Nekrose Faktor- α), des Zytokins Interleukin-2 und des Granulozyten und Makrophagen stimulierenden Faktors (GM-CSF) sowie die Lymphoproliferation im Nabelschnurblut atopischer Mütter unterschieden sich nicht von denen der nicht atopischen Mütter.

In den letzten Jahrzehnten war ein Anstieg der Atopieprävalenz in der westlichen Welt zu verzeichnen. Atopie der Mutter stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung atopischer Erkrankungen im Kindesalter dar [12]. Durch den Einfluss der mütterlichen Atopie und durch Interaktionen mit bestimmten Umweltfaktoren könnte das Immunsystem eines Kindes bereits in utero beeinflusst werden [67].

In der PAULINA-Studie hatte der Atopiestatus der Mutter einen Einfluss auf die Anzahl regulatorischer T-Zellen, sowie auf die Konzentration von Interleukin-10 und des Th1-Zytokins Interferon- γ nach Aktivierung des angeborenen Immunsystems über

Endotoxinstimulation (Lipid A). Alle drei Parameter waren im Nabelschnurblut atopischer Mütter signifikant reduziert. Im unstimulierten Nabelschnurblut hatte der Atopiestatus der Mutter einen Einfluss auf die aktivierten T-Helferzellen. Sie waren im Nabelschnurblut atopischer Mütter ebenfalls signifikant reduziert.

Für die erhöhte Allergieprävalenz und die Hygiene-Hypothese wird eine reduzierte Exposition der Kinder gegenüber pathogenen und nicht pathogenen Keimen verantwortlich gemacht. Die reduzierte Keimexposition soll zu einer erhöhten Th2-Antwort führen. Die genauen Mechanismen auf zellulärer Ebene sind jedoch noch unklar. Initial wurde eine fehlende Immundeviation von allergenspezifischen Antworten von einem Th2- zu einem Th1-Profil diskutiert. Die fehlende Immundeviation resultiert aus der reduzierten Produktion von IL-12 und Interferonen von Zellen des angeborenen Immunsystems, die durch bakterielle Produkte über ihre Toll-like Rezeptoren stimuliert werden. In letzter Zeit wurde die Rolle der reduzierten Immunsuppression durch reduzierte Aktivität von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) betont. [13]

T_{regs} stehen daher im Zentrum des Interesses der Allergieforschung. Sie scheinen zentral an der Limitierung einer Immunantwort gegenüber Fremdanitigenen und an der Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen beteiligt zu sein [1]. Außerdem sind regulatorische T-Zellen in der Lage Th2- und Th1-Antworten des Immunsystems zu unterdrücken [31]. Sie könnten also bei der Allergieentwicklung eine wichtige Rolle spielen.

Folglich könnte die erniedrigte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut atopischer Mütter, die in der PAULINA-Studie detektiert wurde, zur Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter beitragen.

Lee et al untersuchten mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von 98 Kindern im Alter von zirka vier bis acht Jahren. In dieser pädiatrischen Studie waren bei Kindern mit allergischer Rhinokonjunktivitis und/oder allergischem Asthma bronchiale signifikant geringere Mengen an $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ T-Lymphozyten im Blut nachweisbar als in der nicht-allergischen Kontrollgruppe [76].

Bringt man diese Ergebnisse mit denen der PAULINA-Studie in Einklang, ist es vorstellbar, dass die Menge an T_{regs} im Nabelschnurblut bereits einen Hinweis auf die

zukünftige Atopieentwicklung im Kindesalter ermöglicht. Da Lee et al jedoch im Unterschied zur PAULINA-Studie Kinder im Alter von 4-8 Jahren untersuchten und auf stimulierende Substanzen verzichteten, wäre ein Vergleich der Studienergebnisse mit den Follow-up Daten der PAULINA-Studie bedeutsam.

In einer Population von 83 Erwachsenen fand Zhang keine signifikant unterschiedlichen Mengen an $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$ T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Asthma und gesunden Studienteilnehmern [62]. Lin et al (PBMCs, n=39; Durchschnittsalter 11 Jahre) [77] und Hartl et al (PBMCs, n=31; 3-16 Jahre; Asthmatiker 8,5; Kontrollen 7,4 Jahre im Median) [78] fanden keine signifikant unterschiedlichen Mengen von T_{regs} im peripheren Blut von Kindern mit und ohne Asthma. Allerdings sind diese drei Studien in ihrer Aussagekraft eingeschränkt: Zhang et al untersuchte Zellen von Erwachsenen, Lin et al und Hartl et al untersuchten Zellen von Kindern und keine Nabelschnurblutzellen von Neugeborenen. Zusätzlich wurde als Gruppenvariable lediglich vorhandenes oder nicht vorhandenes Asthma als eine der drei atopischen Erkrankungen verwendet.

Smith et al fanden keinen Unterschied der Häufigkeit von $CD4^+CD25^+CD127^{\text{lo/-}}$ T_{reg} Zellen im Nabelschnurblut zwischen Kindern mit Hühnereiweiß-Allergie und nicht allergischen Kindern im Alter von 12 Monaten (n=33) [79]. Sie verwendeten CD127-negative aktivierte T-Zellen als Marker für regulatorische T-Zellen im Nabelschnurblut. Die Expression von CD127 korreliert invers mit der Expression von Foxp3 und der suppressiven Funktion von regulatorischen T-Zellen [80] und wird in Kombination mit anderen Markern benutzt, um regulatorische T-Zellen von normalen T-Zellen unterscheiden zu können [79]. Auch Smith et al verwendeten lediglich eine vorhandene Hühnereiweiß-Allergie als Gruppenvariable. Dies ist bei einjährigen Kindern durchaus sinnvoll, da andere atopische Erkrankungen meist erst später im Kindesalter auftreten [1].

Jartti et al fanden keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen in PBMCs von 151 Kindern atopischer Familien im Alter von 6 Jahren und der Entwicklung atopischer Erkrankungen im Kindesalter [81]. Jartti et al untersuchten hier jedoch eine Population aus atopischen Familien und korrelierten die Anzahl regulatorischer T-Zellen der Kinder mit deren klinischen und immunologischen Korrelaten einer atopischen Erkrankung [81].

In den meisten Studien über regulatorische T-Zellen im Nabelschnurblut und Atopie wurde in erster Linie die suppressive Funktion der Zellen untersucht [77], [23] und nicht

die Anzahl, so dass zur Anzahl regulatorischer T-Zellen im Nabelschnurblut noch relevante Studien zum Vergleich fehlen.

Lymphozytensubtypen: Der Anteil an aktivierten T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD25^+$) war im unstimulierten Nabelschnurblut atopischer Mütter der PAULINA-Studie signifikant reduziert.

Auch in der pädiatrischen Studie (n=98; 4-8 Jahre) von Lee und Yu et al wurden bei Kindern mit allergischer Rhinokonjunktivitis und/oder allergischem Asthma bronchiale signifikant geringere Mengen an $CD4^+CD25^+$ T-Lymphozyten im Blut nachgewiesen als in der nicht-allergischen Kontrollgruppe [76]. In einer norwegischen Studie war der Anteil an $CD3^+CD25^+$ T-Zellen in frischen CBMCs (n=15) von Kindern mit atopischer Familienanamnese signifikant niedriger als bei Kindern ohne atopischen Hintergrund [82]. CD3 ist Teil des T-Zell Antigen-Rezeptor Komplexes (TCR/CD3) [1], eines Zelloberflächenmoleküls, das die T-Lymphozyten abgrenzt [83] und somit ein Marker für T-Lymphozyten.

Bellinghausen fand dagegen keine unterschiedliche Anzahl von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen im peripheren Blut von allergischen und nicht allergischen Probanden (Alter der Probanden nicht bekannt) (n=18) [31], ebenso wie Shi et al (n=60) bei erwachsenen Probanden mit und ohne atopischem Asthma [84].

Aktivierte T-Helfer-Zellen ($CD4^+CD25^+$) scheinen eine Rolle bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen zu spielen. Aus diesem Grund und, weil regulatorische T-Zellen eine Subpopulation dieser Zellen darstellen sollten aktivierte T-Helfer-Zellen bei der Erforschung allergischer Erkrankungen nicht außer Acht gelassen werden.

Des Weiteren ergab die Messung der T-Helfer-Zellen ($CD4^+$), Zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$), B-Lymphozyten ($CD19^+$) und aktivierten T-Zellen ($CD25^+$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Neugeborenenengruppen der PAULINA-Studie.

Van der Velden et al untersuchten CD-Oberflächenantigene von CBMCs. Sie fanden ebenfalls keinen Unterschied der Anzahl für $CD25^+$ -, $CD8^+$ - T-Zellen sowie der B-Zellen. Lediglich der Anteil an $CD4^+$ -T-Zellen war in CBMCs von Kindern, die im Alter von 12 Monaten klinische Symptome einer atopischen Erkrankung (atopische Dermatitis, Asthma-ähnliche Symptome, Lebensmittelallergie) entwickelt hatten signifikant höher als bei Kindern, die bis zu diesem Zeitpunkt gesund geblieben waren

(n=110) [66]. Die Population der Studie von Van der Velden et al bestand jedoch nur aus Neugeborenen mit hohem Allergierisiko: alle Kinder der Studie hatten mindestens eine mütterliche Atopie als Risikofaktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen, so dass der Einfluss der mütterlichen Atopie hier nicht differenziert betrachtet werden kann.

Interleukin-10: Bei der PAULINA-Studie war die Konzentration von Interleukin-10 nach Endotoxinstimulation (Lipid A) im Nabelschnurblut der atopischen Mütter signifikant reduziert. Interleukin-10 besitzt antiinflammatorische sowie immunmodulierende Fähigkeiten und kann die Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen reduzieren [85]. Zudem ist IL-10 in der Lage die Produktion von Immunglobulin E zu supprimieren und eine allergische Entzündungsreaktion direkt über eine Hemmung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten zu unterdrücken [20].

Van der Velden et al vermuten darüber hinaus, dass eine erniedrigte allergen-induzierte IL-10 Produktion bei atopischen Kindern die Entwicklung allergischer Erkrankungen fördern könnte, indem der Entzündungsprozess ungenügend unterdrückt wird [66]. Ihre Ergebnisse zeigten eine signifikant erniedrigte allergen-induzierte (Hausstaubmilben) IL-10 Produktion bei allergischen im Vergleich zu nicht allergischen Kindern im Alter von 12 Monaten (n=110) [66]. Van der Velden et al stimulierten PBMCs mit einem Allergen und verwendeten ein anderes Kit⁶ zur Zytokinmessung als bei der PAULINA-Studie.

In der Studie von Prescott et al war Interleukin-10 im Nabelschnurblut nach Stimulation mit Hausstaubmilben-Allergen bei Kindern, die später atopische Erkrankungen entwickelten niedriger [12]. Die Studie (n=31) untersuchte Kinder mit positiver Familienanamnese, somit hohem Atopierisiko, die während der ersten 2 Lebensjahre eine atopische Erkrankung entwickelten im Vergleich zu Kindern mit negativer Familienanamnese (niedriges Risiko), die bis zum Alter von 2 Jahren symptomfrei blieben. Hier wurde im Vergleich zur PAULINA-Studie ein Allergen als Stimulus verwendet, nicht ein Bestandteil von Endotoxinen, die Zytokinmessung fand mittels ELISA statt.

⁶ Pelikan Compact™ human cytokine kit (Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service (CLB), Amsterdam, the Netherlands)

Pädiatrische Patienten mit Asthma bronchiale zeigten dagegen bei der Studie von Lee et al verglichen mit gesunden Kontrollen eine signifikant höhere Expression von Interleukin-10 mRNA im peripheren Blut (n=98) [76]. Hier wurde im Vergleich zur PAULINA-Studie die mRNA von IL-10 gemessen und es fand keine Stimulation der Zellen statt.

Amoudruz et al fanden keinen signifikanten Unterschied der Interleukin-10 Sekretion zwischen CBMC-Überständen von Kindern mit allergischen und nicht-allergischen Müttern (n=19) nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) von E.coli B [36]. Allerdings war die von Ihnen untersuchte Studienpopulation mit 19 teilnehmenden Müttern (PAULINA-Studie 118 Mütter) eher klein und die Detektionsgrenze in der Studie von Amoudruz mit 3,3 pg/ml im Vergleich zur PAULINA-Studie mit 0,9 pg/ml relativ hoch.

Die Ergebnisse der Studien über Interleukin-10 sind sehr unterschiedlich, was vermutlich an den unterschiedlichen Studiendesigns und Substanzen, die zur Zellstimulation verwendet wurden, liegt. Dennoch deuten die Resultate der PAULINA-Studie sowie der Studien von Van der Velden et al und Prescott et al auf eine bedeutende Rolle von erniedrigtem Interleukin-10 bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter hin.

Möglicher protektiver Effekt mikrobieller Stimulation: Die Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten (T_{regs} , $CD4^+CD25^{\text{hoch}}$) sowie die Konzentration von Interleukin-10 und des Th1-Leitzytokins Interferon- γ waren nach mikrobieller Stimulation im Nabelschnurblut der atopischen Mütter signifikant reduziert.

Der mikrobiellen Exposition im frühen Kindesalter wird ein protektiver Effekt bezüglich der Atopieentwicklung nachgesagt [41], [40]. Es ist denkbar, dass sich dieser Schutz bereits intrauterin oder im Neugeborenenalter auswirken kann. Um diese Annahme in vitro zu überprüfen, wurden für die PAULINA-Studie CBMCs mit der Endotoxinkomponente Lipid A stimuliert. Der mikrobielle Stimulus Lipid A, ein Bestandteil aus Zellwänden gramnegativer Bakterien, aktiviert das angeborene Immunsystem über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4).

Eine geringere Zahl an regulatorischen T-Zellen, sowie die verminderte Konzentration von Interleukin-10 und Interferon- γ bei Neugeborenen atopischer Mütter der

PAULINA-Studie im Gegensatz zu Neugeborenen nicht atopischer Mütter zeigte sich erst nach Endotoxinstimulation.

Hierfür könnte ein insgesamt unreiferes Immunsystem bei Neugeborenen atopischer Mütter verglichen mit Neugeborenen nicht atopischer Mütter verantwortlich sein. Auch eine veränderte Funktion des Toll-like Rezeptor 4 bei Neugeborenen atopischer Mütter könnte dafür verantwortlich sein.

Es gibt Hinweise dafür, dass die Genexpression von TLR4 modulierbar ist. Dies zeigt eine Studie von Ege et al, bei der die mikrobielle Exposition der Mutter (hier: Kontakt zu Tieren auf dem Bauernhof) während der Schwangerschaft mit einer erhöhten Genexpression von TLR4 bei ihren Kindern assoziiert war [69].

Unter der Annahme, dass Neugeborene bei Geburt ein Th2-ausgerichtetes Immunsystem haben, könnte der schwächere Anstieg von Interferon- γ (IFN- γ) bei Neugeborenen atopischer Mütter den nötigen Wechsel von der proallergischen Th2- zur antiallergischen Th1-Antwort verhindern, so dass im Blut von Risikoneugeborenen trotz Endotoxinstimulation eine proallergische Immunantwort (vom Th2-Typ) nach Allergenstimulation entstehen kann.

Folglich wäre bei Neugeborenen atopischer Mütter ein Wechsel zur antiallergischen Immunantwort vom Th1-Typ nach mikrobieller Stimulation nur in abgeschwächter Form möglich.

Es wird schon seit längerer Zeit vermutet, dass die Fähigkeit IFN- γ bereits früh im Leben zu produzieren eine Vorhersage über die mögliche Entwicklung atopischer Erkrankungen im Kindesalter treffen könnte [86], [87], [88], [89], [90].

Es ist möglich, dass dieses „Interferon- γ Defizit“ im Nabelschnurblut von atopisch prädisponierten Neugeborenen erst nach Endotoxinstimulation messbar ist. Denn weder im unstimulierten noch im mitogenstimulierten Zellkulturüberstand aus Nabelschnurblut waren signifikante Konzentrationsunterschiede des Th1-Leitzytokins Interferon- γ zwischen Neugeborenen atopischer und nicht-atopischer Mütter der PAULINA-Studie zu beobachten.

Es könnte jedoch auch eine fehlende Balance der Immunsuppression durch verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen sowie durch erniedrigte Sekretion des immunsuppressiven Interleukin-10 im Nabelschnurblut atopischer Mütter zur Entwicklung allergischer Erkrankungen beitragen.

Möglicherweise tragen aber auch beide Faktoren zur Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter bei.

Interferon- γ : Kinder von atopischen Müttern, die innerhalb von 12 Monaten atopische Erkrankungen⁷ entwickelten, zeigten nach der in vitro Stimulation ihrer Zellen mit Hausstaubmilben in ihrem Nabelschnurblut eine schwächere IFN- γ Produktion im Vergleich zu Kindern von atopischen Müttern, die innerhalb von 12 Monaten keine atopische Erkrankung entwickelten [66]. Van der Velden et al verwendeten ein Allergen als Stimulus und keine Endotoxinkomponente oder ein Mitogen wie bei der PAULINA-Studie.

In der Studie von Tang et al sezernierten Nabelschnurblutzellen von Kindern, die im Alter von 12 Monaten entweder Symptome einer atopischen Erkrankung oder einen positiven IgE-vermittelten skin-prick-Test entwickelten, - verglichen mit Zellen gesunder Kinder - nach PHA-Stimulation signifikant weniger Interferon- γ (n=35) [88]. Auch in der Studie von Prescott et al war die Interferon- γ Produktion (mRNA) von CBMCs nach Stimulation mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) bei Kindern (n=31), die im Alter von 2 Jahren atopisch erkrankten, signifikant niedriger als bei gesunden Kindern [12].

Ob es einen Zusammenhang zwischen der Allergieentwicklung im Kindesalter und den Immunantworten zum Zeitpunkt der Geburt gibt, wird sich im weiteren Studienverlauf zeigen. Bei der Follow-up-Studie von PAULINA wird unter anderem der Atopiestatus der Kinder im Alter von drei Jahren abgefragt. Der standardisierte Fragebogen wird von den Eltern beantwortet. Die ersten 88 von 118 Probanden haben den Fragebogen bereits beantwortet und die epidemiologischen Daten werden derzeit ausgewertet.

1998 ermittelten Kondo et al bei einer 6-jährigen Verlaufsstudie die erniedrigte IFN- γ Produktion von antigen-stimulierten (Ovalbumin oder Rinderserumalbumin) CBMCs als Risikofaktor für allergische Erkrankungen im Kindesalter (n=21) [89]. Übereinstimmend dazu assoziierten Macaubas und de Klerk et al erhöhte Konzentrationen von Interferon- γ im unstimulierten Nabelschnurblut in einer größer angelegten Verlaufsstudie (n=404) mit einem niedrigeren Risiko für Asthma und Atopie bei Sechsjährigen [11].

Keine unterschiedliche Höhe der IFN- γ Produktion der CBMCs von Neugeborenen atopischer und nicht atopischer Mütter fanden Spinozzi et al in einer Studie mit 208

⁷ atopisches Ekzem, Nahrungsmittelallergie, Asthma-ähnliche Erkrankungen

Teilnehmern [91]. Spinozzi stimulierten die CBMCs jedoch mit PMA und Ionomycin und führten eine Messung der intrazellulären IFN- γ Produktion durch, so dass ein Vergleich mit der PAULINA-Studie nur bedingt möglich ist. Bei der PAULINA-Studie war die IFN- γ Produktion der CBMCs von Neugeborenen atopischer Mütter nach Lipid A-Stimulation signifikant niedriger als bei Neugeborenen nicht atopischer Mütter.

Interleukin-12: Bei der PAULINA-Studie war kein signifikanter Unterschied der Interleukin-12 Konzentration im Nabelschnurblut zwischen den atopischen und nicht-atopischen Müttern messbar. Interleukin-12 gehört wie Interferon- γ zu den Th1-Zytokinen. Es besitzt starke Th1-induzierende Fähigkeiten und führt zur IFN- γ Produktion in T-Zellen [15]. Es wird von Antigen präsentierenden Zellen entweder nach Stimulation mit Bestandteilen der Zellwand von Bakterien oder nach direkter Interaktion mit T-Zellen ausgeschüttet [35].

Von Gabrielsson et al wurde nach Allergenstimulation (Birke, Ovalbumin und Katze) eine signifikant niedrigere Anzahl an Interleukin-12 produzierenden CBMCs bei Kindern mit atopischen Müttern (n=18), im Vergleich zu Kindern nicht atopischer Mütter (n=19) angegeben [35]. Somit war die Konzentration dieses Th1-fördernden Zytokins bei Kindern mit niedrigem Atopierisiko höher.

In einer Follow-up Studie von Macaubas gab es keine Assoziation zwischen der Interleukin-12 Konzentration im Nabelschnurblut und der Entwicklung von Asthma oder Atopie bei Kindern im Alter von sechs Jahren [11].

Bei der PAULINA-Studie lagen die Interleukin-12 Konzentrationen zwischen 0,01 und 6,48 pg/ml. Der erwartete Anstieg der IL-12 Sekretion nach mikrobieller Stimulation fiel gering aus. Ein möglicher Grund für die insgesamt niedrige IL-12 Konzentration könnte sein, dass Neugeborene in ihrem Nabelschnurblut noch unreife Antigen-präsentierende Zellen aufweisen, die nur geringe Mengen an IL-12 produzieren können. Dies kann auch den geringen Anstieg von IL-12 nach mikrobieller Stimulation erklären. Da IL-12 die Produktion des Th1-Leitzytokins IFN- γ induziert und dieses bei der PAULINA-Studie nach Stimulation mit Lipid A erhöht war, muss hier möglicherweise ein anderer Mechanismus der IFN- γ Produktion in Betracht gezogen werden. Eine andere Erklärung für diese niedrigen Werte bei der PAULINA-Studie wäre eine zu geringe Sensitivität der Messmethode für Interleukin-12 in dem Medium Nabelschnurblut

Th2-Zytokine: Der atopische Status der Mutter hatte keinen Einfluss auf proallergische Zytokine vom Th2-Typ im Nabelschnurblut. In der Literatur fielen die Studienergebnisse bezüglich der Th2-Zytokine im Nabelschnurblut bisher insgesamt widersprüchlich aus.

Wendet man das Th1/Th2-Paradigma der Allergie an, so erwartet man bei Neugeborenen mit erhöhtem Atopierisiko durch Atopie der Mutter höhere Konzentrationen der proallergischen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 im Zellkulturüberstand aus Nabelschnurblut.

Bei Lange et al war der gemessene IL-13 Spiegel im Nabelschnurblut bei Kindern, die bis zum Alter von 3 Jahren Symptome einer atopischen Dermatitis entwickelt hatten, nach Stimulation mit PHA und Der p 1 signifikant höher als bei gesunden Kindern [92]. Im Gegensatz dazu waren in einer Studie von Prescott et al (n=31) allergen-spezifische Th2-Antworten (Hausstaubmilben) im NS-Blut (hier: IL-4 (mRNA), 6, 10, 13 (ELISA)) bei Kindern niedriger, die während der Studienlaufzeit (Geburt bis Alter 2 Jahre) atopische Erkrankungen entwickelten [12]. Die Studie von Prescott et al stützt die These der Unreife des Immunsystems von atopiegefährdeten Neugeborenen: Kinder, die im zweijährigen Studienverlauf atopische Erkrankungen entwickelten, wiesen im Nabelschnurblut nach Allergenstimulation geringere Zytokinkonzentrationen von IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 auf als Kinder, die gesund blieben. Erhöhte Konzentrationen von Interleukin-4 im unstimulierten Nabelschnurblut wurden in der Verlaufsuntersuchung von Macaubas et al (n=407) mit einem niedrigeren Risiko für Asthma und Atopie bei Sechsjährigen assoziiert [11]. Sie konnte jedoch keine Verbindung zwischen der Nabelschnurblutkonzentration von Interleukin-13 und der Entwicklung von Asthma oder Atopie im Alter von sechs Jahren herstellen [11]. Spinozzi et al stellten keine unterschiedliche Anzahl der intrazellulären IL-4- und IL-5-produzierenden T-Zellen im nativen Nabelschnurblut der Neugeborenen atopischer und nicht atopischer Mütter fest (n=208) [91]. Spinozzi stimulierten die CBMCs jedoch mit PMA und Ionomycin und führten eine Messung der intrazellulären IFN- γ Produktion durch, so dass ein Vergleich mit der PAULINA-Studie nur bedingt möglich ist.

Die gegensätzlichen Resultate der genannten Studien und die der PAULINA-Studie deuten einerseits auf einen geringeren Prädiktionswert der Messung der Th2-Zytokine im Nabelschnurblut hin, andererseits unterstützen die Ergebnisse fast aller genannten Studien (Lange et al ausgenommen) die These der Unreife des Immunsystems.

Proinflammatorische Zytokine: Auf die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) sowie den Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) hatte die mütterliche Atopie bei der PAULINA-Studie gleichermaßen keinen erkennbaren Einfluss.

IL-6 wird sowohl zu den proinflammatorischen als auch zu den Zytokinen vom Th2-Typ gezählt. Das proinflammatorische Zytokin TNF- α aktiviert dendritische Zellen [93]. GM-CSF induziert in ähnlicher Funktion wie IL-3 und IL-5 die Differenzierung und Funktion myeloider Zellen, spielt so eine wichtige Rolle bei allergischen Entzündungsprozessen [1], [94] und gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen [95]. Ihre Konzentrationen waren im Nabelschnurblutüberstand beider Atopierisikogruppen der PAULINA-Population in ähnlich hohen Konzentrationen vorhanden.

Bei Macaubas et al waren erhöhte Nabelschnurblutkonzentrationen von TNF- α mit einem niedrigeren Risiko für Atopie bei Sechsjährigen assoziiert (n=342). Die Konzentrationen von IL-6 zeigten dagegen keine Verbindung mit der Asthma- oder Atopieentwicklung im Alter von 6 Jahren [11]. Interleukin-6 wurde in der Studie von Macaubas als Parameter für Geburtsstress im Nabelschnurblut bezeichnet. Bei der PAULINA-Studie hingegen war für die Teilnahme ein komplikationsloser Geburtsverlauf gefordert und alle Neugeborenen mit Infektion und erhöhtem IL-6 von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

CBMCs von Kindern allergischer Mütter zeigten in einer Studie von Amoudruz eine niedrigere IL-6 Antwort als CBMCs von Kindern mit Müttern (n=19) ohne Allergie nach mikrobieller Stimulation mit Peptidoglykan (Mureinsäure = Ppg), jedoch nicht nach Stimulation mit LPS [36]. Die Konzentration von TNF- α dagegen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen, weder nach Stimulation mit Ppg noch mit LPS [36].

Die insgesamt niedrigen Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine im unstimulierten Nabelschnurblut könnte die konsequente Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme der PAULINA-Studie widerspiegeln. Der Konzentrationsanstieg der Zytokine nach Endotoxin- und Mitogenstimulation stellt wiederum einen Beweis für die Stimulierbarkeit der CBMCs aus Nabelschnurblut dar.

Lymphozytenproliferation und Interleukin-2: Eine Proliferation der Lymphozyten im Nabelschnurblut (Proliferationswerte und Stimulationsindex) war bei allen Neugeborenen der PAULINA-Studie messbar. Insgesamt ließ sich ein leichter Anstieg der Proliferation nach Endotoxin-Stimulation feststellen, der sich nach Stimulation mit dem potenten Wachstumsstimulus PHA vervielfachte. Signifikante Unterschiede zwischen Neugeborenen atopischer und nicht atopischer Mütter waren hier nicht zu verzeichnen.

Kopp et al bestätigten die Ergebnisse der PAULINA-Studie: Sie fanden keinen Unterschied zwischen Neugeborenen atopischer und nicht-atopischer Mütter bezüglich Lymphozytenproliferation nach Allergenstimulation [96], [97], genau wie Miller et al nach Antigenstimulation [98], Willwerth et al nach PHA-Stimulation [99], Kondo nach Stimulation mit Lebensmittelantigenen [100], Van Duren-Schmidt nach Stimulation mit Wiesen-Lieschgras [101] und Szeffalusi nach Stimulation mit Milchprotein [102] der CBMCs.

Neugeborene mit atopischer Familienanamnese zeigten dagegen bei Prescott et al signifikant höhere allergen-spezifische CBMC proliferative Antworten auf die Stimulation mit Katzenallergen (Fel d 1) als Neugeborene mit niedrigem Allergierisiko [12]. Erhöhte Proliferation von CBMCs [66] und PBMCs auf saisonale Allergene [103] und β -lactoglobulin [87] war in einigen Studien mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten atopischer Erkrankungen in der Kindheit verbunden. Bei Willwerth et al war die mütterliche Asthmaanamnese mit erhöhter Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit Ovalbumin im Nabelschnurblut assoziiert [99]. Devereux et al berichteten 2002 von einer positiven Assoziation zwischen den etablierten epidemiologischen Risikofaktoren für Asthma und atopische Erkrankungen - familiäre Atopieanamnese und mütterliches Rauchen - und Lymphoproliferation in vitro [104]. Auch in einer Studie von Haddeland wurde nach Stimulation mit β -lactoglobulin und LPS von einer erhöhten Proliferation der CBMCs von Kindern mit erhöhtem Atopierisiko berichtet [82].

Die Studien über die Zusammenhänge zwischen dem Risikofaktor mütterliche Atopie und der Lymphozytenproliferation im Nabelschnurblut zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Um gut vergleichbare und reliable Daten zu erhalten, sollten die in vitro Bedingungen - wie von Devereux et al im Jahre 2002 bemerkt [105] - vereinheitlicht werden. Dies beinhaltet sowohl die verwendete Zellzahl, das Volumen, das Medium, die

Dauer der Inkubation [105], als auch die Art und Menge der Reagenzien zur Stimulation der CBMCs, wie Allergene, Endotoxin und Mitogene. Dies würde eine bessere Interpretation und Vergleichbarkeit der Studienresultate ermöglichen.

Interleukin-2, das benötigt wird um T-Zell-vermittelte Immunantworten zu induzieren und zu unterhalten [106], war in allen Proben der PAULINA-Studie gering exprimiert. Auch nach Stimulation mit Lipid A oder PHA war lediglich ein geringer Anstieg der Konzentration zu verzeichnen. Zudem waren keine Unterschiede zwischen atopischen und nicht atopischen Müttern erkennbar.

Aufgrund von guten Messergebnissen für andere Zytokine und somit messbaren Immunantworten im Nabelschnurblut ist vermutlich die Konzentrationen im Nabelschnurblut aufgrund des noch unreifen Immunsystems der Neugeborenen tatsächlich äußerst gering.

Neugeborene: Bei der Epidemiologie der Neugeborenen gab es Unterschiede zwischen den beiden Atopierisikogruppen der PAULINA-Studie bezüglich Geburtsgewicht, Körpergröße und Kopfumfang: Neugeborene atopischer Mütter waren signifikant schwerer, größer und hatten einen größeren Kopfumfang.

Es gibt Hinweise dafür, dass Adipositas mit der Entwicklung von Asthma verbunden ist [107]. Da das Geburtsgewicht und der Ponderal Index⁸ mögliche Prädiktoren für spätere Adipositas sind, könnten auch diese Faktoren mit der Entwicklung von Asthma assoziiert sein [108], [109]. Allerdings ist diese Interpretation schwierig, da Asthma selbst zu einer reduzierten körperlichen Aktivität und Adipositas führen kann [1]. Epidemiologische Beobachtungsstudien hatten gezeigt, dass ein großer Kopfumfang zum Zeitpunkt der Geburt [110] mit erhöhtem Serum IgE der jungen Probanden (Mittelwert 13 Jahre), mit dem Risiko für Asthma im Alter von 16 Jahren [111] sowie mit dem Auftreten von allergischer Rhinokonjunktivitis in der Jugend [112] (n= 10809) assoziiert ist.

Gabrielsson und Soderlund fanden in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Geburtsgewicht der Neugeborenen atopischer und nicht atopischer Mütter (n= 37) [35]. Jedoch war die Anzahl der Probanden mit 37 weitaus geringer als die der PAULINA-Studie (n=118). Ob die höheren anthropometrischen Daten der

⁸ Geburtsgewicht in Gramm, multipliziert mit 100, dividiert durch die Körperlänge in cm³

Neugeborenen atopischer Mütter der PAULINA-Studie bereits einen Hinweis auf die zukünftige Atopieentwicklung der Neugeborenen geben könnten, wird die Follow-up-Studie von PAULINA überprüfen.

Methoden der Studiendurchführung: Die Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen wurde von Gynäkologen der Universitäts-Frauenklinik der LMU, München-Innenstadt durchgeführt. Diese „Fremd“-Rekrutierung hatte den Vorteil, dass eine Art „blinde“ Rekrutierung der Studienteilnehmer stattfand, ohne Einfluss von Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe der PAULINA-Studie. Von Oktober 2004 bis Februar 2007 konnten 161 Studienteilnehmerinnen rekrutiert werden.

Das venöse Nabelschnurblut sowie das venöse Blut der Mütter wurden frisch verarbeitet. Es wurde ein Grenzwert von maximal 24 Stunden zur Verarbeitung eingehalten.

Eine regelmäßige Verarbeitung von Nabelschnurblut- und Serumproben der Mütter war geplant. Aufgrund der dreimonatigen Rotation der Ärzte in der Geburtsklinik, die die Probanden rekrutierten, schwankte die erhaltene Probenanzahl pro Quartal zum Teil erheblich. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Das Untersuchungskollektiv der PAULINA-Studie entspricht nicht exakt der deutschen Gesamtbevölkerung: Zum einen lag das durchschnittliche Alter der werdenden Mütter mit 33 Jahren über dem Durchschnitt von 2007, das laut Statistischem Bundesamt Deutschland bei 30,2 Jahren lag [75], zum anderen war der durchschnittliche Ausbildungsgrad der Mütter sehr hoch. 80,51% der Frauen hatten Abitur bzw. Fachabitur oder waren Universitäts- bzw. Fachhochschulabsolventinnen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte zum einen sein, dass die Probandinnen durch ihr durchschnittlich höheres Alter als Risikoschwangere in der Universitätsfrauenklinik München entbinden. Zum anderen könnte der durchschnittlich hohe Bildungsstand selbst ein Grund für die Wahl einer Universitätsklinik sein.

Während der Schwangerschaft rauchten 5,9% der teilnehmenden Mütter, im deutschen Durchschnitt waren es im Jahr 2005 12,4% [113].

Die Atopieprävalenz der Mütter lag mit mehr als 40% über dem deutschen Durchschnitt, der bei zirka 30% liegt [114], [115]. Dies könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, dass allergische Mütter größeres Interesse an einer Studienteilnahme hatten.

Das untersuchte Kollektiv der PAULINA-Studie repräsentiert somit nicht exakt die deutsche Gesamtbevölkerung. Jedoch stellt dies nur eine geringe Limitation der Studie dar: Im internationalen Vergleich gestaltete sich die Rekrutierung und die resultierende Population ähnlich.

Zur Datenerhebung wurde bei der PAULINA-Studie ein standardisierter (ISAAC-adaptierter) Fragebogen verwendet. Dieser Fragebogen gewährleistete die Ermittlung der epidemiologischen Daten der Probandinnen und somit die Einhaltung der vor Studienbeginn festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien. Außerdem konnten die teilnehmenden Mütter die Frage nach der Arztdiagnose einer atopischen Erkrankung beantworten und so ihr atopischer Status festgestellt werden.

Die Arztdiagnose bezüglich Atopie der Väter wurde mittels Fragen an die Mütter durchgeführt und ist somit als Fremdanamnese zu werten.

Charakteristika des Immunsystems: Atopische Mütter unterschieden sich bezüglich Gesamt-IgE-Wert ($p < 0,0001$) und allergen-spezifischen Serum-IgE mittels RAST ($p < 0,001$) signifikant von gesunden Müttern. Die höheren Werte bestätigten den mittels Fragebogen ermittelten atopischen Status der Mütter mit Arztdiagnose eines Asthma bronchiale und/oder einer allergischen Rhinokonjunktivitis und/oder eines atopischen Ekzems.

Allergen-spezifisches IgE im Nabelschnurblut konnte nur in wenigen Vorstudien nachgewiesen werden und brachte keine eindeutigen Ergebnisse [116], [117], [118], [66], [119], [120], weshalb die IgE-Messung im Nabelschnurblut bei der PAULINA-Studie nicht durchgeführt wird.

Um in der PAULINA-Studie eine Kontamination des Nabelschnurblutes durch mütterliches Blut feststellen zu können, wurden CBMCs mit Tetanustoxoid inkubiert. Ein Anstieg der Proliferation nach Stimulation setzt einen Erstkontakt der Zellen mit dem Antigen (Tetanustoxoid) voraus. Diese Antigensensibilisierung ist durch Impfung mit dem Antigen in der Regel bei den Müttern bereits erfolgt. Da es zu keinem Anstieg der Lymphozytenproliferation (Daten nicht gezeigt) kam, fand sich kein objektiver Hinweis auf eine Kontamination des Nabelschnurblutes mit mütterlichem Blut. Zudem wurde eine FISH-Analyse durchgeführt (Daten nicht gezeigt), die ebenfalls eine Kontamination des Nabelschnurblutes durch mütterliches Blut ausschließt.

Stärken und Schwächen der PAULINA-Studie: Zu den Stärken der prospektiven Geburtskohorten-Studie PAULINA zählen zum einen die konsequente und strenge Einhaltung der Ein- und Ausschlusskriterien wodurch von 161 Rekrutierten lediglich 118 Mütter und ihre Neugeborenen eingeschlossen werden konnten. Zum anderen kann sie mit 118 Probandinnen eine große Studienpopulation aufweisen. Des Weiteren wurden die epidemiologischen Daten der Teilnehmerinnen mittels Fragebogen und Patientenakten sehr ausführlich erhoben. Zusätzliche Stärken stellen die direkte Verarbeitung (innerhalb 24 Stunden) des frischen Nabelschnurblutes und die Testung mehrerer Zytokine, der Lymphoproliferation und Lymphozytensubtypen als Parameter der Immunregulation des frühen Immunsystems im Nabelschnurblut dar. Darüber hinaus ist bei der PAULINA-Studie eine Verlaufsuntersuchung der Kinder (Follow-up) möglich.

Bei der PAULINA-Studie gibt es einige Einschränkungen. Es wurden CBMCs von Müttern mit heterogenem Phänotyp untersucht. Mütterliche Atopie wurde bei der PAULINA-Studie als Arzt diagnose einer oder mehrerer der folgenden Krankheiten definiert: allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale und atopisches Ekzem. Diese drei Krankheiten sind jedoch möglicherweise von unterschiedlichem immunologischem Ursprung. Aufgrund der zum Teil geringen Anzahl in den drei Untergruppen der mütterlichen Atopie war eine weitere Subgruppenanalyse nicht durchführbar. Zu diesem Zweck sollte in weiteren Studien eine noch größere Studienpopulation untersucht werden.

6. AUSBLICK

Um die Relevanz des Einflusses des Atopiestatus der Mutter auf die Allergieentwicklung ihrer Nachkommenschaft im Kindesalter überprüfen zu können, ist eine Nachuntersuchung der PAULINA-Population im Verlauf notwendig. Diese wird die atopische Entwicklung der rekrutierten Neugeborenen verfolgen. So wird weiterhin ein Vergleich des atopischen Phänotyps im Kleinkindalter mit dem zellulären und Zytokinmuster zum Zeitpunkt der Geburt möglich sein. Die ersten Kinder der PAULINA-Studie sind inzwischen 3 Jahre alt und eine Befragung der ersten 88 von 118 Eltern bezüglich des Atopiestatus ihrer Kinder ist bereits erfolgt. Die epidemiologischen Daten werden derzeit ausgewertet.

Eine erneute Blutentnahme und Testungen im Kleinkindalter⁹ könnten zusätzliche Erkenntnisse über die Reifung des Immunsystems bringen und einen Zusammenhang mit dem Atopiestatus der Mutter und/oder ihres Kindes herstellen.

Eine Messung der regulatorischen T-Zellen sowie der Th1- und Th2-Zytokine und Interleukin-10 im Blut der Mütter könnte speziell nach Endotoxinstimulation ebenfalls neue Erkenntnisse bringen. Hier stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen dem zellulären Muster von Mutter und Kind zum Zeitpunkt der Geburt und im Kleinkindalter.

Die Messung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie könnte durch die von Toll-like Rezeptoren ergänzt werden. Es steht zur Diskussion, dass die TLR4-Expression bzw. -Funktion bei atopischen Individuen oder bei Risikopatienten vermindert ist und folglich ein Wechsel aus der angeborenen Th2-Umgebung in die schützende Th1-Richtung durch mikrobielle Stimulation nicht möglich ist.

Die Genese atopischer Erkrankungen ist ein multifaktorielles Geschehen. Bei Zwillingsstudien wurde eine größere Prävalenz an atopischen Erkrankungen bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingen festgestellt [121]. Die genetische Forschung nimmt somit einen nicht unerheblichen Anteil bei der Suche nach den Ursachen der Atopie ein und wird auch aktuell in Studien untersucht.

⁹ nach Genehmigung durch die bayerische Ethikkommission

Um möglichst große Studienpopulationen und auch regionale Unterschiede untersuchen zu können, sind multizentrische internationale Studien erforderlich, wie zum Beispiel die ISAAC [2], LISA [122], MAS [123] PARSIFAL [124], PASTURE [125] oder EFRAIM [126] Studiengruppe. An der Durchführung der PASTURE- sowie der EFRAIM-Studie ist auch die Arbeitsgruppe der PAULINA-Studie beteiligt. Diese multizentrischen Studien bieten den enormen Vorteil, dass in kürzester Zeit eine weitaus größere Menge an Probanden rekrutiert und untersucht werden können. Nachteilig wirkt sich hierbei sicherlich die Tatsache aus, dass die Studienpopulationen aufgrund regionaler Unterschiede der Umwelt etc. eine höhere Heterogenität aufweisen. Bei derartigen Zusammenschlüssen von verschiedenen Studienzentren ist auch eine exakte Einhaltung und regelmäßige Kontrolle der Studienprotokolle und ihrer Durchführung in den einzelnen Zentren essentiell. Geschieht dies nicht oder nur unzureichend ist zusätzlich mit einer Heterogenität der Studienergebnisse aufgrund unterschiedlicher Ausführung der Studien und der Laboruntersuchungen zu rechnen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der westlichen Welt war in den letzten Jahren eine ansteigende Prävalenz atopischer Erkrankungen im Kindesalter zu beobachten. Ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen (Th2-vermittelt) bei Kindern ist die Atopie der Mutter.

Mikrobielle Exposition im ersten Lebensjahr oder sogar bereits intrauterin wiederum soll über Stimulation des angeborenen Toll-like-Rezeptor-Systems einen protektiven Effekt auf die zukünftige Allergieentwicklung haben. Offenbar wirkt sich diese frühe Stimulation des angeborenen Immunsystems insbesondere auf das Gleichgewicht zwischen allergie-protektiven Th1-Zellen und allergie-begünstigenden Th2-Zellen vorteilhaft aus. [41], [127]

Ziel dieser Arbeit, die im Rahmen der prospektiven Geburtskohortenstudie PAULINA durchgeführt wurde, war es, zum einen den Einfluss der Atopie der Mütter und zum anderen den Einfluss mikrobieller Stimulation auf das Immunsystem ihrer Kinder im Nabelschnurblut zu untersuchen.

Aus der Frauenklinik Maistraße der LMU München wurden (im Zeitraum von Oktober 2004 bis Februar 2007) 161 Mütter und ihre gesunden Neugeborenen nach termingerechter unkomplizierter Geburt rekrutiert. Von diesen wurden 118 Mütter und ihre Neugeborenen (nach Einhaltung der Ausschlusskriterien, u.a. Infektionszeichen der Neugeborenen) in die Studie eingeschlossen. Die epidemiologischen Daten der Mütter und ihrer Kinder wurden über einen Fragebogen (ISAAC-adaptiert) und aus Krankenhausakten ermittelt.

Eine positive Atopieanamnese der Mutter war signifikant mit der niedrigeren Anzahl an aktivierten T-Zellen ($CD4^+CD25^+$) ($p=0,03$) im naiven Nabelschnurblut und mit der niedrigeren Anzahl an regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^{hoch}$) ($p=0,005$) sowie mit der erniedrigten Sekretion von Interferon- γ (Th1-Zytokin) ($p=0,04$) und Interleukin-10 ($p=0,05$) im endotoxinstimulierten¹⁰ Nabelschnurblut assoziiert.

Die erniedrigte Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Nabelschnurblut atopischer Mütter weist auf eine kritische Rolle dieser T-Zellsubpopulation bei der Modulation der Immunantworten im frühen Kindesalter unter Einbeziehung der mütterlichen Atopie hin.

¹⁰ Lipid A als Stimulus

Das intrauterine Milieu scheint also bereits einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung des frühen kindlichen Immunsystems zu nehmen.

Die zusätzlich signifikant geringere Sekretion von Interleukin-10 und des Th1-Zytokins Interferon- γ nach mikrobieller Stimulation im Nabelschnurblut atopischer Mütter könnte darüber hinaus als Hinweis darauf gewertet werden, dass atopisch prädisponierte Neugeborene ein „unreiferes“ Immunsystem haben als Neugeborene von nicht atopischen Müttern und so das erhöhte Atopierisiko dieser Neugeborenen widerspiegeln.

Die Gruppe der atopischen und der nicht atopischen Mütter und ihrer Kinder unterscheiden sich in folgenden epidemiologischen Charakteristika: Neugeborene mit hohem Atopierisiko (durch Atopie der Mutter) waren durchschnittlich schwerer, größer und hatten einen größeren Kopfumfang als Neugeborene mit niedrigem Atopierisiko ($p=0,008/0,02/0,02$). Zudem fand sich eine positive Korrelation zwischen atopischen Müttern und atopischen Vätern ($p=0,027$). Die anthropometrischen Daten der Neugeborenen und die väterliche Atopie hatten jedoch keinen Einfluss auf die immunologischen Charakteristika und nach Adjustierung für diese beiden möglichen Störfaktoren (Confounders) zeigte sich keine signifikante Änderung der Ergebnisse.

Im Follow-up der PAULINA-Studie wird die Entwicklung des atopischen Phänotyps der Kinder derzeit untersucht und so erfasst, ob die Immunregulation im Nabelschnurblut bereits prädiktive Aussagen für eine spätere Allergieentwicklung ermöglicht.

8. ANHANG

1. Abkürzungen und Begriffserläuterungen

| | |
|---------------|---|
| A | Gruppe atopischer Mütter und deren Neugeborene |
| APGAR | <u>A</u> tmung, <u>P</u> uls, <u>G</u> rundtonus, <u>A</u> ussehen, <u>R</u> eflexe |
| APZ | Antigen präsentierende Zellen |
| CBMCs | Cord blood mononuclear cells/ Mononukleäre Zellen im Nabelschnurblut |
| CD | Cluster of differentiation/ Oberflächenantigene von Leukozyten |
| Cpm | Counts per minute |
| CTG | Cardiotokogramm |
| DZ | Dendritische Zelle |
| FACS | Flourescens activated cell sorting |
| FCS | Fetal calf serum (Fetales Kälberserum) |
| FISH | Fluoreszenz in situ-Hybridisierung |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| Foxp3 | Forkhead box transcription factor 3 |
| GM-CSF | Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktor |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IgE | Immunglobulin E |
| IL | Interleukin |
| IQR | Interquartilerange; Interquartilbereich |
| ISAAC | International Study of Asthma and Allergies in Childhood |
| LISA | Life-style - Immune system – Allergy |
| LpA | Lipid A |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MAS | The German multicenter atopy study |
| M | Media (unstimuliert) |

| | |
|----------------------------|--|
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| μl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| mRNA | <u>M</u> essenger <u>R</u> ibonukleinsäure/ <u>-a</u> cid |
| N | Anzahl |
| NA | Gruppe nicht-atopischer Mütter und deren Neugeborene |
| PARSIFAL | Prevention of Allergy – Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposophic Lifestyle |
| PASTURE | The Protection against Allergy-Study in Rural Environments Study |
| PAULINA | Paediatric Alliance for Unselected Longitudinal Investigation of Neonates for Allergies |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells; Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PC5 | Phycoerythrin cyanin 5.1 |
| PDA | Periduralanästhesie |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Pg | Pikogramm |
| PHA | Phytohämagglutinin (Mitogen) |
| Ponderal-Index | Geburtsgewicht in Gramm, multipliziert mit 100, dividiert durch die Körperlänge in cm ³ |
| Prävalenz einer Erkrankung | Anteil einer Population in Prozent, die zu einem bestimmten Zeitpunkt erkrankt ist |
| RAST | Radio allergen sorbent Test |
| Rcf | „Relative centrifugal force“ in g |
| RNA | Ribonukleinsäure/-acid |
| RPE-Cy5 | R-Phycoerythrin-Cyanin 5 |

| | |
|-------------------|--|
| Rpm | Revolutions per minute |
| RPMI | Zellkulturmedium für Leukozyten (vom <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitut entwickelt) |
| SEM | Standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes |
| SS | Schwangerschaft |
| Streptavidin-PE | Streptavidin-Phycoerythrin |
| TGF- β | Transforming Growth Factor- β |
| Th-Zellen | T-Helfer-Zellen |
| Th0 | T-Helfer-Zellen vom Typ 0 |
| Th1 | T-Helfer-Zellen vom Typ 1 |
| Th2 | T-Helfer-Zellen vom Typ 2 |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| T-Lymphozyten | Thymus-Lymphozyten |
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor- α |
| T _{regs} | Regulatorische T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ^{hoch} /CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺) |
| Tween | Polyaethylenglykolsorbitanmonolaurat |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |

2. Kriterien zur Studienteilnahme

2.1 Einschlusskriterium

Mütter mit unkomplizierter termingerechter Geburt

2.2 Ausschlusskriterien Mutter

- Schwere Erkrankungen der Mutter, insbesondere Autoimmunerkrankungen
- Infektionen/Antibiotika-Therapie im letzten Trimenon der Schwangerschaft oder während der Geburt
- Komplikationen während der Geburt
- Fieber unter der Geburt
- Erhöhtes CrP der Mutter ($>0,5\text{mg/dl}$)
- Hepatitis

2.3 Ausschlusskriterien Kind

- Antibiotikatherapie
- Intensivstation nach Geburt

3. Einverständniserklärung der PAULINA-Studie

EINVERSTÄNDNIS Zur Nabelschnurblutstudie PAULINA

„Das Immunsystem des Neugeborenen: Charakterisierung des Phänotyps und Funktion von Nabelschnurblut im Rahmen von Endotoxinstimulation“

Vor und Nachname der Mutter:

Name des Kindes:

(wenn bereits bekannt mit Vorname, sonst Nachname)

Anschrift:

.....

.....

Telefon:

Hiermit erkläre ich/wir mein/unser Einverständnis, an der Studie teilzunehmen. Ich/Wir wurde/n über das Projekt und die Risiken der Teilnahme informiert. Ich/wir bin/sind damit einverstanden, dass bei der Mutter bei der Routineblutabnahme Blut für eine Allergietestung und aus dem Nabelschnurblut nach Entbindung ca. 20-30 ml Blut entnommen werden. Zudem sind wir einverstanden, dass für evtl. spätere Untersuchungen DNA von Mutter und Nabelschnurblut eingefroren wird.

Ich/Wir kann/können diese Einverständniserklärung jederzeit ohne jegliche Folgen widerrufen.

Das Informationsblatt habe ich/wir gelesen und ich/wir hatte/n ausreichend Zeit, diese Entscheidung zu überlegen. Alle meine/unsere Fragen wurden beantwortet. Eine Kopie des Informationsblattes und der Einverständniserklärung habe ich/wir erhalten.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift der Mutter

4. Fragebogen der PAULINA-Studie

Kinderklinik und Poliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Datum: _____

Studiennummer: _____

Nabelschnurblutstudie PAULINA, Fragebogen für die Mutter

Wir freuen uns, dass Sie an unserer Nabelschnurblutstudie teilnehmen. Bitte kreuzen Sie die folgenden Fragen an. Ihre Antworten werden vertraulich behandelt. Wenn Sie eine Frage nicht beantworten möchten, lassen Sie sie bitte aus.

1. Sind Sie in Deutschland geboren?

Ja

Nein, ich bin in _____ geboren.

2. Welche Staatsangehörigkeit haben Sie?

3. Welche Staatsangehörigkeit hat der Vater des Kindes?

4. Welche Schulausbildung haben Sie abgeschlossen?

Hauptschule

Realschule

Gymnasium

Universität

Andere: bitte angeben: _____

5. Hat ein Arzt jemals eine der folgenden Erkrankungen bei Ihnen diagnostiziert?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes, rheumatoide Arthritis.

Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche _____

Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)

Weitere: _____

Nein

6. Waren Sie während der Schwangerschaft an einer der folgenden Erkrankungen erkrankt?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes, rheumatoide Arthritis.

Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche: _____

Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)

Weitere: _____

Nein

7. Haben Sie dafür Medikamente eingenommen?

Ja, ich habe _____/Tag eingenommen.

Nein

8. Haben Sie während der Schwangerschaft Medikamente eingenommen?

Ja, ich habe _____/Tag von der _____SSW

(Schwangerschaftswoche) bis zur _____SSW eingenommen.

Nein

9. Hat ein Arzt bei dem Vater des Kindes jemals eine der folgenden Erkrankungen diagnostiziert?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Nein

10. Leidet er aktuell an einer der folgenden Erkrankungen?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Nein

11. Nimmt er dafür derzeit Medikamente ein?

Ja, er nimmt _____

Nein

12. Welche der folgenden Beschreibungen trifft für Sie am ehesten zu?

Ich habe niemals Zigaretten geraucht.

Ich habe früher Zigaretten geraucht, und vor Beginn der Schwangerschaft aufgehört.

Ich habe aufgehört zu rauchen, seit ich weiß, dass ich schwanger bin.

Ich rauche derzeit durchschnittlich _____Zigaretten/Tag.

13. Ist dies Ihre erste Schwangerschaft?

Ja

Nein, ich habe bereits _____Kinder.

14. Haben Sie jemals eine Fehlgeburt während einer vorangegangenen Schwangerschaft gehabt?

Ja, in der _____Schwangerschaftswoche.

Nein

Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

Studienleitung:

Prof. Dr. med. Erika von Mutius

Studienärztin:

Dr. med. Bianca Schaub

(Tel: 5160-7856)

Vielen herzlichen Dank für Ihre Zeit den Fragebogen auszufüllen!

5. Epidemiologische Daten aus dem Klinikum der Maistraße

5.1 Mutter

- atopische Erkrankungen
- medizinische und soziale Anamnese
- Schwangerschaftsverlauf
- Besonderheiten

5.2 Geburt

- Entbindungsmodus
- PDA
- Geburtsdauer
- Blasensprung, vorzeitiger Blasensprung
- Besonderheiten

5.3 Neugeborenes

- Gestationsalter
- Geburtstag und –zeit
- Geschlecht
- Nabelschnurblut-pH-Wert
- Apgar
- Geburtsgewicht, Länge, Kopfumfang des Kindes
- Besonderheiten

6. Gesamt-IgE

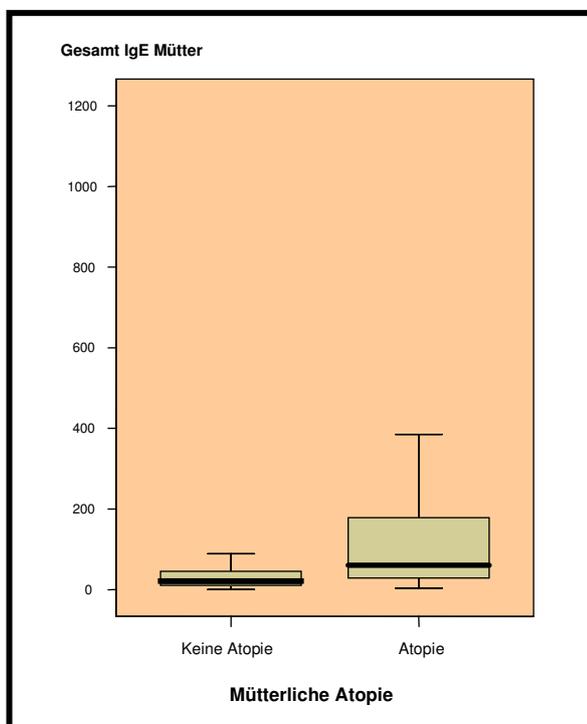


Abbildung 28: Median Gesamt-IgE im Gruppenvergleich ($p < 0,0001$)¹¹

¹¹ Abbildung ohne Ausreißer

7. Spezifisches IgE

| | | | | | | | |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Allergene | D1 | D2 | K82 | T3 | T4 | Gx | G6 |
| p-Wert (U-Test) | 0,001 | 0,005 | 0,231 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Allergene | W6 | W9 | E1 | E3 | E5 | M6 | F1 |
| p-Wert (U-Test) | 0,012 | 0,031 | 0,104 | 0,796 | 0,919 | 0,001 | 0,362 |
| Allergene | F2 | F13 | F17 | F31 | F4 | F14 | |
| p-Wert (U-Test) | 0,358 | 0,231 | 0,015 | 0,006 | 0,015 | 0,231 | |

Tabelle : spezifisches IgE >0,7 IU/ml Mütter

| Abkürzung | Allergen |
|------------------|----------------------|
| D1 | Derm.Pteronyssinus |
| D2 | Derm. Farinae |
| K82 | Latex |
| T3 | Birkenproteine |
| T4 | Haselnusspollen |
| Gx | Graspollenmischung |
| G6 | Lieschgrasproteine |
| W6 | Beifußproteine |
| W9 | Wegerich |
| E1 | Katzenproteine |
| E3 | Pferdeschuppen |
| E5 | Hundeschuppen/Haare |
| M6 | Alternaria alternata |
| F1 | Eiklar |
| F2 | Milchproteine |
| F13 | Erdnuss |
| F17 | Haselnuss |
| F31 | Karotte |
| F4 | Weizenmehl |
| F14 | Sojabohne |

Tabelle : Abkürzungen getesteter Allergene für spezifisches IgE

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Wahn, U., et al., *Pädiatrische Allergologie und Immunologie* 4ed. 2005: Elsevier GmbH, Urban&Fischer.
2. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. *Lancet*, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
3. Ait-Khaled, N., et al., *Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three*. *Allergy*, 2009. **64**(1): p. 123-48.
4. van den Akker-van Marle, M.E., J. Bruil, and S.B. Detmar, *Evaluation of cost of disease: assessing the burden to society of asthma in children in the European Union*. *Allergy*, 2005. **60**(2): p. 140-9.
5. Gell, P. and R. Coombs, *Clinical Aspects of Immunology*. 4 classes of hypersensitivity reactions. 1963: 1st ed. Oxford, England: Blackwell.
6. Chaplin, D.D., *I. Overview of the human immune response*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-5.
7. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
8. Cherwinski, H.M., et al., *Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies*. *J Exp Med*, 1987. **166**(5): p. 1229-44.
9. Mosmann, T.R., et al., *T helper cytokine patterns: defined subsets, random expression, and external modulation*. *Immunol Res*, 2009.
10. Martinez, F.D. and P.G. Holt, *Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma*. *Lancet*, 1999. **354 Suppl 2**: p. SII12-5.
11. Macaubas, C., et al., *Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years*. *Lancet*, 2003. **362**(9391): p.1192-7.
12. Prescott, S.L., et al., *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children*. *Lancet*, 1999. **353**(9148): p. 196-200.
13. Romagnani, S., *The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?* *Immunology*, 2004. **112**(3): p. 352-63.
14. Novak, N. and T. Bieber, *Allergic and nonallergic forms of atopic diseases*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(2): p. 252-62.
15. Lee, S.M., et al., *The regulation and biological activity of interleukin 12*. *Leuk Lymphoma*, 1998. **29**(5-6): p. 427-38.
16. Borish, L. and L. Rosenwasser, *TH1/TH2 lymphocytes: doubt some more*. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. **99**(2): p. 161-4.
17. Nilsson, C., et al., *Low numbers of interleukin-12-producing cord blood mononuclear cells and immunoglobulin E sensitization in early childhood*. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(3): p. 373-80.
18. Eder, W. and E. von Mutius, *Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?* *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2004. **4**(2): p. 113-7.
19. Ngoc, P.L., et al., *Cytokines, allergy, and asthma*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005. **5**(2): p. 161-6.

20. Taylor A., V.J., Blaser K., Akdis M., Akdis CA., *Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells* Immunology, 2006. **117**(4): p. 433-42.
21. Larche, M., *Regulatory T cells in allergy and asthma*. Chest, 2007. **132**(3): p.1007-14.
22. Ng, W.F., *Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells*. Blood, 2001. **98**(Immunobiology): p. 2736-2744.
23. Ling, E.M., et al., *Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease*. Lancet, 2004. **363**(9409): p. 608-15.
24. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nature Immunology, 2005. **6**(4): p. 345-352.
25. Hori, S., *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**: p. 1057–1061.
26. Khattri, R., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat. Immunol. , 2003. **4**: p. 337–342
27. Fontenot, J.D., *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat. Immunol. , 2003. **4**: p. 330–336.
28. Foley, S.C., et al., *Images in allergy and immunology: regulatory T cells in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 482-6.
29. Saito, S., Y. Sasaki, and M. Sakai, *CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy*. J Reprod Immunol, 2005. **65**(2): p. 111-20.
30. Sakaguchi, S., *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance*. Immunological Reviews, 2001. **182**: p. 18–32.
31. Bellinghausen, I., et al., *Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(4): p. 862-8.
32. Bjorksten, B., *Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases*. Allergy, 1994. **49**(6): p. 400-7.
33. Tariq, S.M., et al., *The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(5): p. 587-93.
34. Cogswell, J.J., *Influence of maternal atopy on atopy in the offspring*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(1): p. 1-3.
35. Gabrielsson, S., et al., *Influence of atopic heredity on IL-4-, IL-12- and IFN-gamma-producing cells in vitro activated cord blood mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(3): p. 390-6.
36. Amoudruz, P., et al., *Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy?* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(6): p. 1304-10.
37. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. Science, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
38. Braun-Fahrlander, C., *Epidemiologie, Hygiene, Bauernkinder, Endoxine*. http://www.ria.insel.ch/fileadmin/ria/ria_users/Pdf/Pdf-allergologie/02_Braun-Fahrlander.pdf, 2002.
39. Von Ehrenstein, O.S., et al., *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 187-93.
40. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.

41. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.
42. Holla, A.D., S.R. Roy, and A.H. Liu, *Endotoxin, atopy and asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2002. **2**(2): p. 141-5.
43. Tse, K. and A.A. Horner, *Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis and prevention of allergic diseases*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(1): p. 53-62.
44. Fleming, D.M. and D.L. Crombie, *Prevalence of asthma and hay fever in England and Wales*. Br Med J (Clin Res Ed), 1987. **294**(6567): p. 279-83.
45. Taylor, B., et al., *Changes in the reported prevalence of childhood eczema since the 1939-45 war*. Lancet, 1984. **2**(8414): p. 1255-7.
46. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. Bmj, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
47. Bloomfield, S.F., et al., *Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(4): p. 402-25.
48. Bilak, H., S. Tauszig-Delamasure, and J.L. Imler, *Toll and Toll-like receptors in Drosophila*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 3): p. 648-51.
49. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
50. Takeda, K. and S. Akira, *Roles of Toll-like receptors in innate immune responses*. Genes Cells, 2001. **6**(9): p. 733-42.
51. Albiger, B., et al., *Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors*. J Intern Med, 2007. **261**(6): p. 511-28.
52. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
53. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
54. Tulic, M.K., et al., *Role of toll-like receptor 4 in protection by bacterial lipopolysaccharide in the nasal mucosa of atopic children but not adults*. Lancet, 2004. **363**(9422): p. 1689-97.
55. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
56. Beutler, B., *Genetic and Physical Mapping of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region*. Blood cells, molecules and diseases, 1998. **240**(170): p. 340-355.
57. Heumann, D. and T. Roger, *Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria*. Clin Chim Acta, 2002. **323**(1-2): p. 59-72.
58. Uematsu, S. and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity*. J Mol Med, 2006. **84**(9): p. 712-25.
59. Arbour, N.C., et al., *TLR4 mutations are associated with Endotoxin hyporesponsiveness in humans*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 187-91.
60. Velasco, G., et al., *Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(3): p. 218-24.
61. Caramalho, I., et al., *Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 403-11.
62. Zhang, Q., et al., *Expression of surface markers on peripheral CD4+CD25high T cells in patients with atopic asthma: role of inhaled corticosteroid*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(3): p. 205-12.

63. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
64. 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, 2000. **355**(9216): p. 1680-3.
65. Holt, P.G., C. McMenamin, and D. Nelson, *Primary sensitisation to inhalant allergens during infancy*. Pediatr. Allergy Immunol., 1990. **1**:3.
66. van der Velden, V.H., et al., *Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(7): p. 997-1006.
67. 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, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
68. Douwes, J., et al., *Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema*. Eur Respir J, 2008. **32**(3): p. 603-11.
69. Ege MJ., B.C., Frei R., van Strien RT., Riedler J., Ublagger E., Schram-Bijerk D., Brunekreef B., van Hage M., Scheynius A., Pershagen G., Benz MR., Lauener R., von Mutius E., Braun-Fahrlander C., Parsifal Study team, *Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 817-23.
70. Roche, *Medizinlexikon*. 4.Auflage ed. 1998: Hoffmann-La Roche AG und Urban & Schwarzenberg.
71. Heinrich J., R.K., Frye C., Meyer I., Wölke G., Wjst M., Nowak D., Magnussen H., Wichmann H.-E., *Die Europäische Studie zu Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen (ECRHS)*. . Pneumologie, 2002. **56**: p. 297-303.
72. Burney, P., et al., *The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(3): p. 314-22.
73. Biorad, *Bio-Plex Cytokine Assay; Instructionmanual; Section 2: Principle*.
74. Biorad.com, *Bulletin_2902*.
75. Statistisches Bundesamt, D., *Durchschnittliches Alter der Mütter bei der Geburt ihrer lebendgeborenen Kinder in Deutschland*.
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Bevoelkerung/GeburtenSterbefaelle/Tabellen/Content75/GeburtenMutteralter,templateId=renderPrint.psml>, 2007.
76. Lee, J.H., et al., *The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma*. Clin Exp Immunol, 2007. **148**(1): p. 53-63.
77. Lin, Y.L., C.C. Shieh, and J.Y. Wang, *The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNFalpha modulation*. Allergy, 2008. **63**(1): p. 67-74.
78. Hartl, D., et al., *Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1258-66.
79. Smith, M., et al., *Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)/CD25(+)/CD127(lo/-) regulatory T cell function*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(6): p. 1460-6, 1466 e1-7.

80. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p.1701-11.
81. Jartti, T., et al., *Association between CD4(+)CD25(high) T cells and atopy in children*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 177-83.
82. Haddeland, U., et al., *Putative regulatory T cells are impaired in cord blood from neonates with hereditary allergy risk*. Pediatr Allergy Immunol, 2005. **16**(2): p. 104-12.
83. Rojo JM, B.R., Portolés P, *T-cell receptor*. Advances in experimental medicine and biology, 2008. **640**: p. 1-11.
84. Shi, H.Z., et al., *Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma*. Clin Immunol, 2004. **113**(2): p. 172-8.
85. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
86. Rinas, U., G. Horneff, and V. Wahn, *Interferon-gamma production by cordblood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE-levels*. Pediatr Allergy Immunol, 1993. **4**(2): p. 60-4.
87. Warner, J.A., et al., *Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema?* Clin Exp Allergy, 1994. **24**(5): p. 423-30.
88. Tang, M.L., et al., *Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy*. Lancet, 1994. **344**(8928): p. 983-5.
89. Kondo, N., et al., *Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(11): p. 1340-4.
90. Wright, A.L., *The epidemiology of the atopic child: who is at risk for what?* J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(1 Suppl): p. S2-7.
91. Spinozzi, F., et al., *CD4+IL13+ T lymphocytes at birth and the development of wheezing and/or asthma during the 1st year of life*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **124**(4): p. 497-501.
92. Lange, J., et al., *High interleukin-13 production by phytohaemagglutinin- and Der p 1-stimulated cord blood mononuclear cells is associated with the subsequent development of atopic dermatitis at the age of 3 years*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(11): p. 1537-43.
93. Schnurr, M., et al., *Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4704-9.
94. Martinez-Moczygemba M., H.D., *Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(4): p.653-65.
95. Ferreira, M., *Cytokine expression in allergic inflammation: systematic review of in vivo challenge studies*. Mediators of inflammation, 2003. **12**(5): p. 259-67.
96. Kopp, M.V., et al., *Culture conditions for the detection of allergen-specific Tcell reactivity in cord blood: influence of cell number*. Pediatr Allergy Immunol, 2000. **11**(1): p. 4-11.
97. Kopp, M.V., et al., *Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(10): p.1536-43.

98. Miller, R.L., et al., *Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(6): p. 995-1001.
99. Willwerth, B.M., et al., *Prenatal, perinatal, and heritable influences on cord blood immune responses*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2006. **96**(3): p. 445-53.
100. Kondo, N., et al., *Cord blood lymphocyte responses to food antigens for the prediction of allergic disorders*. Arch Dis Child, 1992. **67**(8): p. 1003-7.
101. Van Duren-Schmidt, K., et al., *Prenatal contact with inhalant allergens*. Pediatr Res, 1997. **41**(1): p. 128-31.
102. Szepefalusi, Z., et al., *Prenatal allergen contact with milk proteins*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(1): p. 28-35.
103. Miles, E.A., et al., *Peripheral blood mononuclear cell proliferative responses in the first year of life in babies born to allergic parents*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(7): p. 780-8.
104. Devereux, G., R.N. Barker, and A. Seaton, *Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(1): p. 43-50.
105. Devereux, G. and R.N. Barker, *Studies of cord blood mononuclear cell responses and allergy: still in their infancy?* Clin Exp Allergy, 2002. **32**(3): p.331-4.
106. Aniansson Zdolsek, H., et al., *Reduced IL-2-induced IL-12 responsiveness in atopic children*. Pediatr Allergy Immunol, 2003. **14**(5): p. 351-7.
107. Schaub, B. and E. von Mutius, *Obesity and asthma, what are the links?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(2): p. 185-93.
108. Xu, B., M.R. Jarvelin, and J. Pekkanen, *Body build and atopy*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(2 Pt 1): p. 393-4.
109. Xu, B., et al., *Body build from birth to adulthood and risk of asthma*. Eur J Public Health, 2002. **12**(3): p. 166-70.
110. Gregory, A., et al., *The relationship between anthropometric measurements at birth: asthma and atopy in childhood*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(3): p. 330-3.
111. Fergusson, D.M., et al., *Perinatal factors and atopic disease in childhood*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(12): p. 1394-401.
112. Katz, K.A., S.J. Pocock, and D.P. Strachan, *Neonatal head circumference, neonatal weight, and risk of hayfever, asthma and eczema in a large cohort of adolescents from Sheffield, England*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(6): p. 737-45.
113. Schneider, S., et al., *Who smokes during pregnancy? An analysis of the German Perinatal Quality Survey 2005*. Public Health, 2008. **122**(11): p. 1210-6.
114. Bundesministerium für Ernährung, L.u.V. *Allergien: Besser schützen. Wirksam vorbeugen*. in *Verbraucherpolitische Konferenz des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz*. 2007.
115. Dr Dürr, I., *Allergiediagnostik bei Kindern: Wichtige Befreiungs-Kennziffer für das Laborbudget*, in *Ärztmerkblatt des Deutschen Grünen Kreuzes e.V.* 2001.
116. Hansen, L.G., et al., *Prediction of allergy from family history and cord blood IgE levels. A follow-up at the age of 5 years. Cord blood IgE. IV*. Pediatr Allergy Immunol, 1993. **4**(1): p. 34-40.
117. Eiriksson, T.H., et al., *Cord blood IgE levels are influenced by gestational age but do not predict allergic manifestations in infants*. Pediatr Allergy Immunol, 1994. **5**(1): p. 5-10.
118. Bergmann, R.L., et al., *Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(7): p. 752-60.

119. Pesonen, M., et al., *Cord serum immunoglobulin E as a risk factor for allergic symptoms and sensitization in children and young adults*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009. **20**(1): p. 12-8.
120. Ferguson, A., et al., *Elevated cord blood IgE is associated with recurrent wheeze and atopy at 7 yrs in a high risk cohort*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009.
121. Rosenwasser, L.J., *Genetics of asthma and atopy*. *Toxicol Lett*, 1996. **86**(2-3): p.73-7.
122. Heinrich J., B.G., Hölscher B., Douwes J., Lehmann I., Fahlbusch B., Bischof W., Weiss M., Borte M., Wichmann HE., LISA Study Group, *Allergens and endotoxin on mother´s mattresses and total immunoglobulin E in cord blood of neonates*. *The European respiratory journal*, 2002. **20**(3): p. 617-23.
123. Bergmann R.L., B.K.E., Lau-Schadendorf S., Luck W., Dannemann A., Bauer C.P., Dorsch W., Forster J., Schmidt E., Schulz J., Wahn U., *Atopic diseases in infancy. The German multicenter study (MAS-90)*. *Pediatr Allergy Immunol*, 1994. **5**(S5): p. 19-25.
124. Schram D., D.G., Boeve M., Douwes J., RiedlerJ., Ublagger E., von Mutius E., Budde J., Pershagen G., Nyberg F., Alm J., Braun-Fahrländer C., Waser M., Brunekreef B.; PARSIFAL Study Group, *Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children - the PARSIFAL Study*. *Allergy*, 2005. **60**(5): p. 611-8.
125. von Mutius, E., Schmid S., PASTURE Study Group, *The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe*. *Allergy*, 2006. **61**(4): p. 407-13.
126. <http://www.asthma-allergy.de/research.php>.
127. Bellou, A., et al., *Toll receptors modulate allergic responses: interaction with dendritic cells, T cells and mast cells*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2003. **3**(6): p. 487-94.

10. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

- Allen teilnehmenden Familien der PAULINA-Studie
- Den Mitarbeitern des Kreißsaales der Frauenklinik München, LMU, insbesondere Frau Dr. Christine Sattler für die Rekrutierung der Studienteilnehmer und die Blutentnahmen
- Frau PD Dr. Schaub für die Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit
- Allen Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Schaub, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben
- Frau Prof. Dr. von Mutius und Frau Dr. Illi
- Herr Prof. Dr. Reinhardt und Herr Prof. Dr. Roscher
- Frau Kempa für die Durchführung der Messung des spezifischen-IgE
- Dem Allergielabor der LMU München für die Durchführung der Gesamt-IgE-Messung
- Der Arbeitsgruppe Kabesch für die Nutzung des Luminex-Gerätes
- Der Unterstützung meiner Familie und Freunde