

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Klinische Chemie und Molekularer Diagnostik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin
der
Philipps-Universität Marburg

**Differentielle TH1 / + TH2-Immunantwort von
Neugeborenen aus der Farmerumgebung im
Vergleich zu Nichtfarmern**

Inaugural – Dissertation
(Korrigierte Version im August 2008)
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Jens Erwin Uffelmann
aus Schlüchtern

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
am: 06.März 2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Renz

Koreferent: Prof. Dr. R. Maier

Für Kerstin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite
1.1	Allergische Erkrankungen	1
1.2	Die Immunologie der Allergie	2
1.3	Das TH1 / TH2-Dogma der Allergie	3
1.4	Umweltfaktoren und Allergie	5
1.5	Nabelschnurblut-Cytokine als Prädiktoren für die Allergieentstehung	6
1.6	Pränatale Exposition und Allergie	8
1.7	Die PASTURE-Studie	10
1.8	Cytokine	11
1.9	Zielsetzung	13
1.10	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	
2.1	Materialübersicht	15
2.2	Studienkohorte	15
2.3	Proben	15
2.4	Probenanalyse mittels ELISA-Methode	17
2.5	Statistische Auswertung	18
3.	Ergebnisse	
3.1	Studienkohorte	20
3.2	Farmerkinder haben im Vergleich zu Nicht-Farmerkindern eine erhöhte IFN- γ und TNF- α -Expression im Nabelschnurblut	21
3.3	Der Kontakt zu Stalltieren ist mit hoher Produktion von IFN- γ und TNF- α assoziiert	23
3.4	Hohe IFN- γ und TNF- α -Konzentrationen im Blut Neugeborener, deren Mütter immer in der traditionellen Farmumgebung lebten	27

4.	Diskussion	30
4.1	Cytokine als Marker für eine spätere Allergieentwicklung	30
4.2	Pränatale Beeinflussung der Allergieentwicklung durch die Umwelt (klinische Studien und Maus-Modelle)	32
5.	Zusammenfassung	36
6.	Literaturverzeichnis	37
7.	Materialübersicht	43
8.	Anhang	
8.1	Lebenslauf	46
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	48
8.3	Danksagung	49
8.4	Ehrenwörtliche Erklärung	50

1 Einleitung

1.1 Allergische Erkrankungen

Zu den sogenannten „atopischen“ Erkrankungen zählen Heuschnupfen (allergische Rhinitis), Asthma bronchiale und atopische Dermatitis. Diese drei Krankheitsbilder zeichnen sich immunologisch durch die Produktion spezifischer IgE-Antikörper aus³⁴. Die Symptome unterliegen starken inter-, und intraindividuellen Schwankungen und können von leichten Beschwerden bis zu erheblichen Beeinträchtigungen der Lebensqualität reichen. In den seltenen Fällen eines Status Asthmaticus sind auch Todesfälle beschrieben¹.

Der Entstehungsmechanismus allergischer Erkrankungen ist immer noch unzureichend verstanden. Es wurden verschiedenste Faktoren identifiziert, die bei der Genese der Atopie eine Rolle spielen. Seit langem ist bekannt, dass genetische Komponenten wichtige Einflussfaktoren sind. Das Risiko atopische Symptome zu entwickeln ist von 10% auf etwa 20-30% erhöht, wenn ein Elternteil Atopiker ist. Sind beide Elternteile betroffen steigt das Risiko nochmals auf ungefähr 60% an⁷.

Allein durch die genetische Determination ist das Auftreten atopischer Erkrankungen jedoch nicht erklärbar. Dies wird durch Zwillingsstudien deutlich, die die Konkordanz eineiiger Zwillinge (EZ) untersuchen. Eine Studie von 1981 kommt bei EZ auf eine Übereinstimmung von 56,7%, bei zweieiigen Zwillingen (ZZ) liegt diese bei nur 20%⁷⁷.

Neben genetischen Faktoren gibt es eine Reihe weiterer Einflussgrößen, die bei genetischer Disposition als Trigger der Erkrankung beschrieben werden, wie z.B. Endotoxinexposition, frühkindliche Infektionen (HAV, T. gondii, H. pylori, TBC), Aufwachsen in kinderstarken Familien, anthroposophischer Lebensstil, Kontakt zu Stalltieren und Genuss von nicht-pasteurisierter Kuhmilch.

Auch die Geschwisterzahl ist eine Einflussgröße (erstmalig beschrieben von David Strachan⁶³), wobei das Vorhandensein älterer Geschwister mit Allergieprotektion assoziiert ist.

Dieses Phänomen wird der erhöhten Rate frühkindlicher Infektionen, hervorgerufen durch den Kontakt zu älteren Geschwister, zugeschrieben ("Hygienehypothese")⁷².

Ebenfalls wichtig ist in diesem Zusammenhang der sozio-ökonomische Status, wobei ein niedriger sozio-ökonomischer Status vermehrt mit frühkindlichen Infektionen, dem Leben in Gebieten mit hoher Luftverschmutzung ⁷ und mütterlichen Rauchgewohnheiten vergesellschaftet sein kann ²¹. Ein niedriger sozio-ökonomischer Status ist mit einer geringeren Allergie-prävalenz assoziiert. Viele Untersuchungen weisen auf die entscheidende Rolle einer Tabakrauch-Exposition von mütterlicher Seite, vor allem in den ersten Lebensjahren im Entstehungsmechanismus von Asthma hin ²¹.

Die Art der Allergenexposition (inhalativ, z.B.: Hausstaubmilbe ²³; Pollen; nutritiv, z.B.: Kuhmilchprotein, Hühnereiweiß, Konservierungsstoffe), ihre Konzentration, Dauer und Intensität ³⁰ sowie Ernährungsgewohnheiten (z.B.: Vitamin D, mehrfach ungesättigte Fettsäuren) und Stilldauer sind ebenfalls bedeutsam ⁶⁰. Psychische Faktoren scheinen zwar nicht ursächlich, aber modulierend involviert zu sein. Außerdem können manche Infektionen wie z.B.: RSV und Keuchhusten die atopische Sensibilisierung fördern ⁷. Bemerkenswert ist, dass die Häufigkeit allergischer Erkrankungen in den Industrieländern erhöht ist ³⁰ und dabei wiederum die Prävalenz in der Stadtbevölkerung höher ist als in der Landbevölkerung ⁵⁰.

1.2 Die Immunologie der Allergie

Das Allergen wird zunächst von den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie z.B. den Monozyten, B-Zellen oder dendritischen Zellen als fremd erkannt. Es wird anschließend phagozytiert, prozessiert und an das Oberflächenprotein MHC II gebunden und so den CD4+ T-Helfer-Zellen präsentiert ⁵⁶. Hier wird die „Richtung“ der Immunantwort bereits festgelegt. Eine IL12-Produktion der aktivierten APCs kombiniert mit dem Antigenkontakt „triggert“ die Immunantwort in Richtung einer TH1-basierten Immunantwort. Für die Etablierung einer TH2-basierten Immunantwort ist die IL-4-Produktion der APCs nach Antigenkontakt essentiell ⁶². Ein wichtiger die Richtung der Immunantwort beeinflussender Faktor ist dabei die Konzentration des Antigens. Hierbei induzieren niedrige Konzentrationen eher eine TH1-basierte

Immunantwort, während hohe Konzentrationen die Entwicklung in Richtung einer TH2-basierten Immunantwort fördern ³².

Auch die antigenpräsentierende Zelle muss hierbei berücksichtigt werden: Makrophagen sind TH1-gekoppelt, Antigenpräsentation durch B-Zellen fördert die TH2-Entwicklung ⁴⁷.

Die Interaktion der APCs mit den T-Zellen wird durch costimulatorische Moleküle unterstützt. Somit bindet nicht nur das CD4-Oberflächenantigen der TH-Zelle an das MHC II der APC, sondern ebenfalls das CD28 der T-Zellen an LFA3 und B7 auf der APC, LFA-1 der T-Zellen an ICAM-1 (APC) und der T-Zell-Rezeptor direkt an das präsentierte Allergenpeptid ⁵⁶. Anhand ihrer Cytokinexpressionsmuster können die verschiedenen TH-Zell-Subtypen klassifiziert werden, wobei die TH2-Zellen in der Allergieentstehung eine große Rolle spielen ¹⁴.

Die TH2-Zellen zeichnen sich durch die Produktion der Cytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 aus. Die Cytokine IL-4 und IL-13 verursachen in B-Zellen einen Isotype-switch, der zur Produktion von IgE-Antikörpern führt, einem Merkmal atopischer Erkrankungen ³⁹. Ein dritter Subtyp der TH-Zelle ist die TH3 oder regulatorische T-Zelle. Über die Produktion des Cytokins IL-10 und TGF-beta (Transforming Groth Faktor-beta) wird Toleranz induziert ¹⁸. Die von den T-Zellen produzierten Cytokine interagieren mit den B-Zellen, den Effektorzellen des Immunsystems.

Allergische Erkrankungen sind durch erhöhte Produktion von Immunglobulin E (IgE) charakterisiert, welches von ausdifferenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, gebildet wird. Die IgE-Antikörper interagieren spezifisch mit dem zu ihrer Produktion führenden Allergen. Der im Blut zirkulierende IgE-Ak bindet an Rezeptoren für den Fc-Teil der Immunglobulin-Schwer-Ketten auf den Effektorzellen (Mastzellen, Basophile, Eosinophile). Bei einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Allergen vermitteln die membranständigen IgE-Ak durch Quervernetzung über das Allergen eine Entzündungsreaktion, die durch Ausschüttung von Histamin und anderen Mediatoren zu „allergischen Symptomen“ führt.

1.3 Das TH1 / TH2-Dogma der Allergie

Relativ gut definiert und besonders potent bei der Initiierung der Differenzierung der naiven T-Zelle in TH1- oder TH2-Zellen sind die Zytokine selbst: IL-12, IL-18 und IFN- γ initiieren die Differenzierung zu TH1-Zellen, während IL-4 die TH2-Zelldifferenzierung fördert. Der TH2-induzierende Effekt von IL-4 dominiert dabei über die Wirkung anderer Zytokine. Ein ausgesprochen starker Induktor der TH1-Differenzierung ist IL-12, das von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produziert wird. Funktionelle Rezeptoren für IL-12 finden sich nur auf frisch aktivierten und noch nicht differenzierten CD4⁺-T-Zellen sowie auf TH1-Zellen nicht aber auf differenzierten TH2-Zellen⁶⁴. Viele mikrobielle Produkte oder intrazelluläre Bakterien wie Listerien und Mykobakterien stimulieren die IL-12-Produktion und induzieren dadurch eine TH1-dominierte Immunantwort.

Auch IFN- γ fördert die Differenzierung von TH1-Zellen, teilweise durch eine Steigerung der IL-12-Produktion von Makrophagen, teilweise durch eine verlängerte Expression des IL-12-Rezeptors auf CD4⁺-T-Zellen. Da TH1-Zytokine die Produktion von TH2-Zytokinen hemmen und umgekehrt, wird die T-Zell-Polarisierung im Laufe einer Immunantwort immer weiter akzentuiert. Wenn die T-Zellen sich einmal in einen bestimmten Effektorotyp wie die TH1- oder TH2-Zelle differenziert haben, sind ihre Zytokinprofile relativ stark fixiert.

Das TH1/TH2-Paradigma betrachtet IFN- γ produzierende TH1-Zellen als Gegenspieler der TH2-Zellen. Da TH2-Zellen in der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale die zentrale Rolle spielen, wird entsprechend dem TH1/TH2-Paradigma TH1-Zellen ein protektiver Effekt beim allergischen Asthma bronchiale zugeordnet. Es besteht die Hypothese, dass die Inhibition einer allergischen Reaktion auf inhalative Antigene durch eine frühzeitige Differenzierung der Immunantwort in Richtung einer TH1-Immunantwort erreicht wird. Viele verschiedene Beobachtungen liefern indirekte Hinweise für einen solchen Zusammenhang.

Eine Infektion mit *M. bovis*-BCG im Mausexperiment hemmt beispielsweise die allergeninduzierte pulmonale Eosinophilie, die bronchiale Hyperreagibilität sowie die lokale IL-4- und IL-5-Produktion²⁶. Die protektive Rolle einer TH1-Immunität wird durch epidemiologische Studien zu TH1-dominierten Autoimmunerkrankungen unterstrichen. Patienten mit Enzephalitis disseminata⁵², Rheumatoider Arthritis⁴ oder Kinder mit Typ-I-Diabetes³³ haben ein deutlich reduziertes Risiko, allergisches

Asthma bronchiale oder andere allergische Erkrankungen zu entwickeln. Vice versa haben Kinder, bei denen frühzeitig eine Atopie auftritt, ein reduziertes Risiko, später einen Typ-I Diabetes mellitus zu entwickeln ¹⁵. Die antagonistische Rolle von TH1- und TH2- Zellen ist nicht unumstritten. Es gibt mittlerweile verschiedene Beobachtungen, die eine protektive Rolle von TH1-Zellen bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises in Frage stellen. So konnte beispielsweise in einem Mausmodell für allergisches Asthma der Transfer von allergenspezifischen TH1-Zellen die durch TH2-Zellen induzierte bronchiale Hyperreagibilität und pulmonale Entzündung nicht hemmen ²⁴. Außerdem kann eine hohe TH1-Cytokinexpression in der Lunge eine Verstärkung der allergischen Entzündung hervorrufen ⁵⁵. Nach neuesten Erkenntnissen ist das TH1/TH2-Paradigma sehr viel komplexer als bisher angenommen, und die Unterdrückung der allergischen Entzündung in vivo wird zumindest teilweise auf andere Zellen als die TH1-Zellen zurückgeführt. Hinweise für eine regulatorische Funktion beim allergischen Asthma bronchiale wurden beispielsweise für $\gamma\delta$ -T-Zellen ⁴², für IL-10 bzw. IL-10 produzierende Tr1-Zellen ¹³ oder TGF- β bzw. TGF- β produzierende TH3-Zellen ²⁵ erbracht. Weitere Untersuchungen zur Rolle dieser verschiedenen Zelltypen in der Pathophysiologie der atopischen Erkrankungen sind unbedingt notwendig.

Die zentrale Rolle der allergenspezifischen T-Lymphozyten in der Pathophysiologie allergischer Erkrankungen macht diese Zellen und die von ihnen produzierten Cytokine zu wichtigen therapeutischen Zielstrukturen ⁶. Eine unspezifische Hemmung der Cytokinsynthese wurde schon in der Vergangenheit durch verschiedene immunsupprimierende Medikamente wie Glukokortikoide oder Cyclosporin A therapeutisch genutzt. Zur Zeit werden präklinische und klinische Studien durchgeführt, in denen einzelne Cytokine selektiv gehemmt werden.

1.4 Umweltfaktoren und Allergie

Neben genetischen Faktoren sind verschiedene Umweltfaktoren beschrieben, welche die Entstehung allergischer Erkrankungen beeinflussen.

Protektive Faktoren, die mit Allergieprotektion assoziiert wurden, sind die regelmäßig hohe Allergenexposition (Pollen, Nahrungsmittel, Tierepithelien, Milben), der Kontakt zu Stalltieren ⁷¹, die Endotoxinexposition in Schlafmatratzen, im Staub und in den Ställen ¹⁰, der Konsum der schwangeren Frau von nicht-pasteurisierter Milch und das Leben in traditioneller Farmumgebung.

Eine Studie an italienischen Rekruten zeigte eine geringere Prävalenz an Asthma und Rhinitis, wenn diese seropositiv auf HAV waren ⁴⁸. Weitere Studien konnten zeigen, dass Kinder mit orofäkalen Infekten (*T. gondii* oder *H.pylori*) und Maserninfektionen weniger häufig an Erkrankungen des atopischen Formenkreises leiden, als solche ohne Infektion ⁵⁸.

Eine japanische Studie an Kindern mit positivem Tuberkulintest zeigte eine niedrigere Prävalenz an atopischen Erkrankungen als die tuberkulintest-negativen Kinder ⁶¹. Gehäufte Atemwegsinfekte (in Tagesbetreuung, frühzeitiger Kindergartenbesuch) haben einen inversen Bezug zur Atopieneigung und jüngere Kinder kinderreicher Familien leiden weniger unter Erkrankungen des atopischen Formenkreises. So stellt die Geschwisteranzahl, bzw. der frühzeitige Kontakt zu anderen Kindern in Kindergärten oder Kindertagesstätten, eine Allergieprotektion dar ⁵. Die eine TH1-Immunantwort induzierenden Infektionen der frühen Kindheit unterstützen möglicherweise die Umleitung der postnatal physiologisch bestehenden TH2-Immunität in eine TH1-Immunität und wirken damit der Entwicklung einer TH2-dominierten allergischen Erkrankung entgegen ⁴⁶. Auch der anthroposophische Lebensstil (weniger Impfungen) zeigt Tendenzen in Richtung eines Allergieschutzes

³.

1.5 Nabelschnurblut-Cytokine als Prädiktoren für die

Allergieentstehung

Mit der Beobachtung, dass das Cytokin IFN- γ bei den Neugeborenen in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden ist, die später eine Allergie entwickeln, hat sich das Interesse an der Cytokinproduktion im Nabelschnurblut als prädiktivem Parameter der Allergie verschärft. Es ist jedoch immer noch ungeklärt, ob die niedrige IFN- γ -Produktion bei Geburt ursächlich für oder als Folge von atopischen Erkrankungen auftritt ³⁵.

Ferner konnte gezeigt werden, dass niedrige Spiegel der TH1-Cytokine IFN- γ ⁶⁸ und TNF- α ⁴⁵ bei Geburt invers mit der Atopieentstehung assoziiert sind. Hohe Konzentrationen der TH2-Cytokine IL4 und IL5 bei Geburt haben jedoch ebenfalls einen protektiven Einfluss auf die Allergieentstehung ^{58a}.

Abbildung 1: T-Zell- Differenzierung

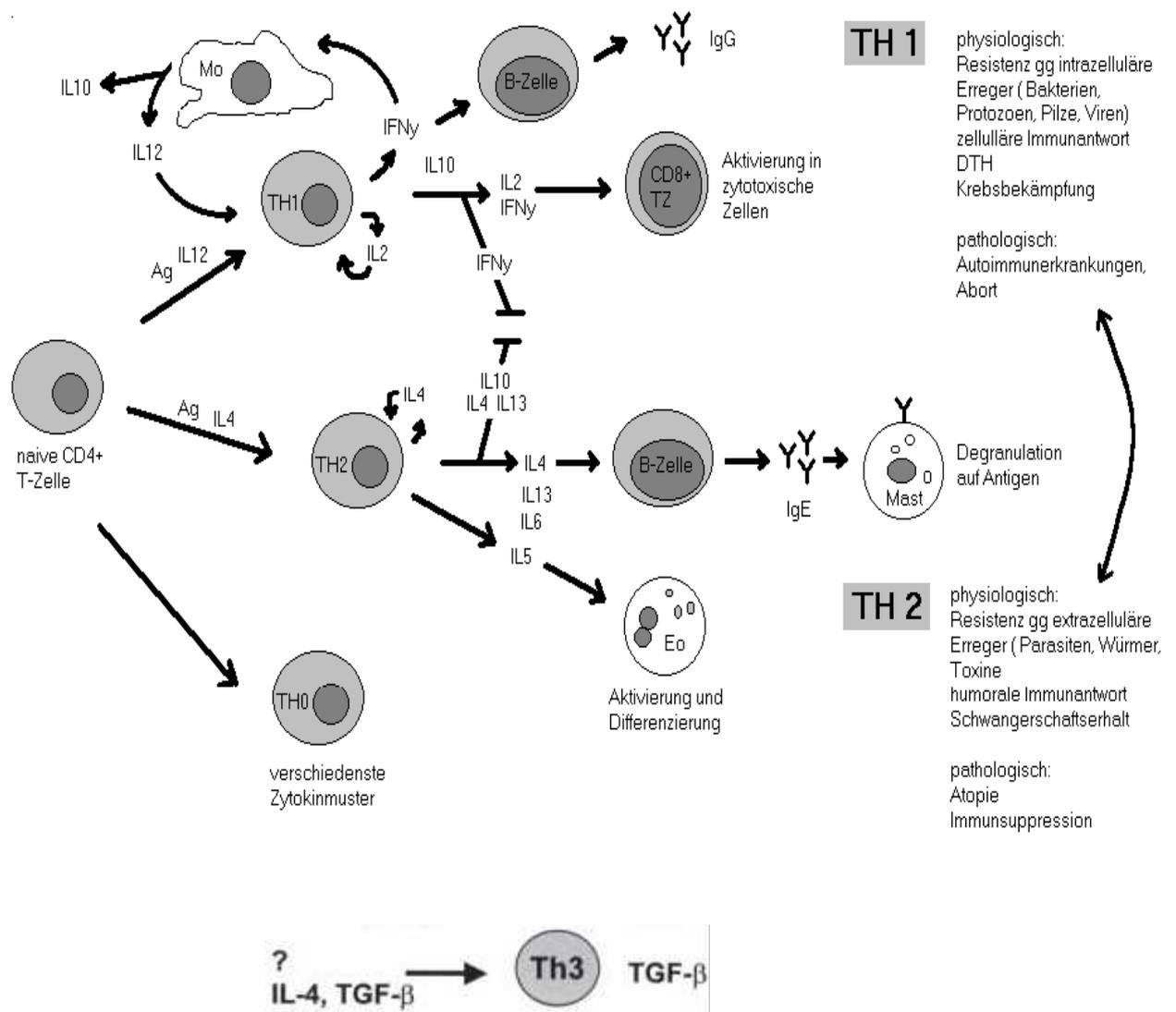


Schaubild : Mo=Monozyt, Eo=Eosinophiler, Mast=Mastzelle, TZ=T-Zelle; Erklärung siehe Text

Die *Differenzierung der naiven T-Vorläuferzelle* in die TH2-Zelle bei Allergenkontakt ist entscheidend für die Entstehung des allergischen Asthma bronchiale. Sie ist von verschiedenen Faktoren abhängig wie 1. der Beschaffenheit und Konzentration des Antigens, 2. der antigenpräsentierenden Zelle, 3. der Stärke des Signals an den Antigenrezeptor der T-Zelle und 4. den kostimulatorischen Signalen ¹¹.

1.6 Pränatale Exposition und Allergie

Die Schwangerschaft und frühe Kindheit scheint jedoch ein Zeitfenster zu sein, in welchem allergische Erkrankungen determiniert werden können ⁷⁰. In diesem Zeitraum beeinflussen verschiedene Umweltexpositionen der Schwangeren die Allergieentwicklung im Kind. So wird in der ALEX-Studie beschrieben, dass der frühe (pränatale und früh-postnatale) Kontakt zu Stalltieren mit Allergieprotektion assoziiert ist. Eine von Prescott veröffentlichte Arbeit untersuchte die Cytokinproduktion ab der Geburt über zwei Jahre in 6-monatigen Abständen ⁵⁴. Dabei zeigte sich, dass alle Kinder zum Zeitpunkt der Geburt ein TH2-Cytokinmuster aufwiesen. Dieses wurde jedoch bei Kindern ohne atopische Erkrankung während der ersten zwei Lebensjahre supprimiert, wohingegen es bei Kindern persistierte, die später eine Atopie entwickelten. Diese Daten stützen die Annahme, dass bereits pränatal eine immunologische Weichenstellung zur Karriere des Atopikers erfolgen muss.

Mit Hilfe von Proliferationsstudien von Nabelschnurblutzellen konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem des Neugeborenen bestimmte Allergene z.B. Kuhmilchprotein (BLG), Hühnereiweißprotein (OVA), Birkenpollen u.a. erkennt, d.h. dass es schon im Mutterleib zu einem Kontakt mit diesen Allergenen kommt ⁵³. Studien zum aktiven Transport verschiedener Allergene über die Plazenta bestätigen, dass der Durchtritt dieser Allergene in das kindliche Blutkreislaufsystem über die Plazenta möglich ist ⁶⁶. D.h. Umweltfaktoren könnten die T-Zellantwort bereits intrauterin beeinflussen. Eine große Zahl an Studien beschäftigte sich mit möglichen Mechanismen, die die pränatale Wirkung von Umweltfaktoren auf das kindliche Immunsystem erklären könnten. Häufig wurde eine allergenspezifische T-Zell-Proliferation im Nabelschnurblut ⁶⁵ beobachtet. Dies führte zu der Hypothese, dass während der Schwangerschaft fetale T-Zellen Allergenen ausgesetzt sind, die von der Mutter durch Inhalation oder Ingestion aufgenommen wurden. Es wird vermutet, dass dieser Allergenkontakt bereits in einem sehr frühen Stadium der Schwangerschaft auftritt (~20. SSW) ⁶⁷.

Ende der 90er-Jahre wurde ein Mausmodell entwickelt, mit dessen Hilfe der Einfluss einer mütterlichen Umweltexposition auf die Allergieentwicklung der Nachkommen untersucht wurde. In diesem Modell wurden weibliche Mäuse mittels intraperitonealer Injektionen mit

dem Modellallergen Hühner-Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Im Anschluss wurden sie mit nichtsensibilisierten Männchen verpaart. Während der Schwangerschaft erfolgte jeden zweiten Tag eine Exposition mit OVA-Aerosol.

In den mononukleären Splenozyten der Nachkommen von OVA behandelten Muttermäusen war die Expression von IFN- γ deutlich vermindert, sodass ein relatives Übergewicht der TH2-Immunantwort vorlag ²⁶. In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie die Nachkommen im Alter von 4 Wochen auf eine β -Laktoglobulininjektion reagierten. Zu diesem Zeitpunkt produzierten die Nachkommen der OVA-sensibilisierten Mütter bereits signifikant höhere Mengen an Gesamt-IgE als die der nichtsensibilisierten Muttertiere. Die Nachkommen der sensibilisierten Mäuse produzierten zudem deutlich schneller und in höheren Konzentrationen spezifisches IgG1 gegen β -Laktoglobulin als die Kontrollgruppe. Diese Reaktion zeigte eine leichtere Induktion einer heterologen allergischen Sensibilisierung in den Nachkommen der allergischen Mütter ^{27,28}. (Es wird beschrieben, dass eine Lipopolysaccharid-Exposition während der Schwangerschaft eine TH1-Immunantwort in den Nachkommen induziert.) In einem weiteren Mausexperiment wurden schwangere Mäuse mit Endotoxin exponiert und die Allergieentwicklung der Nachkommen analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Nachkommen im Vergleich zu Nachkommen nichtexponierter Muttertiere verstärkt IFN- γ bei gleichbleibender IL-4 und IL-2-Expression produzierten. Wenn die Nachkommen mit Ovalbumin sensibilisiert wurden, war deren Produktion von IL-5 und IL-13 im Vergleich zu Nachkommen von endotoxinexponierten Mausmüttern signifikant reduziert, ebenso die Produktion von spezifischem IgE und IgG1 gegen Ovalbumin ⁸. Das zunehmende Interesse an der Frage der Prägung des kindlichen Immunsystems bereits vor der Geburt führte in den letzten Jahren zu einer Anzahl an Studien, die sowohl in humanen Interventionsstudien als auch im Tiermodell nach neuen methodischen Ansätzen für eine Allergieprävention suchten ⁹.

1.7 Die PASTURE-Studie

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen ist vor allem in dem pädiatrischen Bevölkerungsanteil in den letzten 20-30 Jahren deutlich angestiegen. Das Asthma bronchiale stellt in den Industrienationen die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter dar⁷³. Nach Ninan und Russel stieg die Prävalenz von Asthma bronchiale bei 8 bis 13-jährigen Schulkindern in den letzten 25 Jahren von 4,1% auf 10,2 %⁵¹. Auch bei der allergischen Rhinitis und dem atopischen Ekzem wurde in verschiedenen Untersuchungen eine Zunahme der Inzidenz beobachtet²⁰.

Über zwei Billionen Dollar werden jährlich zur Behandlung von Erkrankungen des atopischen Formenkreises aufgewandt⁴⁴.

Das Aufwachsen in einer traditionell bäuerlichen Umgebung konnte in mehreren Studien mit einem Schutz vor Erkrankungen des atopischen Formenkreises assoziiert werden.

In der ALEX (Allergy and Endotoxin)-Studie, einer Querschnittstudie, wurden 812 Kinder aus der traditionellen Farmerumgebung und Nichtfarmer-Kinder im Alter von 6-13 Jahren auf das Vorhandensein atopischer Erkrankungen untersucht. Die Nichtfarmerkinder zeigten eine erhöhte Prävalenz an chronisch entzündlichen Erkrankungen vor allem des Asthma bronchiale⁵⁷. In dieser Studie konnte retrospektiv gezeigt werden, dass der Schutz vor Allergien während der Kindheit besonders stark mit dem Aufenthalt der schwangeren Frau im Stall sowie dem Verzehr von nicht-pasteurisierter Kuhmilch während der Schwangerschaft assoziiert war. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass der Allergieschutz bereits pränatal initiiert wird. Insbesondere zeigte sich dabei, dass der schützende Effekt umso stärker war, je früher der Kontakt zu den Stalltieren sowie der Genuss von Milch "direkt von der Kuh" stattfand.

In der multizentrischen (Deutschland, Österreich, Frankreich, Schweiz und Finnland), prospektiven PASTURE-Studie (**P**rotection against **A**llergy-**S**TUdy in **R**ural **E**nviroment) sollen die Auswirkungen einer pränatalen und früh-postnatalen Exposition zur traditionellen Bauernhofumgebung auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems und der nachfolgenden Allergieentstehung analysiert werden. Hierzu wurden pro Zentrum 100 schwangere Farmer- und 100 schwangere Nichtfarmer-Frauen rekrutiert. Deren Kinder sollen im Alter von einem und sechs

Jahren einer Untersuchung auf atopische Dermatitis (1 Jahr) und Asthma bronchiale (6 Jahre) unterzogen werden.

Um die Auswirkungen der pränatalen Exposition genau zu untersuchen, wurden die Cytokinkonzentrationen, als immunologischer Parameter, bereits im Nabelschnurblut bestimmt.

Insbesondere die Verhaltensweisen der Mutter während der Schwangerschaft, wie z.B. Stallaufenthalte und Milchkonsum, sollen mit der Cytokinexpression im Nabelschnurblut assoziiert werden. Die Untersuchung wird von der Europäischen Union gefördert und neben Deutschland (Bayern) auch in Finnland, Österreich, der Schweiz und dem französischen Jura durchgeführt.

Im Nabelschnurblut wurde die Expression der Interleukine 5, 10 und 12 sowie Interferon-gamma (INF- γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) nach in vitro Stimulation der Nabelschnurblutzellen mit PMA/Ionomycin (P/I) und Lipopolysaccharid (LPS) untersucht.

1.8 Cytokine

Cytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinhormonen, die als Zellbotenstoffe fungieren. Unter anderem spielen sie eine entscheidende Rolle in der Entstehung von allergischen Erkrankungen. Sie sind ein „Indikator“ für die Richtung der T-zellbasierten Immunantwort (TH1, TH2, TH3).

In der PASTURE-Studie (siehe unten) wurden die Cytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α untersucht.

Interferon- γ (IFN- γ) ist ein homodimeres Glykoprotein aus 21 bis 24 kD schweren Untereinheiten und wird von TH0-, TH1-, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen produziert. IFN- γ stimuliert naive T-Zellen zur Differenzierung in Richtung einer TH1-Immunantwort ⁶⁹ und hemmt die Differenzierung zu TH2-Zellen. Es fördert den Isotypwechsels der Plasmazellen zu den Immunglobulinunterklassen IgG2a und IgG3 und hemmt gleichzeitig den Isotypwechsel von IgG1 zu IgE.

Interleukin 10 (IL10) ist 18 kD schwer und wurde anfangs als ein von TH2-Zellen produziertes Cytokin beschrieben ¹⁹.

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls von TH1-Zellen, T-reg-Zellen ⁶², aktivierten Makrophagen und aktivierten B-Zellen produziert wird. Folgende Wirkungsmechanismen sind bisher bekannt:

IL-10 hemmt die Cytokinproduktion von Makrophagen (z.B.: TNF, IL1 oder IL12) und reduziert somit die von Makrophagen verstärkte TH1-Zellaktivierung wahrscheinlich zusätzlich über die verminderte Expression von MHC II-Molekülen und Kostimulatoren auf Makrophagen. Stimulierend auf die Plasmazellen wirkt IL-10 als „Switch-Faktor“ für die IgG4-Produktion. Außerdem fördert IL-10 die TH2-Differenzierung und ist maßgeblich an der Toleranzinduktion beteiligt. Unreife dendritische Zellen scheinen die Produktion tolerogener T-Zellen zu fördern ⁴³. TH3-Zellen oder regulatorische T-Zellen sind eine die Immunantwort unterdrückende CD4+-T-Zell-Population, die IL-10 und TGF- β produziert ¹⁸.

Interleukin 5 (IL5) ist ein 40 kD schweres Homodimer, das hauptsächlich von TH2-Zellen aber auch von aktivierten Mastzellen und Eosinophilen produziert wird. Seine Funktion besteht in ⁴¹ der Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von eosinophilen Granulozyten ⁴⁰, den maßgeblichen Entzündungszellen bei Allergien. Somit ist es entscheidend an der Entwicklung der TH2-vermittelten allergischen Reaktion beteiligt.

Der **Tumornekrosefaktor-alpha** (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Cytokin, welches die Differenzierung der T-Zellen in Richtung einer TH1-Immunantwort steuert.

Die wichtigsten Produzenten von TNF- α sind die aktivierten Monocyten. Aber auch antigenstimulierte T-Zellen, aktivierte NK-Zellen und aktivierte Mastzellen sezernieren TNF- α .

IFN- γ erhöht die TNF- α Synthese von LPS-stimulierten Monocyten. Dies bedeutet dass TNF- α sowohl ein Mediator der natürlichen als auch der erworbenen Immunität ist und eine wichtige Verbindung zwischen der Immunantwort und der akuten Entzündung darstellt. Man findet TNF-Rezeptoren auf fast allen Zelltypen, die bis heute untersucht wurden.

Interleukin 12 (IL-12) ist ein 70 kD schweres Heterodimer, das aus zwei kovalent gebundenen Polypeptidketten besteht, von denen eine 35 kD (p35) und die andere 40 kD (p40) schwer ist. Die p35-Untereinheit wird von vielen verschiedenen Zelltypen, wie z.B. T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten produziert. Die p40-Kette wird hauptsächlich durch aktivierte Monozyten und B-Zellen gebildet. IL12 ist wegen seiner Wirkung auf NK-Zellen und T-Lymphozyten ein wichtiger Regulator der zellvermittelten Immunantwort.

IL12 induziert die Transkription von IFN- γ in T-Zellen und stimuliert auf diese Weise die Differenzierung der naiven CD4+T-Zellen zum TH1-Subset. Zusätzlich wirkt IL-12 proliferativ auf die Differenzierung der CD8+T-Zellen in reife funktionell aktive zytotoxische T-Lymphozyten ².

Die Cytokinkonzentrationen wurden mit (a) dem häuslichen Umfeld der Mutter (Farmer/ Nichtfarmer-Status), (b) der Exposition gegenüber dem Stall (keine Exposition/ weniger als 30h pro Monat/ mehr als 30h pro Monat) und (c) dem Status Farmer/ Nichtfarmer aktuell und während der Kindheit der Mutter assoziiert.

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es die Cytokinproduktion von Nabelschnurblutzellen mit der speziellen „Umweltkomponente“ der traditionellen Farmerumgebung (Farmer- oder Nichtfarmer) zu assoziieren. Dabei wird im Besonderen der Aufenthalt der schwangeren Mutter im Stall berücksichtigt. Somit sollen pränatale Umweltfaktoren gefunden werden, welche die kindliche Cytokinexpression beeinflussen.

1.10 Fragestellung

- 1) Lassen sich in den Zellkulturüberständen von PMA/Ionomycin (P/I) und LPS-stimulierten Nabelschnurblutzellen die Cytokine IL-5, IL-10, IL-12, TNF- α und IFN- γ nachweisen ?
- 2) Sind die kindlichen Cytokinexpressionsmuster mit dem häuslichen Umfeld der schwangeren Mutter (Farmer/ Nichtfarmer) assoziiert?
- 3) Sind die kindlichen Cytokinexpressionsmuster mit der Expositionsdauer der schwangeren Mutter gegenüber dem Stallmilieu assoziiert (keine Exposition/ weniger als 30h pro Monat/ mehr als 30h pro Monat)?
- 4) Kann man bei Assoziation der Cytokinmuster mit dem Status der Mutter - (Farmer/Nichtfarmer) im Moment und während ihrer Kindheit - Unterschiede erkennen?

2. Material und Methoden

2.1 Materialübersicht (siehe 7.)

2.2 Studienkohorte

Die Studienkohorte besteht aus 265 Nichtfarmer- und 233 Farmer-Neugeborenen aus den vier Studienzentren in Deutschland, Finnland, Österreich und der Schweiz. Die Probanden wurden im Rahmen der von der Europäischen Union geförderten PASTURE- Studie rekrutiert.

2.3 Proben

Nach Entnahme des Nabelschnurblutes in den studienteilnehmenden Instituten wurden die gesamten Blutzellen „in vitro“ stimuliert.

Es wurde je eine Stimulation mit PMA/Ionomycin (P/I; PMA 5 ng/ ml und Ionomycin 1 µg/ ml) und Lipopolysaccharid (LPS; 0,1 µg/ ml) durchgeführt und diese für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert (P/I-24h, P/I-48h und LPS-24h, LPS/48h). Nach erfolgter Inkubation und Zentrifugation wurden die gewonnenen Kulturüberstände bei -80°C tiefgefroren und auf Trockeneis zur Cytokin-konzentrationsmessung an das Biomedizinische Forschungszentrum des Instituts für Klinische Chemie und Molekularer Diagnostik der Philipps-Universität Marburg geschickt.

In Marburg wurden die Kulturüberstände zu je 200 µl aliquotiert, um die gleiche Qualität der Proben für eine eventuelle Zweit-Messung zu sichern.

Abbildung 2: Stimulation mit PMA/ Ionomycin

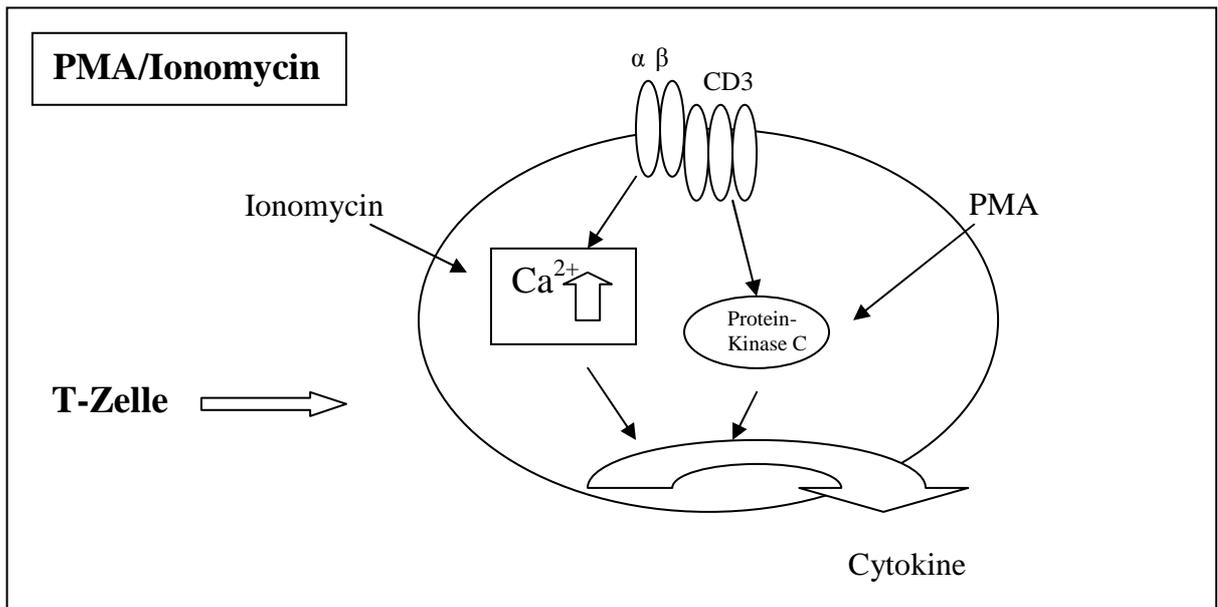
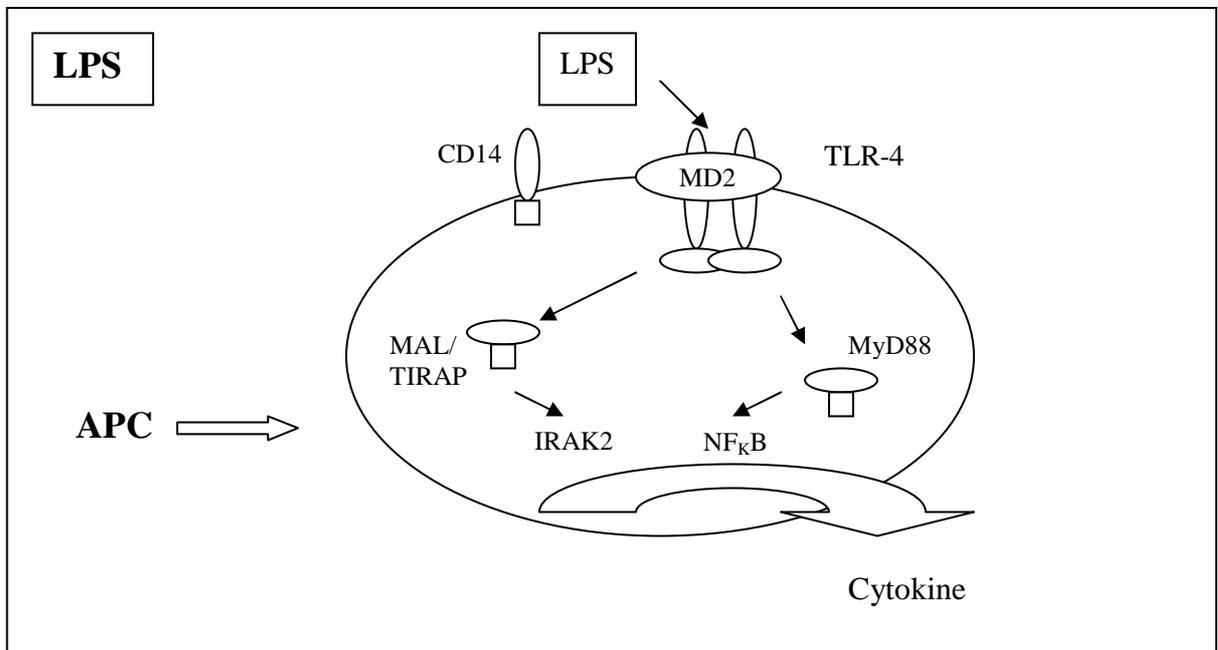


Abbildung 3: Stimulation mit LPS



2.3 Probenanalyse mittels ELISA-Methode (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Die Cytokinkonzentrationen der Proben wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA OptEIA™-Kits für humanes IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α (BD Biosciences, USA) bestimmt.

Zur Vorbeschichtung der 384-Well-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH Deutschland, Wiesbaden) wurden 50 μ l des im jeweiligen Kit enthaltenen cytokinspezifischen Fangantikörpers (Capture-Antibody) pro Kavität eingesetzt.

Die nachfolgende Inkubation erfolgte für 15 Stunden bei 4°C.

Nach dreimaligem Waschen der Kavitäten (Washer der Firma Tecan) mit Waschpuffer bestehend aus PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) + 0,1% Tween 20 (Sigma Biochemica, Deisenhofen) wurden die Platten mehrmals auf saugfähigem Papier ausgeschlagen. Dies geschah auch nach jedem der nachfolgenden Waschschritte. Alle Kavitäten wurden zum Abblocken überschüssiger Fangantikörper mit 100 μ l PBS + 10% FCS (endotoxinfreies Fetal Calf Serum (FCS) Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) beschickt und für eine Stunde schüttelnd (350 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Auswaschen der Platten wurde die Verdünnungsreihe des mitgelieferten Standards sowie die Zellkulturüberstände mit 50 μ l/ Kavität aufgetragen und für 2 Stunden auf dem Rütteltisch (350 rpm bei Raumtemperatur) inkubiert. Die Standardreihe wurde zweifach auf die Platte aufgetragen und der Mittelwert beider zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Der Ausgangsstandard betrug für die Cytokine IL-5, IL-10 und IL-12 500 pg/ml, für IFN- γ und TNF- α 1000 pg/ml und wurde mit PBS + 10% FCS sechsfach im Verhältnis 1:2 verdünnt. Zwei Kavitäten wurden als Bezugsleerwert (Blank) nur mit PBS + 10% FCS beschickt. Zur Bestimmung der IL-5 und IL-12-Konzentrationen wurden die Zellkulturüberstände nicht verdünnt. Hingegen mussten für die Konzentrationsbestimmung der Cytokine IL-10, IFN- γ und TNF- α die Kulturüberstände 1:10 verdünnt gemessen werden.

Während der Inkubation bindet das im Kulturüberstand enthaltene Cytokin proportional zu seiner Konzentration an den Fangantikörper. Durch anschließendes dreimaliges Waschen wurden unspezifisch gebundene Stoffe entfernt.

Ein biotinylierter Zweitantikörper (Detection-Antibody) wurde mit dem Enzymreagenz (Avidin-horseradish peroxidase conjugate) in PBS+ 10% FCS vermischt und die Platten mit 50µl/ Kavität beschickt.

Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Rütteltisch (350 rpm bei Raumtemperatur). Danach wurde erneut durch einen gründlichen Waschvorgang die Elimination der ungebundenen Reste garantiert.

Im letzten Schritt wurde zu allen Kavitäten, einschließlich des Blank, für 20 Minuten 200µl POD Substrat (BM Blue, Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Deutschland) gegeben und der Ansatz im Dunkeln inkubiert. Das Substrat POD wird durch die Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die Farbintensität ist proportional zu der Cytokinkonzentration und wurde in einem ELISA-Reader bei 450 nm bei 690nm Referenzwellenlänge gemessen.

Anhand der Standards und im Bezug zum Blank-Leerwert wurde mit der Software (Magellan5) die Cytokinkonzentration bestimmt.

2.5 *Statistische Auswertung*

Die statistische Auswertung wurde durch die Abteilung für Epidemiologie der Universität Ulm vorgenommen. Die Cytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut wurden durch eine Bivariatanalyse mit verschiedenen Expositionsvariablen (a) häusliches Umfeld (Farmer/ Nichtfarmer, Status zum Zeitpunkt der Studie), (b) Exposition gegenüber dem Stall (keine Exposition/ weniger als 30h pro Monat/ mehr als 30h pro Monat) und (c) Status Farmer/ Nichtfarmer im Moment und während der Kindheit der Mutter assoziiert. Signifikante Assoziationen wurden mit Hilfe der Trend-Tests Two-sided Wilcoxon-Test und Two-sided Kruskal-Wallis-Test bestimmt und durch den p-Wert ausgedrückt (p< 0,05 stellt eine einfache Signifikanz dar, p<0,01 stellt eine hohe Signifikanz dar). Die absoluten Cytokinkonzentrationen wurden auf 10⁶ Blutleukozyten bezogen und, aufgrund einer schiefen Verteilung, in die Kategorien Null, kleiner Median und größer Median eingeteilt.

Zur Übersicht: Pipettierschema einer 384-well- Platte

Abkürzungen: Std. : Standard; BL : Blank; M: Medium/unstimulierter Zellkulturüberstand; Reihen A-H: IL5, I-P: IL10, Stimulationszeit in h

	1	2	4	5	7	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Std.500 pg/ml	Std.250 pg/ml	Std.125 pg/ml	Std.62,5 pg/ml	Std.31,25 pg/ml	Std.15,625 pg/ml	Std.7,8125 pg/ml	BL	BL		1 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	2 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
B	Std.500 pg/ml	Std.250 pg/ml	Std.125 pg/ml	Std.62,5 pg/ml	Std.31,25 pg/ml	Std.15,625 pg/ml	Std.7,8125 pg/ml	BL	BL		3 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	4 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
C	5 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	6 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	7 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	8 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
D	9 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	10 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	11 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	12 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
E	13 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	14 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	15 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	16 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
F	17 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	18 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	19 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	20 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
G	21 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	22 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	23 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	24 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
H	25 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	26 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	27 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	28 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
I	Std.500 pg/ml	Std.250 pg/ml	Std.125 pg/ml	Std.62,5 pg/ml	Std.31,25 pg/ml	Std.15,625 pg/ml	Std.7,8125 pg/ml	BL	BL			P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	2 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
J	Std.500 pg/ml	Std.250 pg/ml	Std.125 pg/ml	Std.62,5 pg/ml	Std.31,25 pg/ml	Std.15,625 pg/ml	Std.7,8125 pg/ml	BL	BL		3 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	4 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
K	5 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	6 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	7 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	8 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
L	9 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	10 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	11 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	12 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
M	13 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	14 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	15 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	16 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
N	17 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	18 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	19 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	20 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
O	21 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	22 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	23 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	24 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				
P	25 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	26 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	27 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h	28 M24h	P/I 24h	P/I 48h	LPS 24h	LPS 48h				

3. Ergebnisse

3.1 Studienkohorte

Die in dieser Arbeit betrachtete Studienkohorte setzte sich aus 265 Nichtfarmer- und 233 Farmer- Neugeborenen aus den vier Studienzentren in Deutschland, Finnland, Österreich und der Schweiz zusammen. Diese Population war eine Teilkohorte der Gesamtstudienpopulation von 430 Nichtfarmer- und 377 Farmer- Neugeborenen.

Ein soziodemographischer Vergleich von Farmer- und Nicht-Farmerfamilien zeigte, dass die Farmerfamilien im Vergleich zu den Nichtfarmer-Familien eine höhere Anzahl an Familienmitgliedern hatten und mehr Haustiere besaßen. Mütter aus dem traditionellen Farmer-Umfeld rauchten während der Schwangerschaft seltener und hatten weniger atopische Erkrankungen. Zwangsläufig waren die schwangeren Frauen aus dem Farmer-Umfeld signifikant häufiger dem typischen Farmercharakteristika, wie z.B. einem hohen Konsum von nicht pasteurisierter Kuhmilch und regelmäßigem Kontakt zu Stalltieren ausgesetzt.

Die Cytokinkonzentrationen werden im folgenden Abschnitt mit (a) dem häuslichen Umfeld (Farmer/ Nichtfarmer, Status zum Zeitpunkt der Studie), (b) der Exposition gegenüber dem Stall (keine Exposition/ weniger als 30h pro Monat/ mehr als 30h pro Monat) und (c) dem Status Farmer/ Nichtfarmer im Moment und während der Kindheit der Mutter statistisch assoziiert.

Mittels ELISA-Methode wurden in den Zellkulturüberständen der *in vitro* mit PMA/Ionomycin und Lipopolysacchariden (LPS) stimulierten Nabelschnurblutzellen die Cytokinkonzentrationen von IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α bestimmt. Die absoluten Konzentrationen wurden auf 10^6 Blutleukozyten bezogen und dann mit dem (1) aktuellen Status der Mutter (Farmer/ Nichtfarmer), (2) Aufenthalt der schwangeren Frau im Stall und (3) historischem Status der Mutter, d.h. war die Mutter schon immer Farmer oder nicht (ever/ never) mit Hilfe der statistischen Methode der Bivariat-Analyse assoziiert. Die Cytokinkonzentrationen wurden hierzu in drei Kategorien, nämlich gleich Null, kleiner Median und größer Median eingeteilt.

3.2 Farmerkinder haben im Vergleich zu Nicht-Farmerkindern eine erhöhte IFN- γ und TNF- α -Expression im Nabelschnurblut

Die Assoziation der Cytokinexpression mit dem aktuellen Farmer/ Nichtfarmer-Status der Mutter zeigte drei signifikante Assoziationen (Zusammenfassung in Tabelle 1).

Nach LPS-Stimulation (48h) zeigte sich bei signifikant mehr Farmer-Kindern eine hohe IFN- γ -Expression im Vergleich zu den Nicht-Farmer-Kindern. Die Anzahl der Kinder mit einer niedrigen IFN- γ -Expression war hingegen bei Nicht-Farmer-Kindern höher. Ausgewertet wurden 217 Farmer- und 243 Nichtfarmer-Neugeborene. Von den Farmer-Neugeborenen lag bei 152 Neugeborenen die Cytokinkonzentration von IFN- γ bei Null, bei 34 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 31 Neugeborenen war sie größer Median.

Nach P/I-Stimulation (48h) zeigten sich für die Assoziation der Cytokinexpressionen von IFN- γ und TNF- α mit dem Farmer-Status hohe Signifikanzen (Tabelle 1, Abb. 1 und 2).

Die Cytokinkonzentrationen von IL-5, IL-10 und IL-12 zeigten bei der Assoziation der Cytokinexpression mit dem Farmer-Status keine signifikanten Assoziationen.

Tabelle 1: Assoziation Farmer/ Nichtfarmer

	LPS 24h	LPS 48h	P/I 24h	P/I 48h
IFN-γ	0,1378	0,0212*	0,1018	0,0183**
IL-10	0,2569	0,2431	0,2976	0,8613
IL-12	0,1226	0,0688	0,9937	0,4067
IL-5	0,2918	0,5399	0,6851	0,5519
TNF-α	0,5494	0,7716	0,0501	0,0009**

In Abbildung 1 ist eine Population von 331 Neugeborenen (152 Farmer, 179 Nicht-Farmer) berücksichtigt.

Von den Farmer-Neugeborenen zeigte eine Anzahl von 51 Neugeborenen eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 42 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 59 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 57,63 pg/10⁶ Blutleukozyten).

Von den Nichtfarmer-Neugeborenen zeigten 76 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 60 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 43 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 21,38 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Dieses Ergebnis zeigt, dass hochsignifikant mehr Farmer-Kinder hohe Konzentrationen an IFN- γ im Nabelschnurblut aufwiesen.

Abbildung 1: Assoziation Farmer/ Nichtfarmer (aktuell)

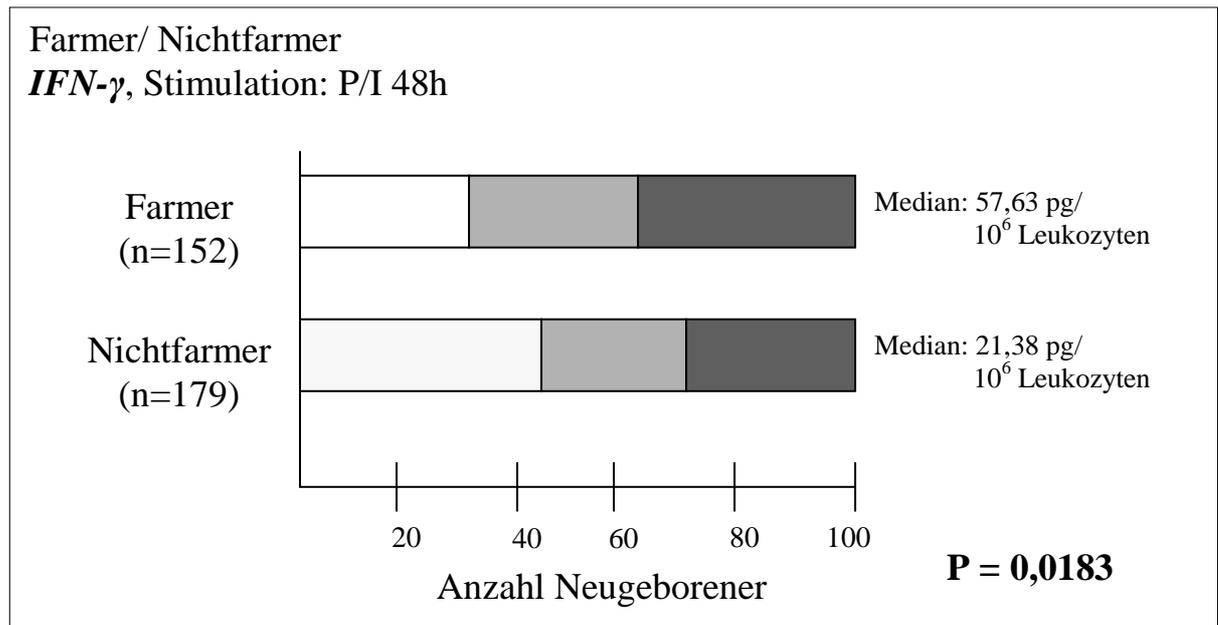


Abb. 1 Farmerkinder haben im Vergleich zu Nicht-Farmerkindern eine Erhöhte IFN- γ -Expression.

In Abbildung 2 ist eine Population von 389 Neugeborener (181 Farmer, 208 Nicht-Farmer) berücksichtigt.

Von den Farmer-Neugeborenen zeigten 46 Neugeborene eine TNF- α -Konzentration von Null, bei 59 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 76 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 66,74 pg/10⁶ Blutleukozyten).

Von den Nichtfarmer-Neugeborenen zeigten 84 Neugeborene eine TNF- α -Konzentration von Null, bei 70 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 54 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 19,67 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Dieses Ergebnis zeigt, dass hochsignifikant mehr Farmer-Kinder hohe Konzentrationen an IFN- γ im Nabelschnurblut aufwiesen.

Abbildung 2: Assoziation Farmer/ Nichtfarmer (aktuell)

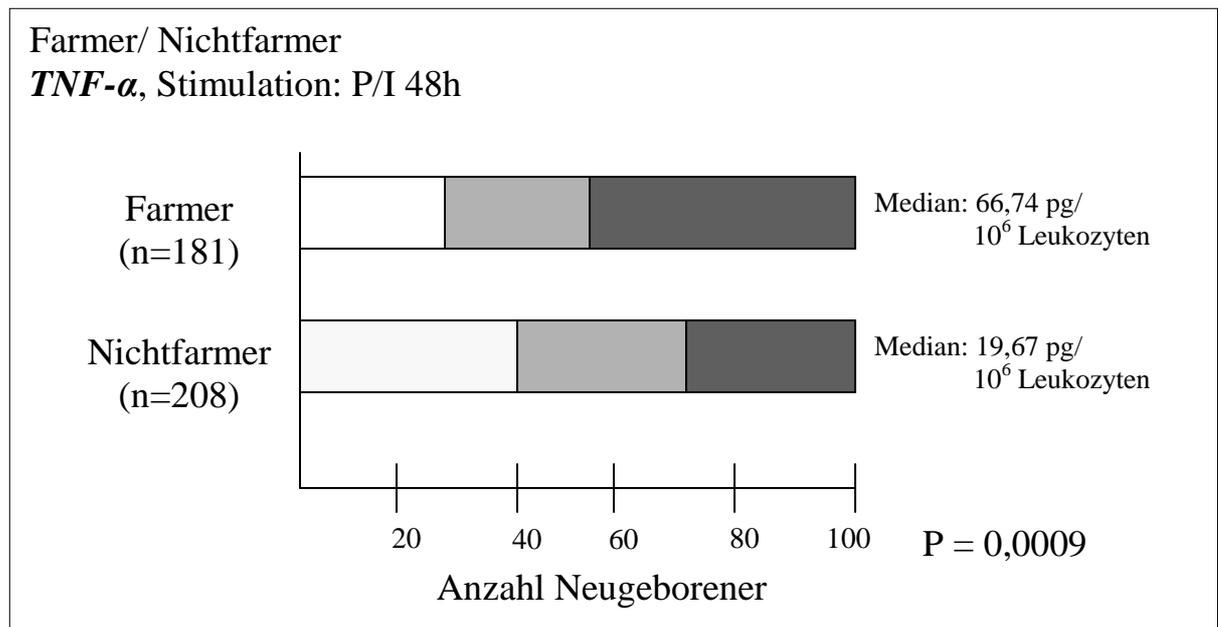


Abb. 2 Farmerkinder haben im Vergleich zu Nicht-Farmerkindern eine erhöhte *TNF-α*-Expression.

3.3 Der Kontakt zu Stalltieren ist mit hoher Produktion von *IFN-γ* und *TNF-α* assoziiert

Die Assoziation der Cytokinexpression von *IFN-γ* und *TNF-α* mit der Exposition der schwangeren Frau zur Stallumgebung zeigte zwei hochsignifikante Assoziationen nach P/I-Stimulation (48h).

Die Cytokinkonzentrationen von *IL-5*, *IL-10* und *IL-12* zeigten bei dieser Assoziation keine Signifikanzen.

Tabelle 2: Assoziation der Expositionsdauer mit der Stallumgebung während der Schwangerschaft

	LPS 24h	LPS 48h	P/I 24h	P/I 48h
IFN-γ	0,7751	0,0757	0,2649	0,0066**
IL-10	0,1608	0,3030	0,4249	0,4524
IL-12	0,3083	0,4547	0,6386	0,6504
IL-5	0,8732	0,3691	0,4387	0,6379
TNF-α	0,9519	0,9357	0,4706	0,0041**

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Expression der Cytokine *IFN-γ* (Abb.3) und *TNF-α* (Abb.4) in Assoziation zu der Expositionsdauer zur Stallumgebung während der Schwangerschaft (0 h/ weniger als 30 h und mehr als 30 h pro Monat).

Abbildung 3 zeigt eine Population von 278 Neugeborenen (140 Schwangere mit 0h/ Monat, 52 Schwangere mit weniger als 30h/ Monat und 86 Schwangere mit mehr als 30h/ Monat Exposition gegenüber der Stallumgebung).

Von den nicht mit der Stallumgebung exponierten Frauen (0h/ Monat) zeigte sich im Nabelschnurblut von 58 Neugeborenen eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 48 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 34 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 22,52 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Unter den weniger als 30h pro Monat mit der Stallumgebung exponierten Frauen zeigte sich im Nabelschnurblut von 22 Neugeborenen eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 13 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 17 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 16,56 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Bei den Neugeborenen, deren Mütter mehr als 30h pro Monat mit der Stallumgebung exponiert waren zeigten 23 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 27 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 36 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 77,76 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Dieses Ergebnis zeigt, dass hochsignifikant mehr Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft mit der Stallumgebung exponiert waren, hohe Konzentrationen an IFN- γ im Nabelschnurblut aufwiesen.

Abbildung 3: Assoziation der Expositionsdauer mit der Stallumgebung während der Schwangerschaft

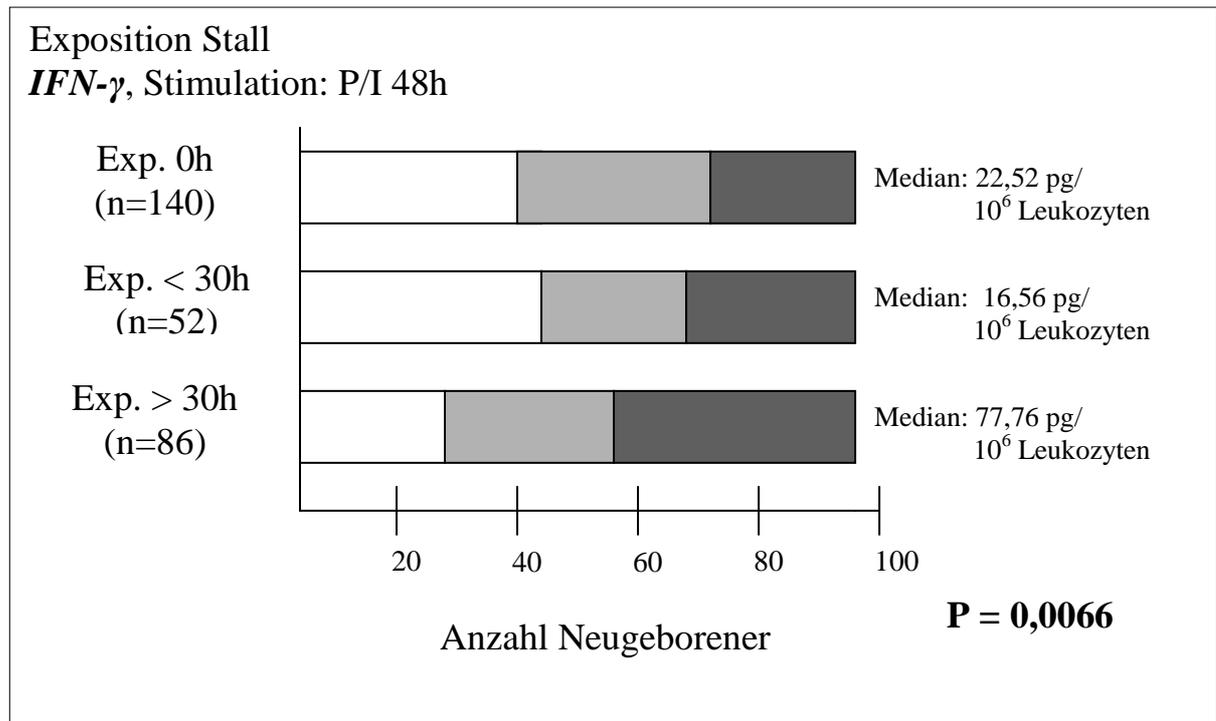


Abb. 3 Die Expositionsdauer mit der Stallumgebung während der Schwangerschaft ist mit einer erhöhten $IFN-\gamma$ -Expression im Nabelschnurblut assoziiert.

Abbildung 4 zeigt eine Population von 333 Neugeborenen (165 Schwangere mit 0h/ Monat, 56 Schwangere mit weniger als 30h/ Monat, 112 Schwangere mit mehr als 30h/ Monat Exposition gegenüber der Stallumgebung).

Von den nicht mit der Stallumgebung exponierten Frauen (0h/ Monat) zeigte sich im Nabelschnurblut von 63 Neugeborenen eine $TNF-\alpha$ -Konzentration von Null, bei 57 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 45 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 21,82 pg/ 10^6 Blutleukozyten).

Unter den weniger als 30h pro Monat mit der Stallumgebung exponierten Frauen zeigte sich im Nabelschnurblut von 17 Neugeborenen eine $IFN-\gamma$ -Konzentration von Null, bei 22 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 17 Neugeborenen war sie größer als Median (Median = 40,36 pg/ 10^6 Blutleukozyten).

Bei den Neugeborenen, deren Mütter mehr als 30h pro Monat mit der Stallumgebung exponiert waren, zeigten 26 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 33 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 52 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 92,64 pg/ 10⁶ Bluteukozyten).

Dieses Ergebnis zeigt, dass hochsignifikant mehr Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft mit der Stallumgebung exponiert waren, hohe Konzentrationen an TNF- α im Nabelschnurblut aufwiesen

Abbildung 4: Assoziation der Expositionsdauer mit der Stallumgebung während der Schwangerschaft

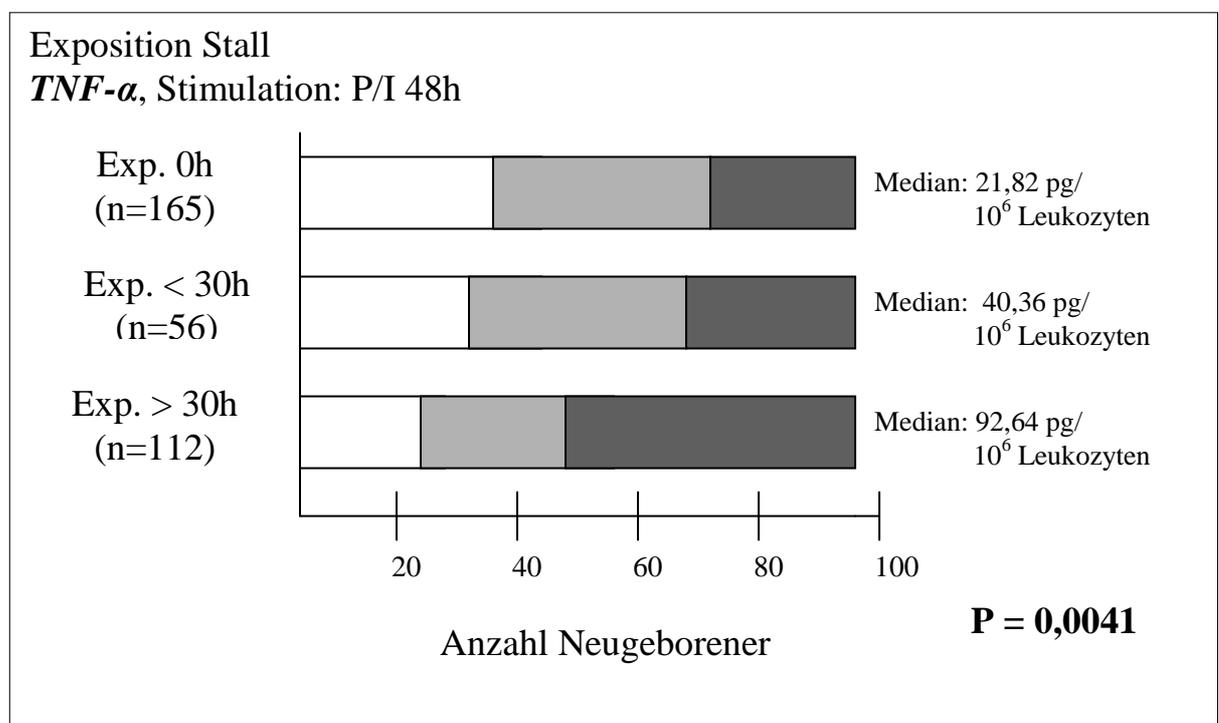


Abb. 4 Die Expositionsdauer mit der Stallumgebung während der Schwangerschaft ist mit einer erhöhten TNF- α -Expression im Nabelschnurblut assoziiert.

3.4 Die IFN- γ - und TNF- α -Konzentrationen im Blut Neugeborener, deren Mütter immer in der traditionellen Farmumgebung lebten, sind hochsignifikant erhöht

Die Assoziation der Cytokinexpression von IFN- γ und TNF- α mit dem historischen Status der Mutter, d.h. war sie schon immer Farmer bzw. Nichtfarmer (ever/ never) zeigte eine hochsignifikante und eine signifikante Assoziation nach P/I-Stimulation (48h) (Tabelle 3, Abb. 5 und 6).

Die Cytokinkonzentrationen von IL-5, IL-10 und IL-12 zeigten bei dieser Assoziation keine Signifikanzen.

Tabelle 3: Assoziation historischer Farmer-Status der Mutter

	LPS 24h	LPS 48h	P/I 24h	P/I 48h
IFN-γ	0,6664	0,8994	0,2279	0,0326*
IL-10	0,1325	0,3961	0,1917	0,6098
IL-12	0,4065	0,6602	0,4512	0,1877
IL-5	0,9263	0,5081	0,7047	0,8662
TNF-α	0,7350	0,5377	0,2427	0,0038**

Die Abbildungen 5 und 6 stellen die Expression der Cytokine IFN- γ (Abb.5) und TNF- α (Abb.6) in Assoziation zu dem Status Farmer/ Nichtfarmer (ever/ never) dar. In Abbildung 5 ist eine Population von 229 Neugeborener (100 ever, 129 never-Farmer) berücksichtigt.

Von den ever-Farmer-Neugeborenen zeigten 32 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 29 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 39 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 60,40 pg/10⁶ Blutleukozyten).

Von den never-Farmer-Neugeborener zeigten 53 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 46 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 30 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 27,41 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Dieses Ergebnis zeigt, dass signifikant mehr Kinder, deren Mütter immer in der traditionellen Farmerumgebung lebten, hohe Konzentrationen an IFN- γ im Nabelschnurblut aufwiesen.

Abbildung 5: Assoziation historischer Farmer-Status der Mutter

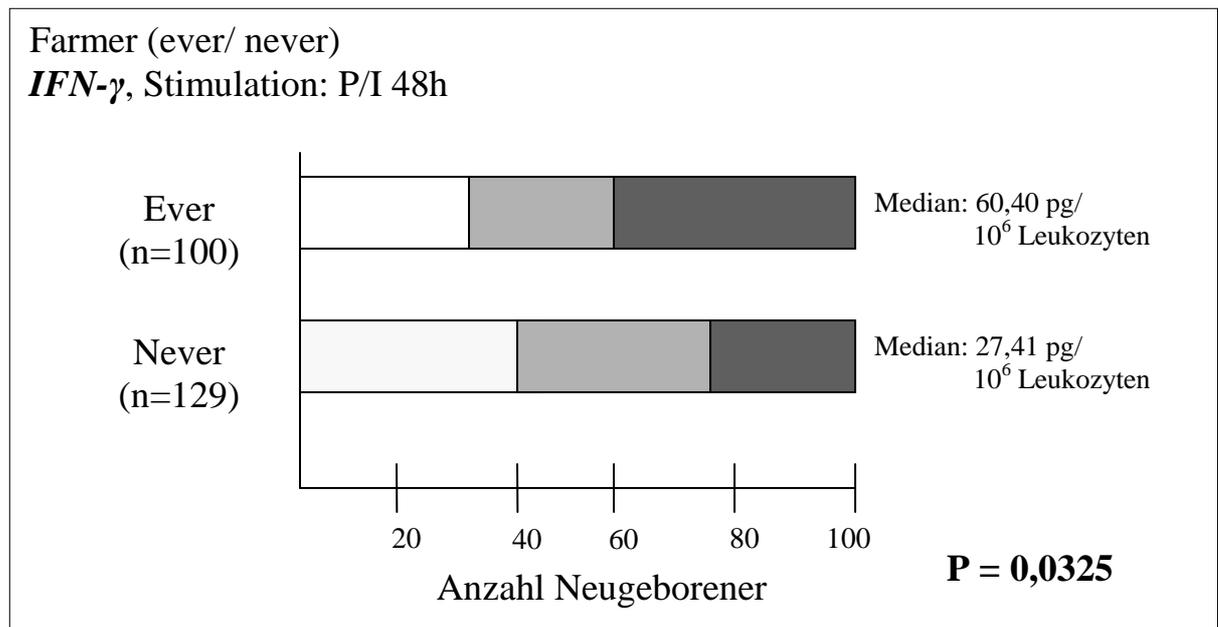


Abb. 5 Bei Kindern, deren Mütter immer in der traditionellen Farmumgebung lebten, ist die Konzentration an IFN- γ signifikant erhöht.

In Abbildung 6 ist eine Population von 263 Neugeborener (117 ever- und 146 never-Farmer) berücksichtigt.

Von den ever-Farmer-Neugeborenen zeigten 28 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 40 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 49 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 65,23 pg/10⁶ Blutleukozyten).

Von den never-Farmer-Neugeborener zeigten 61 Neugeborene eine IFN- γ -Konzentration von Null, bei 43 Neugeborenen war sie kleiner Median und bei 42 Neugeborenen war sie größer Median (Median = 20,91 pg/ 10⁶ Blutleukozyten).

Dieses Ergebnis zeigt, dass hochsignifikant mehr Kinder, deren Mütter immer in der traditionellen Farmerumgebung lebten, hohe Konzentrationen an TNF- α im Nabelschnurblut aufweisen.

Abbildung 6: Assoziation historischer Farmer-Status der Mutter

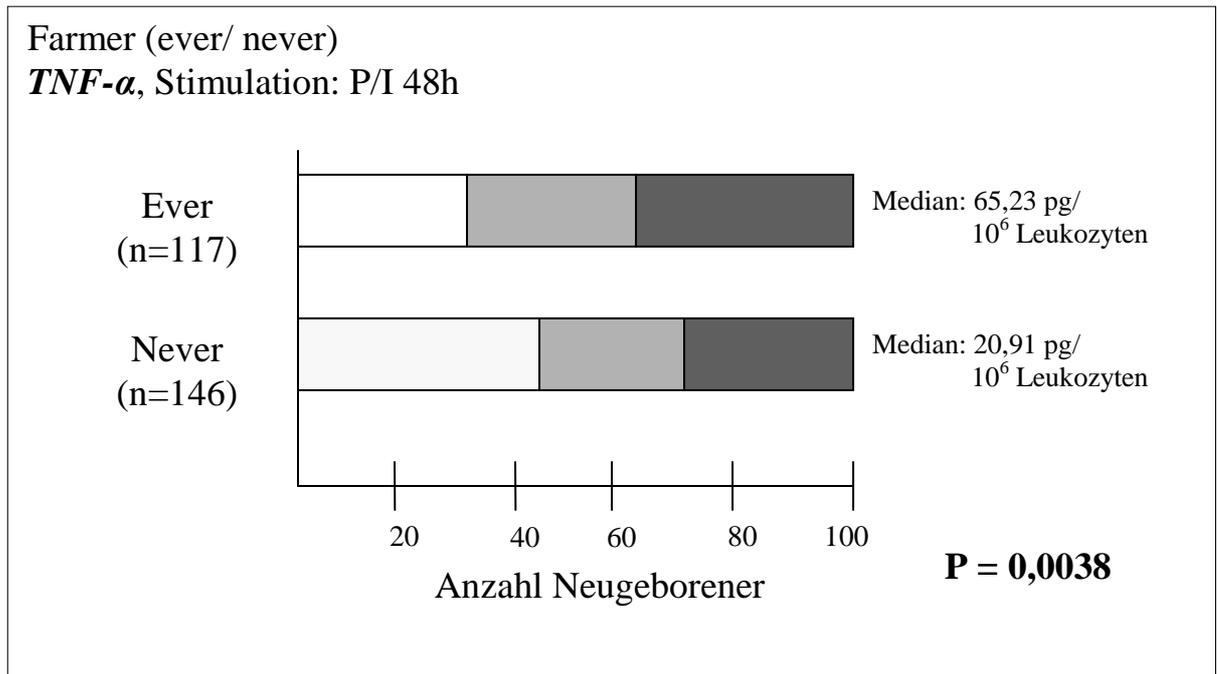


Abb. 6 Bei Kindern, deren Mütter immer in der traditionellen Farmumgebung lebten, ist die Konzentration an *TNF- α* hochsignifikant erhöht.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der TH1-/ TH2-/ TH3-Polarisierung von *in vitro*-stimulierten fetalen Nabelschnurblutzellen in Abhängigkeit von farmassozierten Umwelt-faktoren, denen die schwangere Mutter ausgesetzt war.

Die hierzu analysierte Studien-Population ist nur eine Teilpopulation der PASTURE-Studien-Kohorte. Mit 265 Nichtfarmer- und 233 Farmer-Neugeborener basieren die Ergebnisse jedoch auf einer statistisch abgesicherten Grundlage, die in ihrer Größe dem Vergleich anderer Studien standhält ^{38,30}.

Neugeborene immunologisch zu charakterisieren ermöglicht eventuell die frühzeitige Erkennung von Risikopopulationen. Die Charakterisierung der hierfür verantwortlichen Umweltfaktoren könnte zu einer effektiven Prävention führen ⁶⁰. Zwar sind eine Reihe von Risikofaktoren bekannt, die die Wahrscheinlichkeit erhöhen atopische Erkrankungen zu entwickeln, wie zum Beispiel eine vorhandene positive Familienanamnese oder ein erhöhter Serum-IgE-Wert. Diese sind aber wenig sensitiv und eignen sich deshalb nicht als Prädiktionsmarker ⁷⁴.

Die seit Ende der 90er Jahre formulierte These, dass Umweltfaktoren (pränatal und früh-postnatal) ¹⁰ und die Cytokinkonzentrationen von *in vitro* stimulierten Nabelschnurblutzellen ⁷⁰ einen prädiktiven Wert bezogen auf eine spätere Allergieentstehung haben, war die Grundlage der hier durchgeführten Arbeit.

4.1 Cytokine als Marker für eine spätere Allergieentwicklung

Mit der Beobachtung, dass die IFN- γ -Produktion im Nabelschnurblut der Neugeborenen erniedrigt ist, die später eine Allergie entwickeln, hat sich das Interesse an der Cytokinproduktion bei Geburt als einem prädiktiven Allergieparameter verstärkt. Obwohl eine erniedrigte Expression von IFN γ bei Allergikern inzwischen vielfach bestätigt und als allgemein gültig anerkannt ist, bleibt die Frage des zugrundeliegenden Mechanismus ³⁵. Aus verschiedenen Gründen wird zur Klärung dieser Frage das Augenmerk auf die früheste Kindheit gerichtet: einerseits wurde mehrfach der prädiktive Wert der erniedrigten IFN γ -Produktion von Nabelschnurblutzellen beschrieben ³⁸.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass es im Laufe der Schwangerschaft und frühesten Kindheit ein sensitives Fenster gibt, in welchem bevorzugt eine „Prädisposition zum Allergiker“ festgelegt wird ⁷⁰. Es wurde bereits gezeigt, dass das „Lebensumfeld“ bereits pränatal maßgebend an der Entwicklung atopischer Erkrankungen beteiligt ist ⁵⁷.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cytokinexpression der Farmer-Neugeborenen nach Stimulation mit P/I (48h) hochsignifikant in Richtung einer TH1-Immunantwort mit erhöhter IFN- γ - und TNF- α -Expression verschoben ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Untersuchungen ⁴⁵. Macaubas beschrieb in einer prospektiven Studie an 407 Kindern eine signifikante Assoziation zwischen erhöhten Nabelschnurblutcytokinen (hier IL-4, IFN- γ und TNF- α) bei Geburt und geringerer Allergieentwicklung im Alter von 6 Jahren. Gereda beschrieb eine positive Assoziation zwischen hohen Konzentrationen des Cytokins IFN- γ im peripheren Blut von 61 Farmer-Kleinkindern (9-24 Monate) und der erhöhten Exposition zu Endotoxinen (gram-), die in der Farmumgebung in hohen Konzentrationen vorliegen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des Immunsystems offenbar schon vor dem fünften Lebensjahr stattfindet und zwar vorzugsweise in Richtung einer TH1-Immunantwort ⁵⁴. Eine von Prescott veröffentlichte Arbeit untersuchte die Cytokinproduktion ab dem Zeitpunkt der Geburt über zwei Jahre in 6-monatigen Abständen ⁵⁴. Dabei zeigte sich, dass alle Kinder zum Zeitpunkt der Geburt ein TH2-Cytokinmuster aufwiesen. Dieses wurde jedoch bei Kindern ohne atopische Erkrankung während der ersten zwei Lebensjahre supprimiert, wohingegen es bei Kindern persistierte, die später eine Atopie entwickelten. Die Farmerumgebung verschiebt möglicherweise die T-Helferzellproduktion der Mutter. Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass es während der Schwangerschaft zu einer Verschiebung der T-Helferzellpopulation der Mutter mit einer vermehrten Produktion der TH2-Cytokine (IL4, IL5, IL10) und mit einer verminderten Produktion der TH1-Cytokine (IL2, TNF- α , IFN- γ) kommt ⁷⁵.

Wir können mit dieser Arbeit zeigen dass die Farmerumgebung bereits während der Schwangerschaft die Cytokinexpression und damit das TH1/TH2-Gleichgewicht beeinflusst.

4.2 Pränatale Beeinflussung der Allergieentwicklung durch die Umwelt

In der Literatur ist beschrieben, dass sich Umweltfaktoren des traditionellen Farmerumfeldes (Endotoxine, Allergenexposition, Nahrungsmittel, Infektionskrankheiten) auf die Regulation der Immunantwort auswirken.

Das Konzept der fetalen Programmierung, das davon ausgeht, dass Störungen der intrauterinen Umwelt des Feten zu dauerhaften Veränderungen fundamentaler Lebensprozesse im späteren Leben führen können, ist auch für die Allergieforschung ein wichtiger Ansatz geworden. Hierbei geht man davon aus, dass ein allergisches Milieu im Mutterleib die spätere Bereitschaft des Kindes, „allergisch zu reagieren“, deutlich erhöht. Als Ursache wird die ausbleibende Umstellung zu einer TH1-Immunantwort angesehen. Diese Umstellung erfolgt normalerweise im ersten Lebensjahr, die Weichenstellung dafür jedoch vermutlich schon während der Schwangerschaft.

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das traditionelle Farmerumfeld pränatal die Ausrichtung des Neugeborenen-Immunsystems beeinflusst.

Es gibt verschiedene Beobachtungen, die einen Einfluss pränataler Faktoren auf die spätere Allergieentwicklung denkbar erscheinen lassen.

a) Epidemiologische Evidenz

Viele Forscher beschäftigten sich mit möglichen Mechanismen, die die pränatale Wirkung von Umweltfaktoren erklären könnte. Häufig wurde dabei eine allergenspezifische T-Zell-Proliferation im Nabelschnurblut ⁶⁷ beobachtet. Dies führte zu der Hypothese, dass während der Schwangerschaft fetale T-Zellen Allergenen ausgesetzt sind, die von der Mutter durch Inhalation oder Ingestion aufgenommen wurden. Dieser Allergenkontakt soll bereits in einem sehr frühen Stadium der Schwangerschaft erfolgen (~20. SSW) ⁶⁶. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Allergenexposition in der Schwangerschaft und der Reaktivität der Nabelschnurblut-Zellen konnte dagegen nicht gezeigt werden ⁴⁹. Als mögliche Wege für die fetale Allergenexposition in der Schwangerschaft werden sowohl der Transfer von Allergenen über das Fruchtwasser als auch der Transfer über das Plazentagewebe diskutiert ²⁹. Szepfalusi et al. beschäftigte sich eingehend mit dem transplazentaren

Allergentransfer am Beispiel der Nahrungsmittelallergene Ovalbumin und β -Lactoglobulin sowie des Inhalations-allergens Bet v1 (Birkenpollenallergen) ⁶⁶.

In Perfusionsversuchen mit humanen Plazenten konnte in einem Ex-vivo-Modell der Transfer der untersuchten Allergene in die fetale Zirkulation nachgewiesen werden. Dabei war der Anteil der tatsächlich in das fetale Kompartiment gelangten Allergene allerdings gering. Es kommt zu einer Kumulation der Allergene im Plazentagewebe ⁶⁷. Diese Ergebnisse erklären möglicherweise auch den fehlenden direkten Zusammenhang zwischen der Allergenexposition in der Schwangerschaft und einer dosisabhängigen, allergen-spezifischen Zellreaktivität im Nabelschnurblut.

Der Befund dass Neugeborene von Müttern mit hoher Exposition gegenüber dem Stallmilieu bereits zum Zeitpunkt der Geburt eine hochsignifikante IFN- γ - und TNF- α -Produktion und damit eine Verschiebung in Richtung TH1-Antwort aufweisen, bestätigt die bisherigen Erkenntnisse einer intrauterinen Prägung der fetalen T-Zellantwort.

b) Mausmodelle

Ende der 90er-Jahre wurde ein Mausmodell entwickelt, mit dessen Hilfe der Einfluss einer mütterlichen Umweltexposition auf die Allergieentwicklung der Mausnachkommen untersucht wurde. In diesem Modell wurden weibliche Mäuse mittels intraperitonealer Injektionen mit dem Modellallergen Hühner-Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und im Anschluss mit nichtsensibilisierten Männchen verpaart. Während der Schwangerschaft erfolgte jeden zweiten Tag eine Exposition mit OVA-Aerosol. In den mononukleären Splenozyten der Nachkommen von OVA behandelten Muttermäusen war die Expression von IFN- γ deutlich vermindert, sodass ein relatives Übergewicht der TH2-Antwort vorlag ²⁷. In weiteren Versuchen wurde untersucht, wie die Nachkommen im Alter von 4 Wochen auf eine β -Laktoglobulin-Injektion reagieren. Zu diesem Zeitpunkt produzierten die Nachkommen der sensibilisierten Mütter bereits signifikant höhere Mengen an Gesamt-IgE als die der nichtsensibilisierten Muttertiere. Die Nachkommen der sensibilisierten Mäuse produzierten ebenfalls deutlich schneller und in höheren Konzentrationen spezifisches IgG1 gegen β -Laktoglobulin als die Kontrollgruppe. Dies Ergebnis zeigte, dass in Nachkommen allergischer Mütter die Induktion einer heterologen allergischen Sensibilisierung sehr viel stärker ausgeprägt war.

In einem weiteren Mausexperiment wurden schwangere Mäuse mit Endotoxin exponiert und die Allergieentwicklung der Nachkommen analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Nachkommen verstärkt IFN- γ bei gleichbleibender IL-4 und IL-2-Expression produzierten. Wenn die Nachkommen mit Ovalbumin sensibilisiert wurden, war deren TH2-Interleukin-Produktion (IL-5, IL-13) im Vergleich mit Nachkommen von LPS-exponierten Mäusen signifikant reduziert, ebenso wie die Produktion von spezifischem IgE und IgG1 gegen Ovalbumin. Parallel dazu waren allergisch-asthmatische Reaktionen reduziert ⁸. Eine Endotoxinexposition während der Schwangerschaft induziert eine TH1-Immunantwort in den Nachkommen.

c) Klinische Studien

Das zunehmende Interesse an der Frage der Prägung des kindlichen Immunsystems bereits vor der Geburt führte in den letzten Jahren zu klinischen Interventionsstudien. Die Supplementierung mit probiotischen Bakterien zählt mit Sicherheit zu den interessantesten, wenn auch nicht unumstrittenen Ansätzen zur frühen Allergieprävention. In einer Studie wurde untersucht, wie die Verabreichung des probiotischen Keimes *Lactobacillus GG* (LGG) ab der 36. SSW bis zur Geburt und 6 Monate darüber hinaus die Häufigkeit eines atopischen Ekzems bei Kindern aus Hochrisikofamilien beeinflusst. In dieser randomisierten, placebo-kontrollierten Studie sank die Ekzemp-häufigkeit bei den Kindern, deren Mütter LGG erhielten, im Alter von 2 Jahren um 50%, und nach 4 Jahren um 43% ³⁶.

Die antiinflammatorischen Eigenschaften von langkettigen, mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren machen diese Gruppe von Nahrungsfettsäuren auch in Hinblick auf eine pränatale Prävention allergischer Erkrankungen durch eine entsprechende Supplementierung in der Schwangerschaft interessant. Die Anzahl von Studien, die den Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die Entwicklung des fetalen/frühkindlichen Immunsystems untersuchen, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt relativ gering. Im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie wurde schwangeren Frauen aus Hochrisikofamilien ab der 20. SSW ein Fischölpräparat andererseits ein Placebo verabreicht.

Im Alter von einem Jahr zeigten die Kinder der Interventionsgruppe eine geringere Sensibilisierung gegen Ovalbumin, ausgeprägte Ekzeme traten seltener auf ¹⁶. Auch wenn es zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine Langzeitstudien zur Fischöl-

supplementierung in der Schwangerschaft gibt, unterstützen diese vorläufigen Ergebnisse das Konzept einer pränatalen Prävention allergischer Erkrankungen.

Allergenvermeidungsstudien, die durch eine gezielte Vermeidung oder Verringerung der Allergenexposition während der Schwangerschaft eine Senkung des Allergierisikos der Kinder aus Hochrisikofamilien zum Ziel hatten, führten nicht zum Erfolg. So konnten z.B. durch die prä- und postnatale Verringerung der Hausstaubmilbenexposition keine Unterschiede im allgemeinen Allergierisiko der Kinder im Alter von 3 Jahren im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Jedoch zeigten die Kinder aus Haushalten mit geringerer Hausstaubmilbenbelastung eine erhöhte Sensibilisierung gegen dieses Allergen ⁷⁶. Eine schwedische Studie untersuchte den Einfluss von diätetischen Einschränkungen auf die Allergieentwicklung bei Kindern aus Hochrisikofamilien. Hierbei führte der konsequente Verzicht auf Eier und Kuhmilch im letzten Trimester der Schwangerschaft zu einer verstärkten Hühnereiweißallergie bei den Kindern im Alter von 5 Jahren ¹⁷.

Diese Daten zeigen, dass die Schwangerschaft eine Phase darstellt, in der verschiedenste Umwelteinflüsse auf den Fetus wirken und dessen Risiko für eine spätere allergische Erkrankungen beeinflussen können. Verschiedene Substanzen, denen die Mutter während der Schwangerschaft exponiert ist, scheinen hierbei nach aktuellem Wissensstand einen protektiven Einfluss zu haben. Hierzu zählen z.B. probiotische Bakterien oder ω -3-Fettsäuren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Schlüsselfunktion des traditionellen Farmerumfeldes vor und während der Schwangerschaft in Bezug auf die Ausrichtung der T-Zell-Antwort des Neugeborenen hin. Gerade die hochsignifikanten Ergebnisse bei Assoziation der Cytokinexpression zu der Aufenthaltsdauer der Schwangeren im Stall lassen auf maßgebliche Komponenten im Stall (z.B. die Stalltiere) als Modulatoren der T-Zell-Immunantwort der Farmer-Neugeborenen in Richtung TH1-Antwort vermuten. Diese Cytokinexpressionsdaten bei Geburt müssen mit der späteren Allergieentwicklung des Kindes assoziiert werden, um Aussagen über eventuelle protektive Funktion der erhöhten TH1-Immunantwort treffen zu können.

5. Zusammenfassung

ZIELSETZUNG: Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der T-Zell-Antwort fetaler Nabelschnurblutzellen in Abhängigkeit von der Exposition der schwangeren Mutter zur traditionellen Farmumgebung im Vergleich zu nicht-farmexponierten Schwangeren.

METHODEN: Dazu wurden von 265 Nichtfarmer- und 233 Farmer-Neugeborener Nabelschnurblutproben gewonnen. Für die Bestimmung der Cytokine (IL-5, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ) wurden Nabelschnurblut-Zellkulturen mit PMA/Ionomycin (P/I) und Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert und für jeweils 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Cytokinkonzentration wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA bestimmt. Die Cytokinkonzentrationen wurden nachfolgend mit drei verschiedenen Variablen assoziiert: (1) dem aktuellen Lebensumfeld der Mutter (Farmer/ Nichtfarmer), (2) der Expositionsdauer der Schwangeren im Stall (nie/ weniger als 30h pro Monat/ mehr als 30h pro Monat) und (3) dem historischen Status der Mutter, d.h. ob sie schon immer im Farmumfeld gelebt hat (ever/ never).

ERGEBNISSE: Signifikant mehr Neugeborene von zum einen Farmer-Müttern und zum anderen Müttern mit einer hohen Exposition zum Stallmilieu während der Schwangerschaft zeigten eine hohe Produktion von IFN- γ und TNF- α und damit eine Verschiebung in Richtung einer TH1-basierten Immunantwort.

SCHLUSSFOLGERUNG: Das traditionelle Farmermilieu beeinflusst bereits pränatal die Entwicklung des fetalen Immunsystems in Richtung einer TH1-basierten Immunantwort. Besonders stark ist dieser Effekt, wenn die schwangere Mutter eine hohe Exposition zum Stall hatte, d.h. möglicherweise sind die „Stalltiere“ für den Effekt verantwortlich. Die Assoziation der frühen TH1-Antwort mit der späteren Allergieentwicklung des Kindes soll im nächsten Schritt den Zusammenhang zwischen der verschobenen Immunantwort und einer möglicherweise damit verbundenen Allergieprotektion klären.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1996 a) Immunologie. © Verlag Hans Huber, Bern
- 2 Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996 b) Funktional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature* 383: 787-793
- 3 Alfven, Braun-Fahrlander, Brunekreef, von Mutius, Riedler et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle ± the PARSIFAL study. *Allergy* 2006; 61: 414±421
- 4 Allanore Y, Hilliquin P, Coste J, Renoux M, Menkes CJ (1998) Decreased prevalence of atopy in rheumatoid arthritis. *Lancet* 351:497
- 5 Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL (2000) Siblings, day-care attendance, and the risk of Asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 343:538–543
- 6 Barnes PJ (2000). New directions in allergic diseases: mechanism-based anti-inflammatory Therapies. *J Allergy Clin Immunol* 106:5–16
- 7 Björkstén B (1994) Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* 49: 400-407
- 8 Bluemer N et al. (2005) Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental Asthma. *Clin Exp Allergy* 35: 397–402
- 9 Boyle RJ, Tang ML (2006) Can allergic diseases be prevented prenatally? *Allergy* 61: 1423–1431
- 10 Braun-Fahrlander et al Environmental exposure to endotoxin and its relation to Asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002: 347:869–77.
- 11 Bottomly K (1997) Induction of TH1 and TH2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15:297–322
- 13 Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H (2000) T regulatory cells 1 inhibit a TH2-specific response in vivo. *J Immunol* 165:4848–4853
- 14 Del Prete G (1998) the concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol* 16: 427-55
- 15 Douek IF, Leech NJ, Gillmor HA, Bingley PJ, Gale EA (1999) Children with type-1 diabetes and Their unaffected siblings have fewer symptoms of Asthma. *Lancet* 353:1850

- 16 Dunstan JA et al. (2003) Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 112: 1178–1184
- 17 Falth-Magnusson K, Kjellman NI (1992) Allergy prevention by maternal elimination diet during late pregnancy—a 5-year follow-up of a randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 89: 709–713
- 18 Faria AM, Weiner HL, Oral tolerance, *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:232-59. Review. PMID: 16048553
- 19 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor THAT inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 170: 2081-95
- 20 Flemming DM, Crombie DL (1987) Prevalence of Asthma and hay fever in England and Wales. *BMJ* 294 : 279-83
- 21 Garcia-Marcos LG, Gzilllen JJ, Dinwiddie R, Guillen A, Barbero P (1999) the relative importance of socio-economic status, parental smoking and air pollution (SO₂) on Asthma symptoms, spirometry and bronchodilator response in 11-year-old children. *Pediatr Allergy Immunol* 10: 96-100
- 22 Gereda (2000) High expression of IFN- γ is associated with low risk of atopy, *Lancet* 355,. 1680 \pm 1683
- 23 Hagendorens et al. (2003) High exposure to house dust mite is associated with a lower percentage of IFN- γ producing *Clinical & Experimental Allergy* 33:5, 633–639
- 24 Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT (1999) Allergen-specific TH1 cells fail to counterbalance TH2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103:175–183
- 25 Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, thorbecke GJ, Chen L, DeKruyff RH, Umetsu DT (2000) CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergeninduced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 105:61–70
- 26 Herz U, Gerhold K, Gruber C, Braun A, Wahn U, Renz H, Paul K (1998) BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol* 102:867–874
- 27 Herz U et al. (2000) Prenatal sensitization in a mouse model. *Am J Respir Crit Care Med* 162: S62–S65
- 28 Herz U et al. (2001) Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor the development of atopy in the neonate. *Int Arch Allergy Immunol* 124: 193–196

- 29 Holloway JA et al. (2000) Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet* 356: 1900–1902
- 30 Holt PG (1995 a) Environmental factors and priming T-cell sensitisation to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. *Pediatr Allergy Immunol* 6: 1-10
- 31 Holt PG, O'Keeffe PO, Holt BJ, Upham JW, Baron-Hay MJ, Suphioglu C, Knox B, Stewart GA, THomas WR, Sly PD (1995 c) T-cell "priming" against environmental allergens in human neonates: sequential deletion of food antigen reactivity during infancy with concomitant expansion of responses to ubiquitous inhalant allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 6: 85-90
- 32 Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra A (1995) the effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha betatransgenic model. *J Exp Med* 182: 1579-84
- 33 Huang SW (1999) Asthma and diabetes. *Lancet* 354:515
ISAAC Steering Committee (1998) Worldwide variation in prevalence of symptoms of Asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC, *Lancet* 1225-1232
- 34 Ishizaka K (1971) Mechanisms of reaginic Hypersensitivity. *Clin Allergy* 1:9-24
- 35 Jung T, Mechanisms of deficient interferon-gamma production in atopic diseases. *Clin Exp Allergy*. 1999 Jul;29(7):912-9. PMID: 10383591
- 36 Kalliomaki M et al. (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1869–1871
- 37 Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Kasahara K, Kameyama T, Iwasa S, Orii T (1992) Cord blood lymphocyte responses to antigens for the prediction of allergic disorders. *Arch Dis Child* 67(8): 1003-7
- 38 Kondo N, Kobiashi Y, Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yokohama Y (1998) Reduced interferon gamma production by antigenstimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders - 6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 28: 1340-1344
- 39 Koning H, Baerdt MR, Oranje AP, Savelkoul HF, Neijens HF (1996) Development of immune functions related to allergic mechanisms in young children. *Pediatr Res* 40: 363-75
- 40 Kopf M, Brombacher F; Köhler G, Kienzle G, Widmann KH, Lefrang K, Humborg C, Ledermann B, Sohlbach W., IL-4deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*, *J Exp Med* 1996, Sep 1;184(3):1127-36 PMID:9064329
- 41 Kramer MF, Rasp G (1999) Nasal polyposis: eosinophils and interleukin-5. *Allergy* 54: 669-680

- 42 Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Joetham A, Schwarze J, Kohler G, O'Brien R, Gelfand EW, Born W, Kanehiro A (1999) Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gamma delta T cells and independent of alpha beta T cells [published erratum appears in Nat Med 2000 6:229]. Nat Med 5:1150–1156
- 43 Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, et al. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. J Immunol 2001; 166: 5530–5539.
- 44 Lozano The economic burden of asthma in US children: estimates from the National Medical Expenditure Survey J Allergy Clin Immunol. 1999 Nov;104(5):957-63. PMID: 10550739
- 45 Macaubas et al. (2003) High concentrations of TNF were associated with lower risk of atopy Pediatrics, Mar 2007; 119: e716 - e723
- 46 Martinez FD (1999) Maturation of immune responses at the beginning of Asthma. J Allergy Clin Immunol 103:355–361
- 47 Mason D (1996) the role of B cells in the programming of T cells for IL4 Synthesis. J Exp Med 183: 717-9
- 48 Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R (1997) Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. BMJ 314:999–1003
- 49 Miller RL et al. (2001) Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort. Am J Respir Crit Care Med 164: 995–1001
- 50 Nilsson L, Castor O, Löfman O, Magnusson A, Kjellman N-IM (1999) Allergic disease in teenagers in relation to urban or rural residence at various stages of childhood. Allergy 54: 716-712
- 51 Ninan T, Russel G (1992) Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen school children: evidence from two surveys 25 years apart. BMJ 304 : 873-5
- 52 Oro AS, Guarino TJ, Driver R, Steinman L, Umetsu DT (1996) Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. J Allergy Clin Immunol 97:1402–1408
- 53 Piccinni MP, Mecacci F, Sampognaro S, Manetti R, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S (1993) Aeroallergen Sensitization Can Occur during Fetal Life. Int Arch Allergy Immunol 102: 301-303
- 54 Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG (1999) Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. Lancet 16:196-200

- 55 Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD (1999) Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific TH1 and TH2 cells in a mouse model of Asthma. *J Immunol* 162:2375–2383
- 56 Renz H (1995) the central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation. *Exp Dermatol* 4: 173-82
- 57 Riedler et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to Asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002: 347:869–77.
- 58 Schönberger HJAM, Van Schayck CP (1998) Prevention of Asthma in genetically predisposed children in primary care - from clinical efficacy to a feasible intervention programme. *Clin Exp Allergy* 28: 1325-1331
- 59 Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A (1996) Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 347:1792–1796
- 59 Sharpe 2003, *clin ex all* 33, AD The role of the ICOS-B7h T cell costimulatory pathway in transplantation immunity. *J Clin Invest.* 112:234-243
- 58a Sharpe TJ, Smith H, Effects of drugs on the acute inflammation following intraperitoneal injection of antigen into actively sensitised rats, *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1979;60(2):216-21. PMID: 89095
- 61 Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. the inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9
- 62 Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel (1996) Differentiation and Stability of Helper 1 and 2 Cells Derived from Naive Human Neonatal CD4+T Cells, Analyzed at THE Single-cell Level. *J Exp Med* 184: 473-483
- 63 Stachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 299: 1259-60
- 64 Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (TH1) and TH2 cells. *J Exp Med* 185:817–824
- 65 Szepefalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R, Herkner K, Urbanek R (1997) Prenatal allergen Contact with milk proteins. *Clin Exp Allergy* 27: 28-35
- 66 Szepefalusi Z, Loibichler C, Pichler J, Reisenberger K, Ebner C, Urbanek R (2000) Direct evidence for transplacental allergen transfer. *Pediatr Res* 48: 404-7
- 67 Szepefalusi Z et al. (2006) Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta. *Clin Exp Allergy* 36: 1130–1137

- 68 Tang 1995 Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-topical children with asthma *Clinical & Experimental Allergy* 25 (6), 515–521.
- 69 Trinchieri G (1995) Interleukin-12 : a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-76
- 70 Van Duren-Schmidt K, Pichler J, Ebner C, Bartmann P, Förster E, Urbanek R, Szefalusi Z (1997); Prenatal Contact with Inhalant Allergens. *Pediatric Research* 41: 128-131
- 71 Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000;30(2):187-93.
- 72 Von Mutius E (1998) the influence of birth order on the expression of atopy in families: a gene-environment interaction ? *Clin Exp Allergy* 28: 1454-1456
- 73 Wahn U, Seger R, Wahn V (1994) *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*. 2. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena , New York, S.213
- 74 Warner JO, Warner JA (1998 b) Markers of allergy & inflammation. *Pediatr Allergy Immunol* 9: 53-57
- 75 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14: 353-6
- 76 Woodcock A et al. (2004) Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization, and lung function at age 3 years. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 433–439
- 77 B. WÜTHRICH, E. BAUMANN, R. A. FRIES, U. W. SCHNYDER (1981) Total and specific IgE (RAST) in atopic twins *Clinical & Experimental Allergy* 11 (2), 147–154.

7. Materialübersicht

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
384-Well-Platte	384 well clear Maxisorp	NUNC A/S	065813
BM blue POD-Substrat	3,3'-5,5'- Tetra- methylbenzidin (TMB)	Roche Diagnostics Corporation	1484281
Desinfektionsmittel	Softasept	Reagenzienzentrale	00008171
Einfrier- Pappschachteln			
Eis			
ELISA-Reader	Tecan	GENios	
ELISA-Reader- Software	Magellan 3		
FCS	Fetal calf serum Gold	PAA Laboratories GmbH	
Fein-Waage			
Finnpipette	300 μ l (automatisch)	Labsystems	
Finnpipette	50-300 μ l (manuell/ mechanisch)	Labsystems	
H ₂ SO ₄	2 mmol/ l		
Handschuhe unsteril	Gr. 7		
Kühlschrank	-20 °C		
Kühlschrank	2-6 °C		
Kühlschrank	-80 °C		

Opt-EIA Kit IFN- γ	ELISA	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagent Standard	BD Biosciences Pharmingen	555142
Opt-EIA Kit IL-10	ELISA	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagent Standard	BD Biosciences Pharmingen	555157
Opt-EIA Kit IL-12	ELISA	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagent Standard	BD Biosciences Pharmingen	555171
Opt-EIA Kit IL-5	ELISA	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagent Standard	BD Biosciences Pharmingen	555202
Opt-EIA Kit TNF- α	ELISA	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagent Standard	BD Biosciences Pharmingen	555212
PBS		Dulbeccos' Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH	
Pipetten		“reference” 10-100 μ l (gelb) 0,5-10 μ l (grau) 50-200 μ l (gelb) “research“ 5000 μ l (lila)	Eppendorf	
Pipetten-Spitzen		Gelb Blau Lila Transparent		
Probenständer				

Reagiergefäße	Micro-Tubes Cryo-Tubes		
Schüttler			
Stiroporkiste			
Tween 20	Polyoxyethylene Sorbitant Monolaurate	Sigma	9005-64-5
Verschlussfilm	Parafilm		
Vortexer			
Wasserbad			

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jens Erwin Uffelmann
Adresse: Auf der Haide 16
35043 Marburg
Geburtsdatum und –ort: 14.12.1976 in Schlüchtern
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch
Familienstand: verheiratet
Kinder: Tochter, Katharina (geb. 23.08.2004),
Sohn, Jan (geb. 12.01.2007)

Ausbildung

08.1987-06.1996 Ulrich- von- Hutten- Gymnasium Schlüchtern
07.1996-07.1997 Zivildienst, DRK Rettungswache Schlüchtern
Ausbildung zum Bankkaufmann, Kreissparkasse
Schlüchtern
02.2000-09.2000 Anstellung als Bankkaufmann, Kreissparkasse
Schlüchtern
10.2000-09.2006 Studium der Humanmedizin, Phillips-Universität
Marburg
09.2002 Physikum
08.2003 1.Staatsexamen
09. 2005 2.Staatsexamen
11. 2006 3.Staatsexamen

Famulaturen

- 03.2003 Abt. für Kardiologie, Prof. Dr. B. Maisch,
Universitäts-Klinikum Marburg
- 09.2003 Allgemeinarzt- Praxis Dr. H. Meiß, Marburg
- 03.2004 Abt. für Klinische Chemie, Diabetes Prävention,
St. Georgen
- 03.2005 MZR- Strahlendiagnostik, Prof. Dr. K. J. Klose,
Universitätsklinikum Marburg

Praktisches Jahr

- 10.2005- 02.2006 Strahlendiagnostik, Nuklearmedizin und
Strahlentherapie,
MZR des Universitätsklinikums Marburg
- 02.2006- 05.2006 Abteilung für Gastroenterologie (Stat.124), Pulmologie/ Kardiologie (Stat. 222) und
Notfallbereich,
Universitätsklinikum Marburg
- 05.2006- 09.2006 Allgemeinchirurgie (Stat. 138), Unfallchirurgie (Stat.
136), Universitätsklinikum Marburg
- seit 01.07.2007 wissenschaftlicher Mitarbeiter (Arzt) in der Abteilung
für Allgemeinmedizin, Präventive und Rehabilitative
Medizin der Philipps-Universität Marburg

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Dr. Adamkiewicz	Prof. Dr. Krause
Prof. Dr. med. Arnold	Prof. Dr. Kretschmer
Prof. Dr. Barth	Prof. Dr. Krieg
Dr. Barth	Prof. Dr. Kroll
Prof. Dr. Dr. Basler	Prof. Dr. Lang
Prof. Dr. Baum	Prof. Dr. Lill
PD. Dr. Becker	Prof. Dr. med. Maisch
Prof. Dr. Christiansen	Dr. Dr. Mandrek
PD Dr. med. Dünne	Prof. Dr. Moll
Prof. Dr. Eilers	Prof. Dr. Dr. med. Mueller
Prof. Dr. Feuser	Dr. Müller
Prof. Dr. Fuchs	Prof. Dr. Mutters
PD Dr. med. Gerdes	Prof. Dr. Oertel
Prof. Dr. Geus	Prof. Dr. Dr. Remschmidt
Prof. Dr. med. Gotzen	Prof. Dr. Rothmund
Prof. Dr. Gudermann	Prof. Dr. med. Renz
Prof. Dr. med. Griss	Prof. Dr. Schmidt
PD. Dr. Hofbauer	Prof. Dr. Steiniger
PD Dr. Höffken	PD Dr. med. Stiletto
Prof. Dr. Hofmann	Prof. Dr. Studer
Prof. Dr. Jungclas	Prof. Dr. Vogelmeier
Prof. Dr. Kann	Dr. med. v. Garrel
Prof. Dr. Klose	Prof. Dr. Weihe
Prof. Dr. med. Klenk	Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Köhler	Prof. Dr. Wulf
Prof. Dr. Koolmann	

8.3 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich für die stets hilfsbereit-engagierten und freundlichen MitarbeiterInnen in und um das Arbeitsteam meiner Betreuerin Frau Dr. Nicole Blümer bedanken.

Insbesondere bei Verena Kräling, Stefan Kiontke, Brigitte Auffahrt, Steffi Achenbach, Anja Spieß, Nadine Müller und Annika Rühl. Die Zeit mit Euch war sehr schön.

Vielen Dank, Nicole, für Deine beispiellos-perfekte und gewissenhafte Betreuung. Besser kann es einem Doktoranden nicht gehen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Hilde und Gerhard Uffelmann, für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Danke, Herr Prof. Dr. H. Renz, dass ich meine Doktorarbeit in Ihrer Abteilung verfassen durfte und mir Infrastruktur und Materialien zur Verfügung gestellt wurden.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Differentielle TH1/ TH2-Immunantwort von Neugeborenen aus der Farmerumgebung im Vergleich zu Nichtfarmern“ in dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie und Molekularer Diagnostik der Phillips-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. H. Renz mit Unterstützung durch Frau Dr. Nicole Blümer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit wurde nicht veröffentlicht.

Ort:

Datum:

Unterschrift: