

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

***Einfluss der Th1- und Th2-Zellen in der frühen Immunmaturation
auf allergische Erkrankungen im Kindesalter:
Schutz vor allergischer Sensibilisierung bei Bauernhofexposition***

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

**vorgelegt von
Elisabeth Sabine Klucker**

**aus
Garmisch-Partenkirchen**

2019

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

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Bianca Schaub

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Wollenberg
Prof. Dr. Katja Radon**

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2019

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historischer Hintergrund.....	1
1.2	Grundlagen des Immunsystems	2
1.2.1	Angeborenes Immunsystem	3
1.2.2	Adaptives Immunsystem	3
1.2.3	T-Lymphozyten	4
1.2.3.1	T-Zell Subpopulationen	4
1.2.3.2	Th1-Zellen.....	5
1.2.3.3	Th2-Zellen.....	6
1.2.3.4	Th1/Th2 Paradigma	6
1.2.4	Pathogenese der allergischen Reaktion	6
1.3	Allergische Erkrankungen im Kindesalter	8
1.3.1	Epidemiologie	8
1.3.2	Einfluss mikrobieller Stimulation auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter	8
1.4	Zielsetzung	10
1.5	Arbeitsbeschreibung dieser Dissertation	11
2	Datenerhebung und Methoden	11
2.1	Probanden.....	11
2.1.1	Rekrutierung der Studienteilnehmer	11
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	11
2.2	Epidemiologische Datenerhebung.....	12
2.2.1	Fragebögen	12
2.2.1.1	Fragebogen bei Geburt.....	12
2.2.1.2	Fragebögen im Alter von drei, sechs und zehn Jahren	12
2.3	Verwendete Laborgeräte	13
2.4	Verbrauchsmaterialien	13
2.5	Reagenzien	14
2.6	Software	15
2.7	Labormethoden.....	15
2.7.1	IgE-Bestimmung im mütterlichen Blut.....	15
2.7.2	Zellisolation und -stimulation	15
2.7.3	RNA-Extraktion, Konzentrationsmessung und Transkription	16

2.7.3.1	RNA-Extraktion	16
2.7.3.2	Messung der RNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie.....	16
2.7.3.3	Transkription.....	16
2.7.4	Quantitative real-time Reverse-Transkriptase PCR (real-time RT-PCR)	17
2.7.4.1	Grundlegendes zur Methode	17
2.7.4.2	Primer: Auswahl und Design	18
2.7.4.2.1	Primer-Design.....	19
2.7.4.2.2	Charakteristika der verwendeten Primer	19
2.7.4.3	Pipettierschema	29
2.7.4.4	Vorbereitung der real-time RT-PCR.....	30
2.7.4.5	Real-time RT-PCR Ansatz.....	31
2.7.4.6	Durchführung der real-time RT-PCR	31
2.7.5	Gel-Elektrophorese.....	32
2.8	Auswertung der real-time RT-PCR.....	35
2.9	Zytokine	37
2.9.1	Interleukin-5	37
2.9.2	Interleukin-6	38
2.9.3	Interleukin-12	38
3	Statistische Methoden	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Epidemiologie	40
4.1.1	Charakteristika der PAULCHEN-Studienpopulation	40
4.2	Real-time RT-PCR	42
4.2.1	Th1-assoziierte Gene.....	43
4.2.1.1	Tbet	43
4.2.1.2	HLX1	43
4.2.1.3	IRF1	44
4.2.2	Th2-assoziierte Gene.....	44
4.2.2.1	GATA3	44
4.2.2.2	STAT6.....	45
4.2.2.3	STAT6d.....	45
4.2.2.4	STAT6e.....	46
4.2.3	Andere Gene.....	46
4.2.3.1	IL-9	46

4.2.4	Zusammenfassung der Hauptergebnisse der real-time RT-PCR Daten	47
4.2.5	Th1-Th2 Ratio	48
4.3	Korrelationsanalysen Gen-Expression	49
4.3.1	Korrelationsanalysen in der real-time RT-PCR Gesamtpopulation	49
4.3.2	Korrelationsanalysen in der Subgruppe der Nicht-Bauernkinder	51
4.3.3	Korrelationsanalysen in der Subgruppe der Bauernkinder	53
4.4	Zytokin-Sekretion.....	55
4.5	Verlaufsbeobachtung der Studienpopulation	55
4.5.1	Bauernhof-Exposition	55
4.5.2	Familienanamnese	56
4.5.3	Entwicklung pfeifender Atemgeräusche (<i>wheeze</i>).....	58
5	Diskussion	60
5.1	Epidemiologie bei Geburt	60
5.2	Erniedrigte Genexpression zentraler Th1- und Th2-assoziierter Transkriptionsfaktoren im Nabelschnurblut von Bauernkindern.....	61
5.2.1	Th1-assozierte Gene: Tbet, HLX1, IRF1	61
5.2.2	Th2-assozierte Gene: GATA3, STAT6, STAT6d, STAT6e.....	61
5.2.3	IL9	62
5.2.4	Fazit real-time RT-PCR	62
5.3	„Allergie-protective“ Prägung des Immunsystems anhand der Zytokin-Sekretion im Nabelschnurblut	63
5.3.1	Interleukin-5	63
5.3.2	Interleukin-6.....	64
5.3.3	Interleukin-12	65
5.3.4	Fazit Zytokin-Sekretion.....	65
5.4	Verlaufsbeobachtung über zehn Jahre.....	65
5.4.1	Bauernhofexposition und Reduktion der allergischen Sensibilisierung	65
5.4.2	Entwicklung pfeifender Atemgeräusche und Assoziation mit einer allergischen Sensibilisierung	66
5.5	Schlussfolgerung	67
6	Zusammenfassung	69
7	Abkürzungen und Begriffserläuterungen	72
8	Anhang	74
8.1	Einverständniserklärung	74
8.2	Fragebogen bei Studieneinschluss	75

8.3	Fragebogen zum 3. Lebensjahr	83
8.4	Fragebogen zum 6. Lebensjahr	98
8.5	Fragebogen zum 10. Lebensjahr	114
8.6	Spezifisches IgE	131
8.7	Protokolle	132
8.7.1	Zellisolation und Zellstimulation	132
8.7.2	RNA-Extraktion	135
8.7.3	Reverse Transkription	136
8.7.4	Quantitative real-time RT-PCR.....	136
8.7.5	Gießen eines Agarose Gels	137
8.7.6	Gelelektrophorese.....	138
8.7.7	Zytokin-Messung	138
8.8	Detektionsrate der real-time RT-PCR.....	140
9	Quellenverzeichnis	141
9.1	Literaturverzeichnis.....	141
9.2	Abbildungsverzeichnis	149
9.3	Tabellenverzeichnis.....	150
10	Danksagung.....	152
11	Lebenslauf	153

1 EINLEITUNG

1.1 Historischer Hintergrund

Clemens Peter Freiherr von Pirquet führte im Jahr 1906 den Begriff der Allergie in die medizinische Fachsprache ein. Aus dem Griechischen ἄλλος abgeleitet, was ursprünglich „anders“ oder „verschieden“ bedeutet (Gemoll, 2006), definierte von Pirquet die Allergie ganz allgemein als veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus auf bestimmte Reize (Turk, 1987). Heute beschreiben Wahn et al. die Allergie als „Folge einer Exposition gegenüber Antigenen, welche bereits zu einem früheren Zeitpunkt zur Bildung spezifischer IgE-Antikörper geführt hatten“. Über Bindung des Antikörpers an Mastzellen und Granulozyten kommt es zu deren Aktivierung und damit zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren, beispielsweise Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen.

Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis und Nahrungsmittelallergien bilden die Erkrankungen des allergischen Formenkreises (Wahn, 2005). Mehrere Jahrhunderte vor der Einführung des Begriffs der Allergie wurden allerdings bereits Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis beschrieben. Als „Erstbeschreibung einer atopischen Familienanamnese“ des julisch-claudischen Kaiserhauses bezeichnet Prof. Dr. Dr. Johannes Ring die Aufzeichnungen Suetons und Plinius des Jüngeren aus dem ersten Jahrhundert nach Christus: Die beschriebenen Symptome des Kaisers Augustus deuten auf eine typische atopische Trias aus Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis und atopischer Dermatitis hin. Augustus' Großneffe Claudius litt wohl an einer Rhinokonjunktivitis und wiederum dessen Sohn Britannicus zeigte Symptome einer Pferdehaarallergie (Ring, 1985). Es findet sich eine Vielzahl weiterer historischer Aufzeichnungen, welche die Symptome allergischer Erkrankungen beschreiben. Insofern stehen allergische Erkrankungen bereits seit der Antike im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.



Abbildung 1: Clemens Freiherr von Pirquet (Turk, 1987)

1.2 Grundlagen des Immunsystems

Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in die Grundlagen des Immunsystems gegeben werden, wobei der Schwerpunkt auf die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Th1- und Th2-Zellen gelegt wird.

Grundlegend wird zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem erworbenen Immunsystem unterschieden. Beide Systeme beruhen auf zellulären und humoralen Anteilen, die in gegenseitiger Wechselwirkung agieren. Zusätzlich zur Abwehrfunktion unter anderem gegen mikrobielle Erreger kann das Immunsystem auch im Rahmen einer Überempfindlichkeitsreaktion seine Aktivität gegen körpereigene Zellen oder Gewebe richten, beispielsweise im Rahmen einer allergischen Reaktion (Palm et al., 2012). Die Pathogenese einer allergischen Reaktion wird im Folgenden nach einem kurzen Überblick über das angeborene und adaptive Immunsystem detaillierter beschrieben.

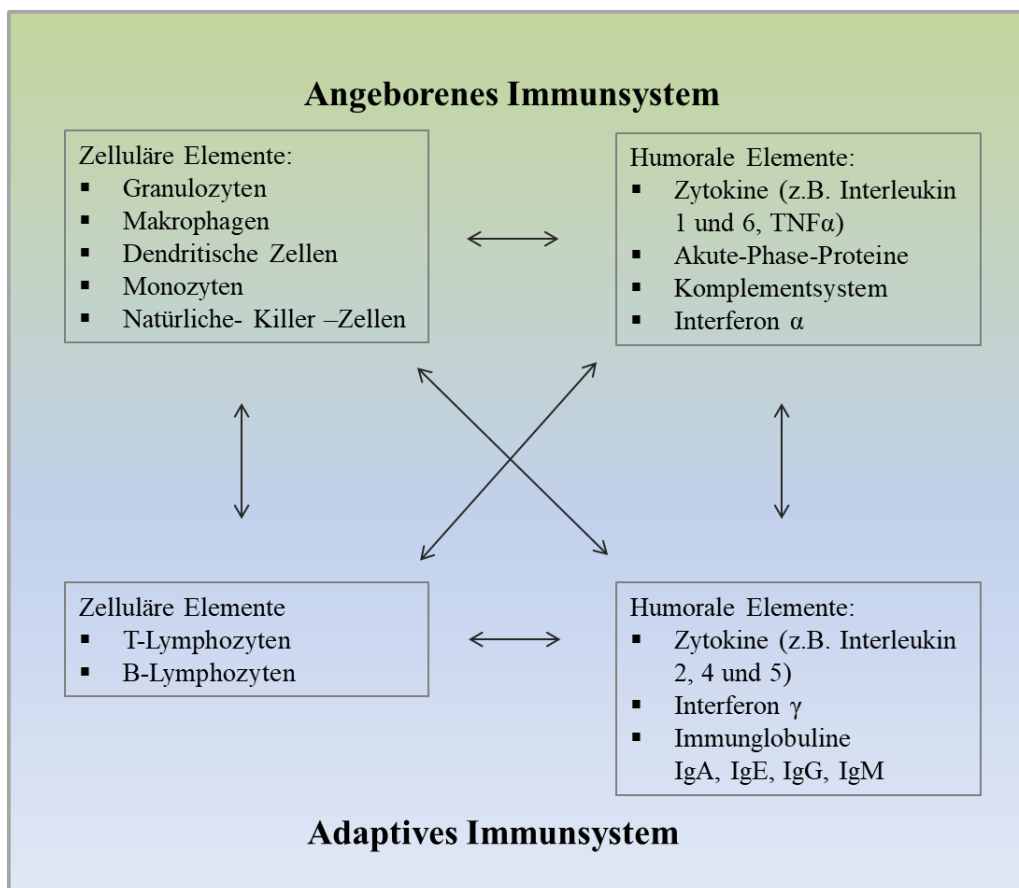


Abbildung 2: Überblick Immunsystem (Renz-Polster, 2004, Raedler and Schaub, 2014), modifiziert.

1.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem hat die primäre Funktion, einen Erreger zu beseitigen, und koordiniert bei Bedarf die Rekrutierung antigen-spezifischer Zellen des erworbenen Immunsystems. Es ist für die rasche Immunantwort zuständig. Zum angeborenen Immunsystem gehören physikalische Barrieren wie die Haut und die Schleimhäute, aber auch zelluläre (Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten, natürliche Killerzellen) und humorale (Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen gebildete Zytokine, Interferon- α) Bestandteile (Murphy, 2008). Das angeborene Immunsystem wird auch als unspezifisches Immunsystem bezeichnet, da es sich nicht an die spezifischen Gegebenheiten des Pathogens adaptiert (Wahn, 2005).

1.2.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird auch spezifisches Immunsystem genannt. Es reagiert zeitverzögert zur angeborenen Immunantwort und hat die Fähigkeit, zelluläre Rezeptoren und Antikörper zu bilden, die spezifisch an ein Antigen binden. So ermöglicht es zum einen eine gezielte Bekämpfung der Antigene durch humorale und zelluläre Faktoren, zum anderen können über die spezifische Antigenerkennung auch die Mitspieler des angeborenen Immunsystems auf den Erreger gelenkt werden, was zu einer Effektivitätssteigerung des angeborenen Immunsystems führt. Außerdem kann das adaptive Immunsystem ein erregerspezifisches Gedächtnis entwickeln (Iwasaki and Medzhitov, 2015). Neben physikalischen Barrieren wie dem Haut- und Schleimhaut-assoziierten lymphatischem Gewebe umfasst das adaptive Immunsystem zelluläre (B- und T-Lymphozyten) und humorale (Antikörper, von Lymphozyten gebildete Zytokine und Interferon- γ) Faktoren (Wahn, 2005).

Bei einer Reaktion des adaptiven Immunsystems wird eine Kaskade verschiedener Reaktionen in Gang gesetzt: Zunächst wird von den Zellen des angeborenen Immunsystems komplexes Fremdmaterial vorprozessiert. Dies bedeutet, dass das Fremdmaterial in einzelne Peptid-Bestandteile (Antigene) zerlegt wird. Anschließend wird das prozessierte Antigen an MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen gebunden und den T-Lymphozyten präsentiert. Durch den Kontakt der antigenpräsentierenden Zelle mit dem T-Zell-Antigenrezeptor werden aus den vormals naiven T-Zellen die T-Helferzellen, welche wiederum über Zytokine und Zell-zu-Zell-Kontakte andere Zellen wie beispielsweise die B-Lymphozyten rekrutieren. Die B-Lymphozyten starten daraufhin über klonale Expansion die Antikörperbildung. Im letzten Schritt erfolgt dann die Antigeneliminierung. Zum einen kann direkt eine Bindung des Antigens durch Antikörper erfolgen, zum anderen können andere Effektorzellen wie beispielsweise Eosinophile, natürliche Killerzellen oder zytotoxische T-Zellen durch die T-Helferzellen rekrutiert und dadurch die Antigeneliminierung eingeleitet werden (Renz-Polster, 2004).

1.2.3 T-Lymphozyten

Ursprung der T-Lymphozyten sind die lymphoiden Stammzellen des Knochenmarks, die Reifung erfolgt allerdings im Thymus. Sie exprimieren auf ihrer Zellmembran den T-Zell-Rezeptor und ein *Cluster of Differentiation 3* (CD3-) Molekül. Über den T-Zell-Rezeptor können in Peptide zerlegte Antigene, die jeweils an ein MHC-Molekül gebunden sind, erkannt werden. Über positive und negative Selektion werden T-Zellen mit unterschiedlicher Effektorfunktion ausgebildet. Anhand der Oberflächenmarker erfolgt die Einteilung in CD4+ und CD8+ T-Zellen (Murphy, 2008). Typischerweise sind beispielsweise die T-Helferzellen zumeist CD4+ und erkennen an MHC-II gebundene Peptide, die zytotoxischen T-Zellen sind CD8+ (Kamradt and Ferrari-Kuhne, 2011). Wichtig ist allerdings zu erwähnen, dass sich diese ursprüngliche Form der Einteilung auf die häufigste Korrelation zwischen T-Zell Phänotyp und der T-Zell Funktion bezieht. In der Literatur ist mittlerweile zum einen das gleichzeitige Auftreten beider Oberflächenmarker (Parel and Chizzolini, 2004) beschrieben und zum anderen auch eine Vielzahl an weiteren Oberflächenmarkern (Engel et al., 2015), die eine feinere Differenzierung der T-Lymphozyten erlaubt.

1.2.3.1 T-Zell Subpopulationen

Zytotoxische T-Zellen erkennen und eliminieren Zellen anhand erregertypischer Antigene. Die T-Gedächtniszellen können zu einem späteren Zeitpunkt bei erneutem Antigenkontakt eine effizientere und schnellere Sekundärantwort vermitteln (Wahn, 2005). Die folliculären T-Helferzellen (Tfh-Zellen) steuern die Immunglobulinsekretion der B-Lymphozyten (Crotty, 2014). Eine wichtige Subgruppe bilden die T-Helferzellen, die sich in weitere Untergruppen aufteilen, wie beispielsweise Th-1, Th-2, Th-9 und Th-17 Zellen. Sie sind für die Antigenerkennung zuständig und leiten dann die Immunantwort ein (Averbeck et al., 2007). Die T-Helferzellen sind Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte, so dass immer wieder neue Untergruppen entdeckt und weiter analysiert werden. Eine weitere wichtige Untergruppe der T-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese spielen eine entscheidende Rolle als Kontrollinstanz in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2002). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Effektivität der regulatorischen T-Zellen als Gegenregulator bei einer allergischen Reaktion bei Patienten mit atopischen Erkrankungen insbesondere während der Pollensaison reduziert ist (Grindebacke et al., 2004). Im peripheren Blut von Kindern mit einer aktiven Nahrungsmittelallergie sind die regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu Kindern mit einer ausgeheilten Nahrungsmittelallergie vermindert (Karlsson et al., 2004). All diese Beobachtungen sprechen für eine entscheidende Rolle der regulatorischen T-Zellen in der Genese und Aktivität atopischer Erkrankungen (Robinson, 2009).

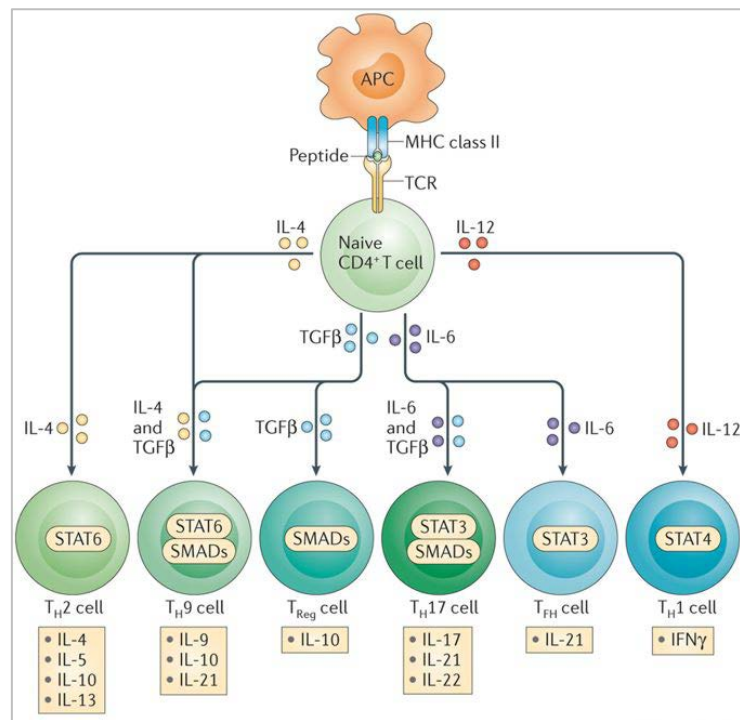


Abbildung 3: T-Zell-Reihen mit Fokus auf die Untergruppen der T-Helferzellen (Kaplan et al., 2015)

Eine zentrale Rolle in der frühen Immunmaturation spielen die Th1- und die Th2-Zellen, auf die auch der Fokus in dieser Dissertation gelegt wird. Weitere Zellreihen wie beispielsweise die regulatorischen T-Zellen stehen nicht im Mittelpunkt dieser Arbeit, es gilt aber zu berücksichtigen, dass diese in der Immunentwicklung und in der Pathogenese allergischer Erkrankungen und deren Regulation eine entscheidende Rolle spielen. Zu Beginn dieser Dissertation war deren Bedeutung in der frühen Immunentwicklung und insbesondere in der Allergieprävention im Nabelschnurblut noch kaum untersucht, so dass das Augenmerk auf die Th1- und Th2-Zellen bei der frühen Immunmaturation gelegt wurde. Deshalb werden diese beiden Subgruppen im weiteren Verlauf genauer dargestellt.

1.2.3.2 Th1-Zellen

Die Typ1-T-Helferzellen, kurz Th1-Zellen, sind für die zellvermittelte Immunantwort in der Abwehr von Viren, intrazellulären Bakterien und Protozoen zuständig. Erst mehrere Stunden nach Aktivierung durch entsprechende Antigene sind diese in ausreichender Anzahl vorhanden, so dass sie für die Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp zuständig sind. Durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interferon- γ , Interleukin-2 und TNF- α wird die im Rahmen der Immunreaktion auftretende Entzündungsreaktion gesteuert. Dabei werden weitere immunologische Effektorzellen wie beispielsweise Monozyten, Granulozyten und Makrophagen an den Entzündungsort rekrutiert und aktiviert. Die Makrophagen wiederum können durch Sekretion von Interleukin-12 im Sinne einer positiven Verstärkung zur weiteren Polarisierung der naiven T-Zelle in Th1-Zellen beitragen und verbessern gleichzeitig ihre eigene mikrobielle Aktivität durch Hochregulation ihrer Oberflächenmoleküle wie beispielsweise den MHC-II Molekülen. Die entstehende Entzündungsreaktion führt zu einer Gefäßdilatation und damit zu vermehrter Durchblutung im Gewebe sowie zur Bildung von Fibrin, das eine weitere Ausdehnung der Entzündungsreaktion eindämmt. Außerdem wird unter anderem über Interferon- γ das Wachstum und die Differenzierung der B-Lymphozyten sti-

muliert (Wahn, 2005). Die Th1-Zellen spielen eine wichtige protektive Rolle bei der Entstehung allergischer Erkrankungen als Gegenspieler der Th2-Zellen (Schuijs et al., 2015).

1.2.3.3 Th2-Zellen

Die Typ2-T-Helferzellen, kurz Th2-Zellen, steuern die humoral vermittelte Immunantwort durch Stimulation der B-Lymphozyten, was letztlich zur Synthese von Antikörpern führt, sowie durch Stimulation der Mastzellen und eosinophilen Granulozyten. Sie produzieren die Zytokine Interleukin-4, -5, -6, -10, -13, welche die Immunglobulinsekretion stimulieren. Interleukin-4 und Interleukin-5 sind beispielsweise entscheidend für den Klassenwechsel hin zu IgE (Kamradt and Ferrari-Kuhne, 2011).

1.2.3.4 Th1/Th2 Paradigma

Im Th1/Th2 Paradigma wurde bereits Ende der 80er Jahre eine Imbalance zwischen Th1- und Th2-Zellen zu Gunsten der Th2-Zellen und damit ein Überwiegen der Th2-gesteuerten Immunreaktion bei zeitgleich abgeschwächter Th1-Immunreaktion als Schlüsselfaktor der Allergieentwicklung beschrieben (Mosmann and Coffman, 1989). Diese Th1/Th2-Imbalance ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte, unter anderem in therapeutischen Ansätzen zur Allergietherapie durch Induktion der Th1- und Hemmung der Th2-Zellen bzw. deren Zytokine. Allerdings werden in aktuellen Forschungsprojekten auch andere T-Zellreihen, insbesondere die regulatorischen T-Zellen, und ihr Anteil an der Entstehung von allergischen Erkrankungen sowie die daraus resultierenden therapeutischen Optionen untersucht (Vissers et al., 2004, Akkaya et al., 2019), so dass sicher nicht von einer reinen Th1/Th2-Imbalance in der Pathogenese allergischer Erkrankungen auszugehen ist (van Oosterhout and Motta, 2005). Es ist jedoch klar, dass ohne diese Th1/Th2-Imbalance eine Entstehung allergischer Erkrankungen nicht möglich ist. Die Th1-Zellen sind initial entscheidend an der Allergieentstehung beteiligt und können während der Allergiemanifestation eine Gegenregulation zur Th2-Immunantwort darstellen. Die Th2-Zellen sind bei allergischen Erkrankungen stimuliert und stehen auch im Fokus des Interesses bei der Entwicklung neuer Therapieformen wie zum Beispiel der Antikörpertherapie mit Anti-IL-5, einem typischen Th2-Zytokin (Farne et al., 2017). Seit 2018 ist Anti-IL-5 in Form des Antikörpers Mepolizumab auch bei Kindern ab dem sechsten Lebensjahr mit schwerem, therapierefraktärem Asthma bronchiale zugelassen (Just et al., 2019).

1.2.4 Pathogenese der allergischen Reaktion

Die klassische allergische Reaktion ist eine Überempfindlichkeitsreaktion Typ I nach Gell und Coombs. Sie ist das Resultat einer Exposition gegenüber Antigenen, die schon zu einem früheren Zeitpunkt zur Bildung spezifischer IgE-Antikörper geführt haben (Wahn, 2005). Dieser Antikörperbildung als Antwort auf eine Allergenexposition liegt eine genetische Prädisposition zu Grunde. Es wurden bereits mehrere Kandidatenloci beschrieben: So scheint beispielsweise die Bereitschaft, auf inhalative Allergene mit einer IgE-Antwort im Rahmen einer bronchialen Hyperreagibilität zu reagieren, auf Chromosom 5 (5q31 bis 5q32) vererbt zu werden (Marsh et al., 1994). Diese Region kodiert auch für diverse Zytokine, die an einer allergischen Immunantwort beteiligt sind, beispielsweise Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-9 (Wahn, 2005).

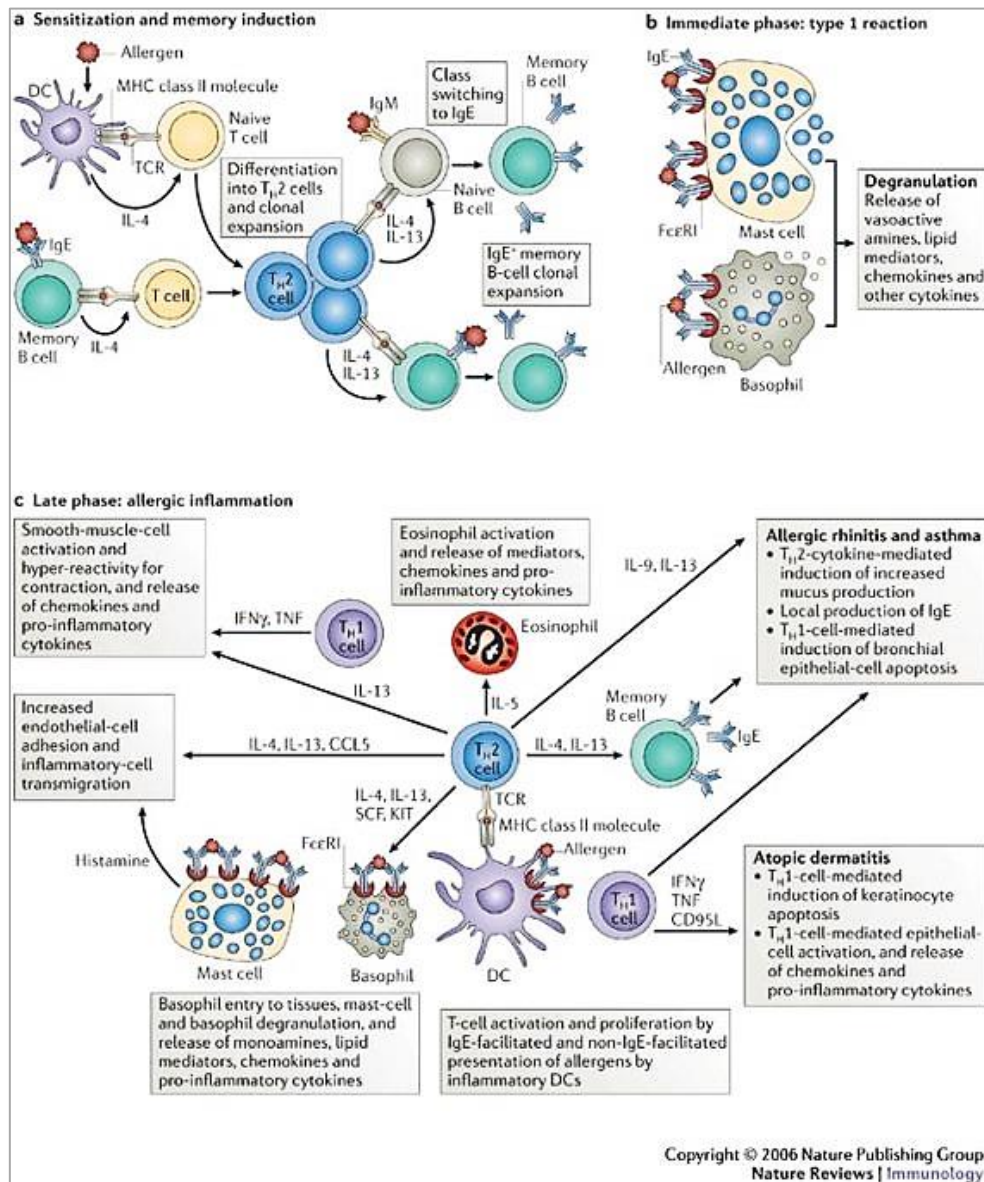


Abbildung 4: Ablauf einer allergischen Reaktion (Larche et al., 2006)

Die Allergene werden zunächst von dendritischen Zellen aufgenommen, in Peptide aufgespalten und über MHC-II Moleküle bzw. nach einer bereits stattgefundenen Sensibilisierung über Bindung an IgE auf Gedächtnis-B-Zellen den naiven T-Zellen präsentiert, so dass diese in Th₂-Zellen differenzieren. Die daraufhin sezernierten Zytokine wie Interleukin-4 und Interleukin-13 stimulieren bei den B-Lymphozyten den Isotypenwechsel zu IgE und damit die Bildung und klonale Expansion der IgE-Gedächtnis-B-Zelle (vgl. Abbildung 4, Abschnitt a).

Die neu gebildeten IgE-Antikörper binden an spezifische IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten und es kommt zur Degranulation und Freisetzung des Granulainhaltes, zur Synthese und Sekretion von Zytokinen (z.B. Interleukin-4, Interleukin-5 und TNF- α) sowie von Prostaglandinen und Leukotrienen (vgl. Abbildung 4, Abschnitt b). In den Granula liegt ein Teil der Mediatoren präformiert vor (z.B. Histamin oder Proteasen), wodurch bereits wenige Minuten nach Allergenexposition eine akute Reaktion mit Vasodilatation und lokaler Entzündungsreaktion möglich ist. Ein anderer Teil des Granulainhaltes muss erst nach Zellaktivierung neu gebildet werden

(z.B. Zytokine oder Prostaglandine), so dass diese in einer Spätphase der Überempfindlichkeitsreaktion Typ I zum Tragen kommen und eine Kaskade an Reaktionen auslösen (vgl. Abbildung 4, Abschnitt c). Hauptakteure dieser Kaskade sind die T-Lymphozyten.

1.3 Allergische Erkrankungen im Kindesalter

1.3.1 Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten wird eine deutliche Zunahme der Prävalenz allergischer Erkrankungen in den Industrienationen beobachtet.

Beispielsweise berichten die *Centers for Disease Control and Prevention* in den USA von einer Asthma-Prävalenz von 5,8 % bei Kindern im Jahr 2003. Im Jahr 1980 lag die Prävalenz noch bei 3,6 %. Nach Pneumonie und Unfällen steht Asthma an dritter Stelle der Diagnosen, die in den USA zu einem stationären Krankenhausaufenthalt im Kindesalter führen (Eder, 2007).

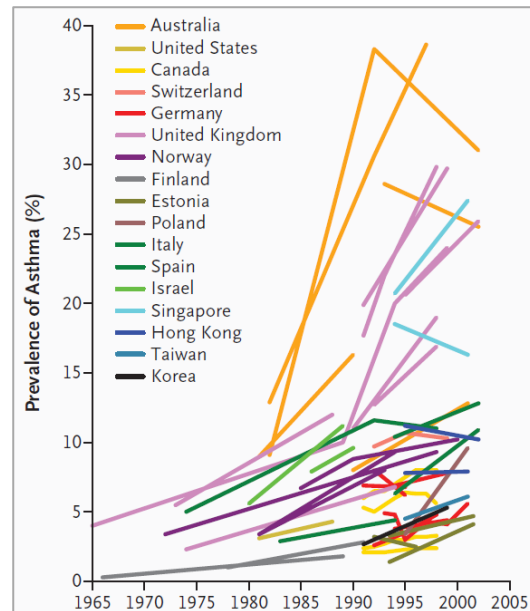


Abbildung 5: Asthma-Prävalenz bei Kindern (Eder, 2007)

Im Rahmen der *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*, kurz ISAAC Studie, konnte gezeigt werden, dass auch in Europa jedes vierte Kind an Allergien leidet (ISAAC, 2019). Es ist also nicht verwunderlich, dass die Entstehung von Erkrankungen des allergischen Formenkreises Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte ist.

Insbesondere die frühkindliche oder auch bereits pränatale Modifikation des Immunsystems, die möglicherweise eine Entstehung der Erkrankung beeinflusst, steht im Fokus des Interesses.

1.3.2 Einfluss mikrobieller Stimulation auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen im Kindesalter

Die Bauernhofumgebung spielt bereits in der frühen Entwicklung des Immunsystems eine wichtige Rolle und hat entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis. Dem Bauernhofeffekt liegt ein komplexes Netzwerk immunologischer, genetischer und epigenetischer Faktoren zu Grunde.

1989 postulierte Strachan nach Auswertung epidemiologischer Daten von 17.414 britischen Kindern über einen Beobachtungszeitraum von 23 Jahren im Rahmen der Hygiene-Hypothese, dass durch verbesserte hygienische Bedingungen in den Industrienationen, Abnahme der Anzahl an Geschwistern und eine geringere Inzidenz von Infektionen in der frühen Kindheit eine Zunahme der Prävalenz allergischer Erkrankungen zu beobachten sei (Strachan, 1989). Seither ist die detaillierte Untersuchung der Entstehung allergischer Erkrankungen und insbesondere auch der Einfluss von Umgebungsfaktoren

Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Der Fokus richtet sich auf drei Hauptthemengebiete: die Rolle viraler oder bakterieller Infektionen, der Einfluss mikrobieller Stimulation, die Kombination aus Infektionen als endogenem Stimulus des Immunsystems und Umweltfaktoren als exogenem Stimulus des Immunsystems (Schaub et al., 2006).

Die sinkende Exposition zu mikrobiellen Stimuli gilt als ein wichtiger Faktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen (Bloomfield et al., 2006). Ein Modell für die exogene Stimulation des Immunsystems ist das Leben auf einem Bauernhof. Wachsen Kinder auf einem Bauernhof auf, zeigen sie eine niedrigere Prävalenz allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale und allergischer Rhinokonjunktivitis und auch eine niedrigere Prävalenz für eine Sensibilisierung auf Inhalationsallergene (Von Ehrenstein et al., 2000, Riedler et al., 2001). Douwes et al. beschreiben, dass bereits die präpartale Bauernhofexposition durch die Mutter während der Schwangerschaft zu einer niedrigeren Prävalenz von atopischen Erkrankungen bei den Kindern führt (Douwes et al., 2008). Zahlreiche wichtige Faktoren tragen zur Entstehung dieses „Bauernhofeffekts“ bei – beispielsweise der Kontakt zu verschiedenen Tierspezies (Ege et al., 2006), der Verzehr von Rohmilch (Loss et al., 2011), die Endotoxinexposition (Braun-Fahrlander et al., 2002) und die Diversität der mikrobiellen Stimuli (Ege et al., 2011).

Schon pränatal wird das kindliche Immunsystem durch Umwelteinflüsse langfristig moduliert, was bereits zum frühest möglichen Zeitpunkt, nämlich im Nabelschnurblut, zu beobachten ist (Ege et al., 2006, Schaub et al., 2009). Der immunologische Hintergrund des Bauernhofeffektes ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. So beschreiben Pfefferle et al. eine Veränderung in der Zytokinsekretion im Nabelschnurblut von Müttern, die auf einem Bauernhof leben und arbeiten: Diese zeigen beispielsweise erhöhte Werte für IFN- γ (Pfefferle et al., 2010), einem Th1-Zytokin. Bereits in vorangegangenen Studien ist ein niedrigeres Risiko für die Entstehung atopischer Erkrankungen bei vermehrtem Nachweis von IFN- γ bei Geburt beschrieben worden (Macaubas et al., 2003). Kaario et al. bestätigen die vermehrte Sekretion Th1-assoziiierter Zytokine in Blutproben von Bauernkindern im Alter von 4,5 Jahren (Kaario et al., 2016). Insofern beschreiben zahlreiche Studien ein Überwiegen der Th1-Th2 Immunbalance (vgl. 1.2.3.4 Th1/Th2 Paradigma) zu Gunsten der Th1-Zellen bei Bauernhofexposition, was letztlich zu einem „allergie-protektiven“ Effekt beiträgt. Unter den T-Zellen wird auch den regulatorischen T-Zellen (Treg) eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Bauernhofeffekts zugeschrieben. Sie zeigen sich bei Müttern signifikant erhöht, die während der Schwangerschaft auf einem Bauernhof leben und arbeiten. Assoziiert ist diese Beobachtung mit einer Suppression einer proallergischen Immunantwort in Form erniedrigter Th2-typischen Zytokinen (Schaub et al., 2009). Andererseits sind bei Kindern mit einem erhöhten Risiko für allergische Erkrankungen bereits bei Geburt die regulatorischen T-Zellen erniedrigt und auch deren Funktionalität bezüglich einer Suppression der pro-allergischen Immunantwort ist vermindert (Schaub et al., 2008).

Obwohl die Rolle der Th1- und Th2-Zellen schon vielfach untersucht wurde, ist bisher unklar, ob und wie deren Regulation bereits zum frühest messbaren Zeitpunkt, nämlich im Nabelschnurblut, bei den Kindern verändert ist, die später vor allergischen Erkrankungen geschützt sind.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation soll der Einfluss der Th1- und Th2-Zellen in der frühen Immunmaturation auf die Entstehung einer allergischen Sensibilisierung im Kindesalter untersucht werden.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung der Genexpression und der Zytokinsekretion im Nabelschnurblut von Bauern- und Nicht-Bauernkindern und die Auswertung der epidemiologischen Daten. Diese Analysen erfolgen mit dem Fokus auf die Identifikation einer unterschiedlichen Genexpression im Nabelschnurblut von Bauern- im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern unter der Hypothese, dass Bauernkinder durch mikrobielle Stimulation und infolge dessen auch Stimulation ihres Immunsystems seltener eine allergische Sensibilisierung entwickeln als Nicht-Bauernkinder. Deshalb wurde bei den untersuchten Kindern bis zum Alter von zehn Jahren die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung sowie das Auftreten pfeifender Atemgeräusche (*wheeze*) als mögliches Symptom eines Asthma bronchiale anhand von Fragebögen erfasst.

Im Rahmen der sogenannten PAULCHEN-Studie, einer Geburtskohorte, wurden anhand von Fragebögen epidemiologische Daten mit dem Fokus auf mikrobielle Exposition und die Entwicklung allergischer Erkrankungen sowie sozioökonomische Faktoren und die Familienanamnese bei Geburt und im Alter von drei, sechs und zehn Jahren erhoben. Außerdem wurden Nabelschnurblutproben von Bauern- und Nicht-Bauernkindern verarbeitet. Nach Zell-Isolation und RNA-Extraktion wurde eine real-time RT-PCR mit dem Fokus auf Th1- und Th2- assoziierte Gene sowie im Anschluss daran eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zudem wurde die Sekretion bestimmter T-Zell assoziierter Zytokine (Interleukin-5, Interleukin-6, Interleukin-12) gemessen.

Langfristig soll die Frage beantwortet werden, ob bereits die Immunregulation im Nabelschnurblut zur Prädiktion einer späteren Entwicklung allergischer Erkrankungen geeignet ist. Dies würde zum weiteren Verständnis des komplexen Netzwerkes immunologischer, genetischer und epigenetischer Faktoren beitragen, das dem Bauernhofeffekt als Modell einer „allergie-protektiven“ Umgebung zu Grunde liegt. In der Folge könnte dies neue Therapieoptionen in der Prävention und Behandlung allergischer Erkrankungen eröffnen.

1.5 Arbeitsbeschreibung dieser Dissertation

Im Fokus dieser Dissertation stehen die Untersuchung der Genexpression im Nabelschnurblut und die Auswertung im Zusammenhang mit den bereits erhobenen Daten bei Geburt sowie die Nachbeobachtung der Kinder über einen Zeitraum von zehn Jahren. Meine Aufgabe im Rahmen dieser Dissertation war die Durchführung der Verlaufsbeobachtung über drei, sechs und zehn Jahre mittels Fragebögen und die Auswahl der Studienteilnehmer mit RNA-Proben in ausreichender Menge und Qualität.

Die Durchführung folgender Experimente war Hauptbestandteil dieser Dissertation: Zum einen die Transkription der mRNA in cDNA und das Primer-Design inklusive Optimierung und Etablierung. Zum anderen die real-time RT-PCR und die Gelelektrophorese sowie die Qualitätskontrolle als experimenteller Schwerpunkt dieser Arbeit. Sowohl die Zell-Isolation als auch die RNA-Extraktion und die Zytokin-Messungen erfolgten bereits vor Beginn dieser Dissertation, unmittelbar nach Geburt der an der PAULCHEN-Studie teilnehmenden Kinder, durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Schaub im Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals.

Zusätzlich habe ich selbständig die grundlegenden statistischen Analysen durchgeführt. Die weiterführenden komplexeren statistischen Auswertungen inklusive Korrelationsanalysen, Berechnungen zur Adjustierung und epidemiologischer Datenauswertung erfolgten gemeinsam mit dem Biostatistiker der Arbeitsgruppe Schaub.

2 DATENERHEBUNG UND METHODEN

2.1 Probanden

2.1.1 Rekrutierung der Studienteilnehmer

Die Rekrutierung der teilnehmenden Mütter erfolgte im letzten Trimenon der Schwangerschaft in der Asklepios-Stadtklinik Bad Tölz durch die dort tätigen Hebammen von Juli 2005 bis September 2007 im Rahmen der PAULCHEN-Studie.

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

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden Mütter mit einem unkomplizierten Verlauf der Schwangerschaft und termingerechter Geburt sowie gesunde Neugeborene aufgenommen.

Ausschlusskriterien waren chronische Erkrankungen der Mütter und Infektionen bzw. antibiotische Therapie im letzten Trimenon der Schwangerschaft. Kinder, die vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche geboren wurden oder an perinatalen Infektionen erkrankten, wurden ebenfalls von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

Nach Einhaltung der Ausschlusskriterien wurden von 94 möglichen Probandinnen 91 Mütter und deren Kinder (97 %) in die Studie aufgenommen.

2.2 Epidemiologische Datenerhebung

2.2.1 Fragebögen

Nach der Einverständniserklärung zur Studienteilnahme sowie einer ersten Befragung und der Erhebung weiterer Daten über den Geburtsverlauf aus den Krankenhausakten, wurde im Rahmen dieser Dissertation drei, sechs und zehn Jahre nach der Geburt ein weiterer Fragebogen an die Eltern verschickt und ausgewertet.

2.2.1.1 Fragebogen bei Geburt

Die werdenden Mütter beantworteten Fragen zu Herkunft, Ausbildung, Erkrankungen und Schwangerschaftsverlauf sowie zur Tätigkeit auf einem Bauernhof (siehe Anhang 8.2 Fragebogen bei Studieneinschluss).

2.2.1.2 Fragebögen im Alter von drei, sechs und zehn Jahren

Im Alter von drei, sechs und zehn Jahren wurden durch die Eltern bzw. ein Elternteil Fragebögen beantwortet, die Fragen zur Gesundheit des Kindes – insbesondere zu Erkrankungen des atopischen Formenkreises (Wahn, 2005) – sowie zur Tätigkeit auf einem Bauernhof, zum Frischmilchkonsum, zum Tierkontakt und zur Wohnungs- und Lebenssituation beinhalteten (siehe Anhang 8.3 Fragebogen zum 3. Lebensjahr, 8.4 Fragebogen zum 6. Lebensjahr, 8.5 Fragebogen zum 10. Lebensjahr).

Die Fragebögen wurden mit dem Fokus auf die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung auf Inhalationsallergene ausgewertet. Als allergische Sensibilisierung auf Inhalationsallergene wurde ein positiver Haut- und/oder Bluttest auf inhalative Allergene (Baum- und Gräserpollen, Hausstaubmilben, Tierhaare) im zehnten Lebensjahr definiert, der durch die Eltern im Fragebogen berichtet wurde. Die Daten wurden mit Blick auf die Familienanamnese, die Geburtsdaten der Kinder sowie Bauernhof-typische Einflussfaktoren (Aufenthalt im Stall, Tierkontakt, Rohmilchkonsum) und die Entwicklung eines pfeifenden Atemgeräusches (*wheeze*) als mögliches Asthma-Symptom analysiert.

Die Entwicklung eines pfeifenden Atemgeräusches wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Triggern beobachtet: Virale Infekte, die mit pfeifenden Atemgeräuschen assoziiert waren, wurden als *viral wheeze* definiert. Falls die Atemgeräusche durch mindestens zwei verschiedene Trigger (Kälte, Anstrengung, Hausstaub, Tierkontakt, Pollen) verursacht wurden, wurde dies als *multitrigger wheeze* definiert (Brand et al., 2008, Frey and von Mutius, 2009, Depner et al., 2014). Außerdem wurde das zeitliche Auftreten der pfeifenden Atemgeräusche eingeordnet (Martinez et al., 1995): Früh aufgetretene Symptome (*early wheeze*), spät aufgetretene Symptome ab dem sechsten Lebensjahr (*late onset wheeze*) oder *persistent wheeze* mit Symptomen im Alter von drei, sechs und zehn Jahren (modifiziert nach Depner et al., 2014).

2.3 Verwendete Laborgeräte

	Gerät	Hersteller
<i>Vorbereitung und Durchführung der real-time RT-PCR</i>		
	iCycler iQ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
	peqSTAR Thermocycler	Peqlab
	Spectrophotometer ND 1000	Nanodrop
	Micro Centrifuge	Roth
	Vortex-1 Genie Touch Mixer	Scientific Industries
	Tischzentrifuge Galaxy Mini	Merck Eurolab
	Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich
<i>Gel-Elektrophorese</i>		
	Elektrophoreseeinheit Modell DB	Thermo Scientific
	Netzgerät Power Source 300 V	VWR
	Geldokumentation GDS Gel imager	Intas
	Präzisionswaage 44033	Kern

Tabelle 1: Verwendete Geräte

2.4 Verbrauchsmaterialien

Pipette	Volumen	Firma
Pipette	10 µl	Eppendorf Research
Pipette	20 µl	Eppendorf Research
Pipette	200 µl	Eppendorf Research
Pipette	1000 µl	Eppendorf Research
8-Kanal Pipette	100 µl	Eppendorf Research Multichannel
Pipettenspitzen	-	Eppendorf

Tabelle 2: Pipetten und Zubehör

Gefäß	Volumen	Firma
Multiply-Pro PCR-Gefäß	0,5 ml	Sarstedt
Safe-Lock Reaktionsgefäß	1,5 ml	Eppendorf
Safe-Lock Reaktionsgefäß	2,0 ml	Eppendorf
Erlenmeyer Glaskolben	250 ml	Schott
Messbecher	100 ml	Vitlab
Messbecher	250 ml	Vitlab

Tabelle 3: Gefäße

Verwendungszweck	Produkt	Hersteller
<i>Real-time RT-PCR</i>		
	PCR Plates, 96 well Folien BZO Seal Film	Bio-Rad Biozym
<i>Gelelektrophorese</i>		
	Gelschlitten 4 Käbme mit je 50 Taschen Cutfix Einmal-Skalpell	Braun
<i>Oberflächen- Dekontamination</i>		
	RNase away MßP	Molecular BioProducts

Tabelle 4: Weitere Materialien

2.5 Reagenzien

Verwendung	Reagenz	Hersteller
<i>Allgemein</i>		
	Molecular Biology Grade Water, DNase-, RNase-, Protease-free (DEPC)	Serva Electrophoresis GmbH
<i>RNA-Transkription</i>		
	QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen
<i>Real-time RT-PCR</i>		
	Fluorescein Calibration Dye	Bio-Rad
	SYBRGreen PCR Master Mix	Applied Biosystems
	Primer	Invitrogen
<i>Gelelektrophorese</i>		
→ TBE	Trizma Base	Sigma-Aldrich
	Boric Acid	Sigma-Aldrich
	Ethylene diamine tetraacetic acid EDTA	Sigma-Aldrich
	Bidestilliertes Wasser	H. Kerndl GmbH
→ Loading Dye	0,25% Bromphenolblau	Roth
	0,25% Xylene cyanol	Merck
	30% Glycerol in H ₂ O	Sigma-Aldrich
→ DNA ladder	10% 100bp DNA ladder	New England BioLabs
	10% Loading Dye, 1:10 verdünnt	
	80% TBE, 1:10 verdünnt	
→ Fluoreszenzfarbstoff	GelRed	Biotium

Tabelle 5: Reagenzien

2.6 Software

Biorad CFX Manager 2.1	Biorad, Hercules, USA
Endnote X8	ISI ResearchSoft, Berkely, USA
Ensembl genome browser	http://www.ensembl.org
Microsoft Excel 2010	Microsoft, USA
National Center for Biotechnology Information	http://ncbi.nlm.nih.gov
R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2018	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018
SPSS Statistics 23.0	IBM, Armonk, New York, USA
Vector NTI Advance 11.5	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 6: Software

2.7 Labormethoden

2.7.1 IgE-Bestimmung im mütterlichen Blut

Im mütterlichen Serum, das bei Geburt gewonnen, aufbereitet und bei minus 80 °C aufbewahrt wurde, erfolgte die Messung des Gesamt-IgE mittels ELISA. Außerdem wurde durch einen Blut-Test der Firma MEDIWISS das spezifische IgE für die 20 häufigsten Allergene bestimmt (vgl. Tabelle 37 im Anhang). Als auf eine Atopie hinweisend wurden Messergebnisse von $\geq 0,35$ IU/ml bei mindestens einem Allergen definiert (Casaca et al., 2012). Diese Messungen wurden von Mitarbeitern der Kinderklinik der LMU München übernommen.

2.7.2 Zellisolation und -stimulation

Die Isolation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut (CBMC) erfolgte unmittelbar nach der Geburt durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Schaub im Dr. von Haunerschen Kinderspital. Die gewonnenen Zellen wurden mit Phytohämagglutinin (*PHA*), Lipid A (*LpA*, *Salmonella minnesota*), Peptidoglykan (*Ppg*, *Staphylococcus aureus*), Dermatophagoides pteronyssinus 1 (*Der p 1*, im Folgenden *Derp*) und einer Kombination aus *Derp* und *Ppg* (im Folgenden *DundP*) stimuliert und mit unstimulierten Zellen (*Media*, im Folgenden *M*) verglichen. Die isolierten mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut wurden für 72 h bei 37 °C inkubiert, CO₂-Gehalt 5 % (Schaub et al., 2009). Protokoll siehe 8.7.1 im Anhang.

Stimulus	Eigenschaft	Konzentration
LpA	Endotoxin, Stimulus des angeborenen Immunsystems	0,1 µg/ml
Ppg	Muraminsäure, Stimulus des angeborenen Immunsystems,	10 µg/ml
PHA	Mitogen, Stimulus des erworbenen Immunsystems, regt T-Zellen zur Teilung an	5 µg/ml
Derp	Cystinprotease, gebildet von der europäischen Hausstaubmilbe und damit ein Stimulus des erworbenen Immunsystems	30 µg/ml
DundP	Kombination aus Derp und Ppg, damit kombinierte Stimulation des angeborenen- und erworbenen Immunsystems	

Tabelle 7: Stimuli – Charakteristika und Konzentration (Schaub et al., 2009)

2.7.3 RNA-Extraktion, Konzentrationsmessung und Transkription

2.7.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mittels TRI Reagent® durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Schaub im Dr. von Haunerschen Kinderspital bereits vor Beginn dieser Dissertation durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C aufbewahrt. Protokoll siehe 8.7.2 im Anhang.

2.7.3.2 Messung der RNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie

Um die RNA-Konzentration der vorbereiteten Proben zu bestimmen, erfolgt die Messung mittels NanoDrop® Spectrophotometer. Diese Methode hat den Vorteil, dass bereits Mengen von 1 µl genügen und so der Probenverlust gering bleibt. Die Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (ThermoScientific, 2008).

2.7.3.3 Transkription

Vor der Durchführung der real-time RT-PCR muss die vorhandene mRNA in cDNA revers transkribiert werden.

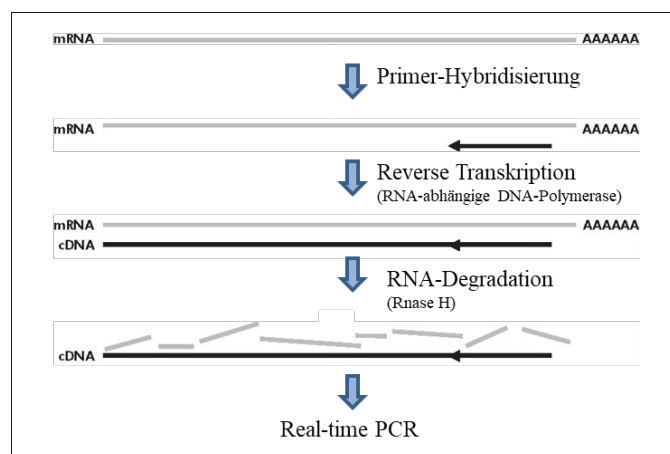


Abbildung 6: Schema reverse Transkription

Zunächst wird die Probe von der Kontamination durch genomische DNA befreit, indem sie zwei Minuten mit dem Wipeout Buffer bei 42 °C im peqSTAR Thermocycler inkubiert wird. Daraufhin erfolgt die reverse Transkription mittels Quantiscript Reverse

Transcriptase für 15 Minuten bei 42 °C. Anschließend wird die reverse Transkriptase für drei Minuten bei 95 °C inaktiviert (Quiagen, 2009). Protokoll siehe 8.7.3 im Anhang.

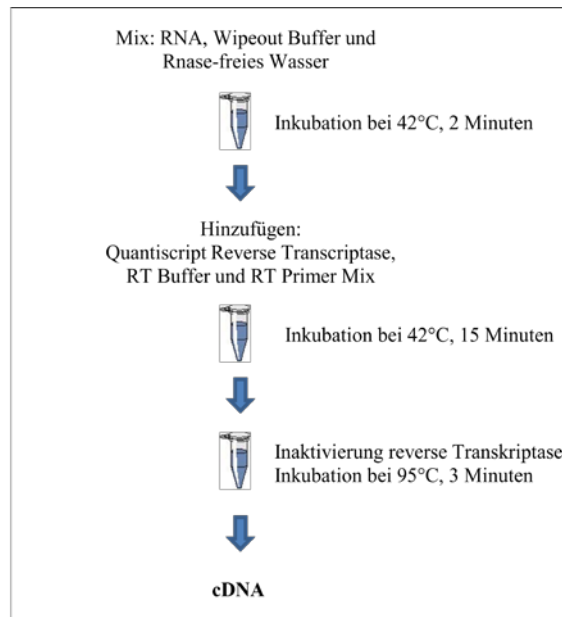


Abbildung 7: Durchführung reverse Transkription

2.7.4 Quantitative real-time Reverse-Transkriptase PCR (real-time RT-PCR)

2.7.4.1 Grundlegendes zur Methode

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde bereits im Jahr 1983 durch Kary Mullis entwickelt (Mullis, 1990), dem hierfür zehn Jahre später der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde.

Es handelt sich um eine Methode zur Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz, die in folgenden drei Schritten abläuft (Quiagen):

1. Denaturierung: Zunächst wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und damit in Einzelstränge getrennt.
2. Primer-Hybridisierung: Anschließend lagern sich Primer durch Absenken der Temperatur auf 55 - 69 °C an die komplementäre DNA-Sequenz an. Die exakte Temperatur ist abhängig von Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Bei einer zu niedrigen Temperatur besteht die Gefahr einer Anlagerung der Primer an nicht exakt komplementäre DNA-Sequenzen. Bei einer zu hohen Temperatur können sich die Primer nicht richtig anlagern.
3. Elongation: Durch die DNA-Polymerase wird daraufhin bei einem Temperatur-optimum von 72 °C die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz synthetisiert, indem die freien Plätze am DNA-Strang mit freien Nukleotiden aufgefüllt werden. Dies wird so lange wiederholt, bis die DNA-Polymerase abfällt oder der Prozess durch erneute Denaturierung abgebrochen wird.

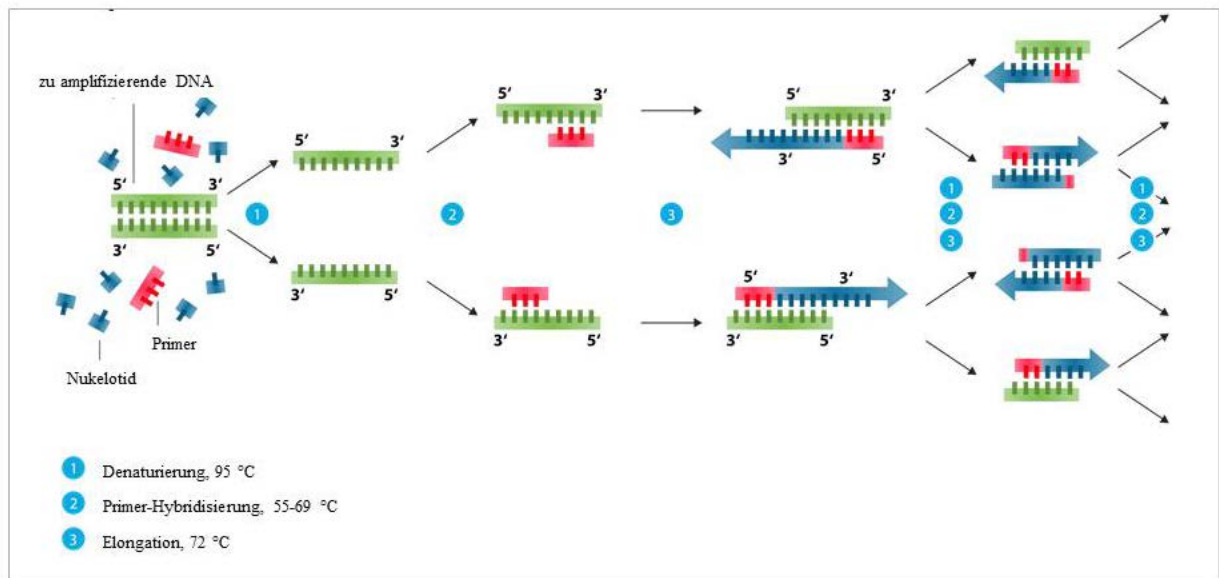


Abbildung 8: Schema zum Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion, modifiziert (Onlinebiologynotes)

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten real-time RT-PCR ist neben der Amplifizierung der DNA auch eine Quantifizierung möglich. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (Applied Biosystems®) wird durch Anlagerung an die DNA aktiviert. Über einen Fluoreszenz-Analysator kann die Quantität der amplifizierten DNA gemessen werden. Die Fluoreszenz erhöht sich proportional zu der gemessenen DNA (Nolan et al., 2006).

2.7.4.2 Primer: Auswahl und Design

Als Primer wurden zentrale Th1- und Th2-assoziierte Gene ausgewählt. Diese ausgewählten, zentralen Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch ihre genetische Sequenz, besondere molekulargenetische Eigenschaften und charakteristische Verläufe der Schmelzkurven bei der Durchführung der real-time RT-PCR aus. Nach Darstellung des Primer-Designs sollen im Folgenden die Charakteristika der verwendeten Primer dargestellt werden, die deren Auswahl im Rahmen dieser Dissertation als zentrale Th1- und Th2- assoziierte Transkriptionsfaktoren begründen.

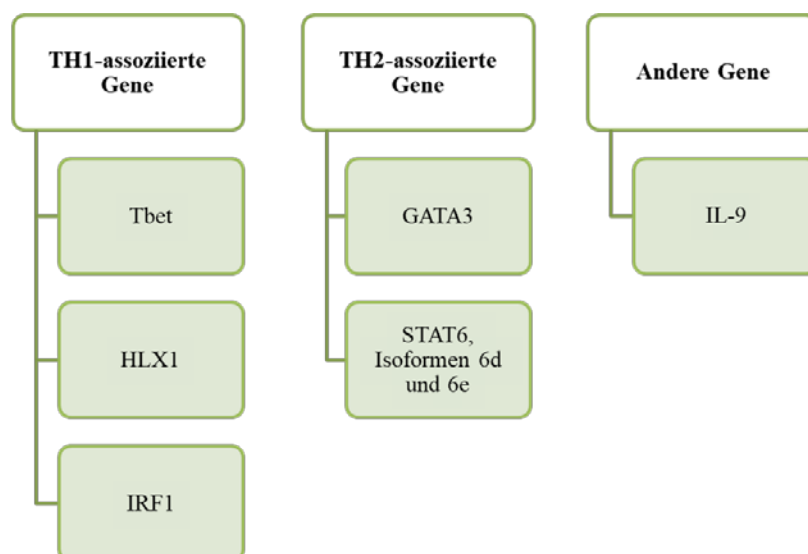


Abbildung 9: Übersicht Primer-Auswahl

2.7.4.2.1 Primer-Design

Zum Primer-Design werden die Gensequenzen der zu untersuchenden Gene im „Ensembl genome Browser 93“ gesucht und die entsprechenden Sequenzen in das Programm „Vector NTI“ eingefügt (vgl. 2.6 Software). Anschließend werden mit Hilfe des Programms die Primer designt und jeweils *forward*- und *reverse-primer* bei Invitrogen™ bestellt.

Es sind folgende Regeln zu berücksichtigen:

- Ziel-Primerlänge zwischen 18 und 27 Basenpaaren
- Cytosin oder Guanin am 3`-Ende des Primers
- Schmelztemperatur zwischen 54 und 65 °C. Hierbei wird berücksichtigt, dass zwischen dem *forward*- und *reverse-primer* die Differenz der Schmelztemperatur weniger als 5 °C beträgt.
- Primerbeginn hinter einer ATG-Sequenz
- Keine Dimere oder Hairpinloops
- Guanin- / Cytosin-Anteil zwischen 40 und 60 %
- Weder die Sequenz –GGG noch –CCC sollte am 3`Ende des Primers liegen, da dies im Annealing-Prozess zu viel Energie verbraucht.
- Um eine Interferenz mit der DNA zu vermeiden, sollten der *forward* und der *reverse* Primer in verschiedenen Exons liegen.

Aus den entsprechenden Primern wird eine Primärlösung hergestellt. 10 µl der Stammlösung (1 mM) werden mit 90 µl RNase freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert. Von der entstandenen 0,1 mM Lösung werden jeweils 5 µl des *forward primers* und 5 µl des *reverse primers* mit 490 µl destilliertem Wasser versetzt, so dass die Primer jeweils in einer Konzentration von 1 µM vorliegen und bei 4 °C aufbewahrt werden können.

2.7.4.2.2 Charakteristika der verwendeten Primer

18S rRNA

18S rRNA, im Folgenden 18S genannt, ist ein als *housekeeping gene* häufig verwendeter Primer bei der Durchführung der real-time RT-PCR. Dieser Primer zeichnet sich durch eine besonders hohe Stabilität aus. Er zeigt weder im Verlauf der PCR Zyklen noch bei veränderten Versuchsbedingungen wie z.B. Temperaturveränderungen signifikante Abweichungen (Bas et al., 2004). Nach Vortestung zeigt sich dieser Primer für unsere Kohortenstudien als stabil. In der Auswertung der durchgeführten real-time RT-PCR wird der *Cycle-Threshold* (Schwellenwert-Zyklus) eines jeden Primers in Relation zur 18S rRNA-Amplifikation gesetzt (Casaca et al., 2012).

<i>18S rRNA – „housekeeping gene“ Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Länge</i>
<i>forward: 18SrRNA h FW1-Schaub</i>	AGTCCCTGCCCTTTGTACACA	21 bp
<i>reverse: 18SrRNA h RE1-Schaub</i>	GATCCGAGGGCCTCACTAAAC (Komplementäre Sequenz)	21 bp

Tabelle 8: Eigenschaften 18S

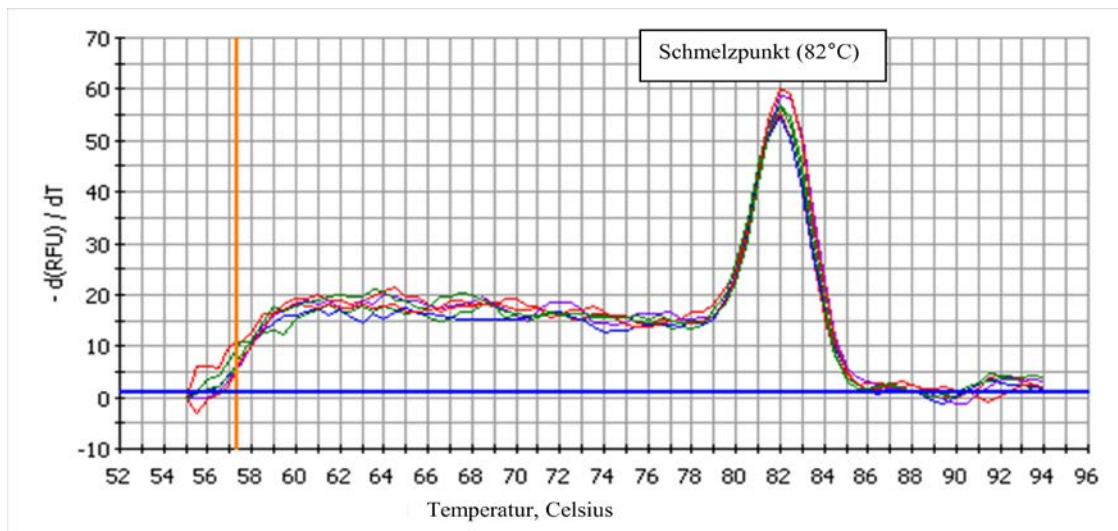


Abbildung 10: Schmelzkurve 18S rRNA

Tbet

Tbet, auch TBX21 oder *T-cell-specific T-box transcription factor* genannt, liegt auf Chromosom 17.

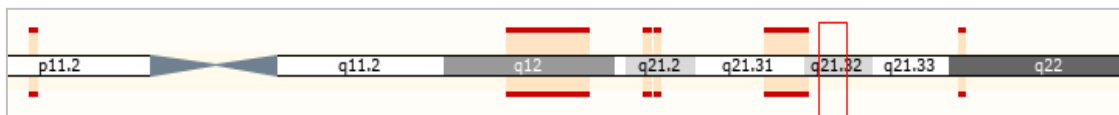


Abbildung 11: Position Tbet auf Chromosom 17 (Ensembl.org)

Tbet induziert die Differenzierung der Th1-Zellen über IFN- γ -Sekretion (Szabo et al., 2015) und gilt als Kandidatengen für Asthma und Allergie (Suttner et al., 2009). In Tbet-*knockout* Mäusen wurden typische Asthma-Symptome wie beispielsweise eine erhöhte bronchiale Hyperreagibilität mit charakteristischem Umbau der Atemwege beschrieben (Finotto et al., 2002).

<i>Tbet</i> Bezeichnung	Sequenz	Position	Länge
<i>forward:</i> Tbet Primer1-11004 FW	AGGTGAACGACGGAGAGCCAG	Exon 4	21 bp
<i>reverse:</i> Tbet Primer1-11538 RE	GGAGGGGATGCTGGTGTCAAC (Komplementäre Sequenz)	Exon 6	21 bp
Produktlänge (ohne Intron) : 203 bp			

Tabelle 9: Eigenschaften des Primers Tbet

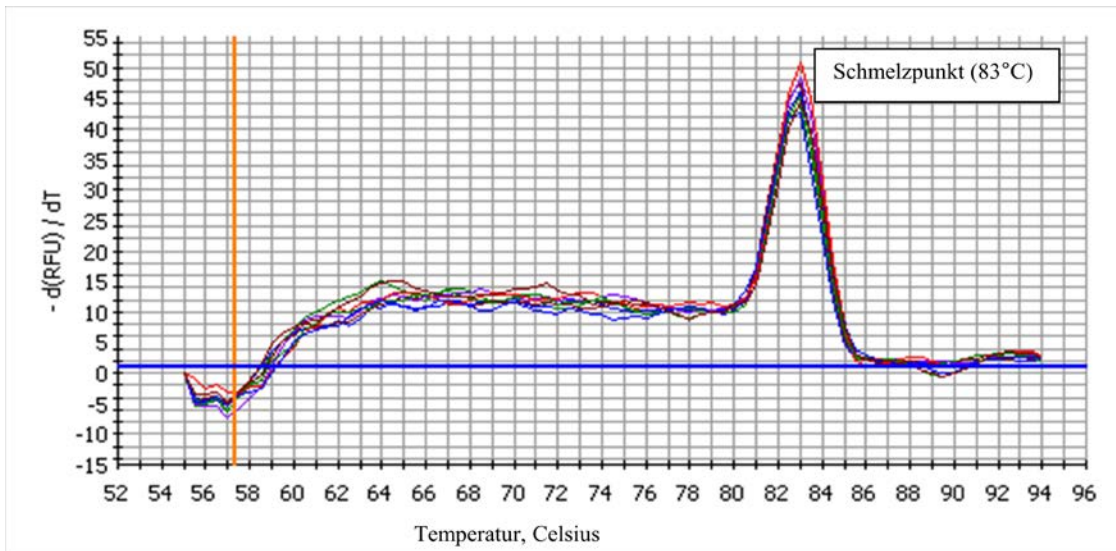


Abbildung 12: Schmelzkurve Tbet

HLX1

HLX1 (*H20.-like homebox 1*) liegt auf Chromosom 1.



Abbildung 13: Position HLX1 auf Chromosom 1 (Ensembl.org)

Für HLX1 ist eine enge Interaktion mit Tbet bei der Differenzierung der Th1-Zellen und der Supprimierung der Th2-Zellen beschrieben. So führen Tbet und HLX1 nur in Kombination zu einer maximalen Ausschüttung von IFN- γ und damit auch zur Th1-Zell Differenzierung (Mullen et al., 2002). Ebenfalls in Kombination wird die Entwicklung der Th2-Zellen unterdrückt, HLX1 trägt hierzu über eine Herabregulation der IL-4 Rezeptor- α Expression in naiven CD4 T-Zellen bei (Mikhalkevich et al., 2006).

<i>HLX1</i> Bezeichnung	Sequenz	Position	Länge
<i>forward:</i> HLX1_mRNA_2_fwd	CAAGCCGACCGAAAGCAG	Exon 4	19 bp
<i>reverse:</i> HLX1_mRNA_2_rev	CTGGGGCTCCTCTCGTCCTG (Komplementäre Sequenz)	Exon 1	20 bp
Produktlänge (ohne Intron): 98 bp			

Tabelle 10: Eigenschaften HLX1

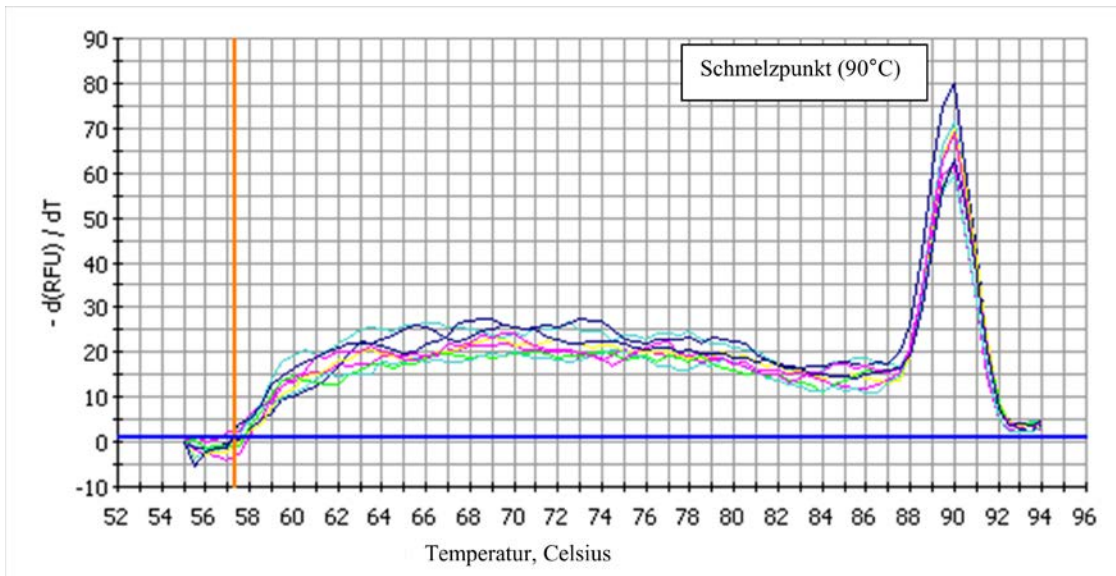


Abbildung 14: Schmelzkurve HLX1

IRF1

IRF1, der *interferon regulatory factor 1*, liegt auf Chromosom 5.

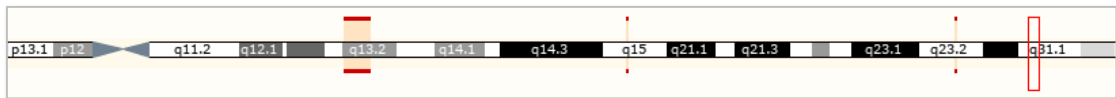


Abbildung 15: Position IRF-1 auf Chromosom 5 (Ensembl.org)

IRF1 ist ebenfalls essentiell für die Th1-Zell Differenzierung (Unutmaz and Vilcek, 2008). So wird beispielsweise die IL-12-Sekretion stimuliert (Kano et al., 2008). Außerdem ist für IRF1 eine Rolle in der Tumor-Suppression über Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 beschrieben (Dornan et al., 2004).

<i>IRF1</i> Bezeichnung	Sequenz	Position	Länge
<i>forward:</i> IRF1_P17fwd	AACAGATGAGGATGAGGAAGGG	Exon 8	22 bp
<i>reverse:</i> IRF1_P18rev	GCTGTCAATTTCTGGCTCCTCC (Komplementäre Sequenz)	Exon 9	22 bp
Produktlänge (ohne Intron): 176 bp			

Tabelle 11: Eigenschaften IRF1

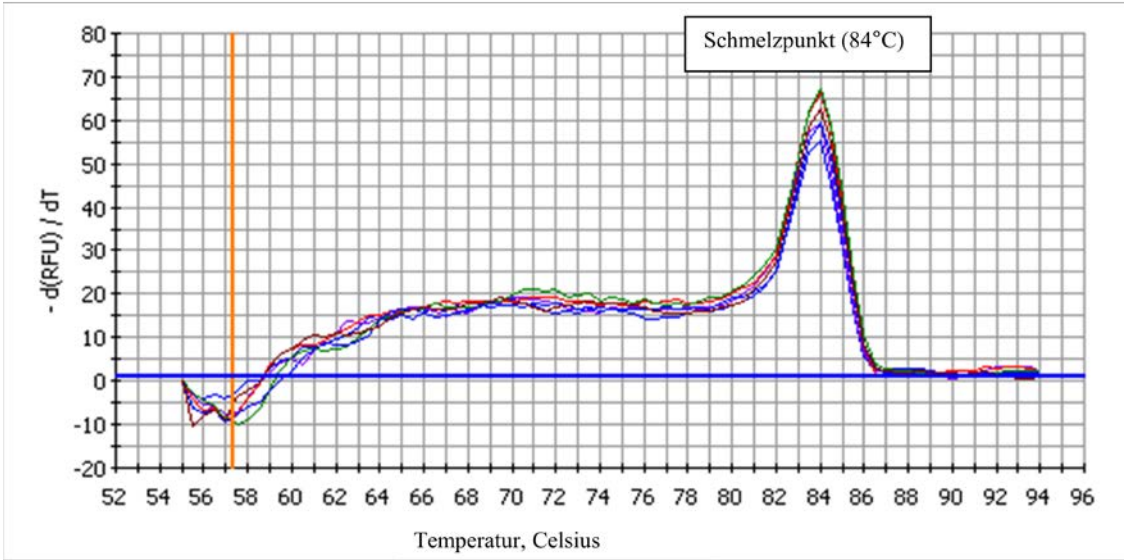


Abbildung 16: Schmelzkurve IRF1

GATA3

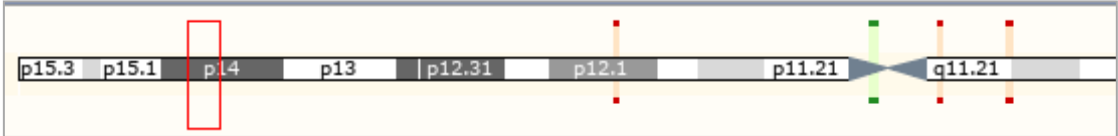


Abbildung 17: Position GATA3 auf Chromosom 10 (Ensembl.org)

GATA3 liegt auf Chromosom 10 und ist ein Teil der GATA-Familie. Dies sind Transkriptionsfaktoren, die eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung der Th2-Zellen spielen (Zhou and Ouyang, 2003). So beeinflusst GATA3 zum einen die Sekretion Th2-spezifischer Zytokine wie beispielsweise Interleukin -4, -5 oder -13 (Zheng and Flavell, 1997). Zum anderen ist beschrieben, dass GATA3 die Expression Th1-spezifischer Transkriptionsfaktoren wie Tbet supprimiert und die Sekretion Th1-spezifischer Zytokine wie IFN- γ hemmt (Zhu et al., 2006).

<i>GATA3</i> Bezeichnung	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Länge</i>
<i>forward:</i> GATA3-Primer1-1134FW	CGCCCTACTACGGAAACTCGG	Exon 2	21 bp
<i>reverse:</i> GATA3-Primer1-3738RE	GGAGCCGTGGTGGATGGAC (Komplementäre Sequenz)	Exon 3	19 bp
Produktlänge (ohne Intron): 197 bp			

Tabelle 12: Eigenschaften des Primers GATA3

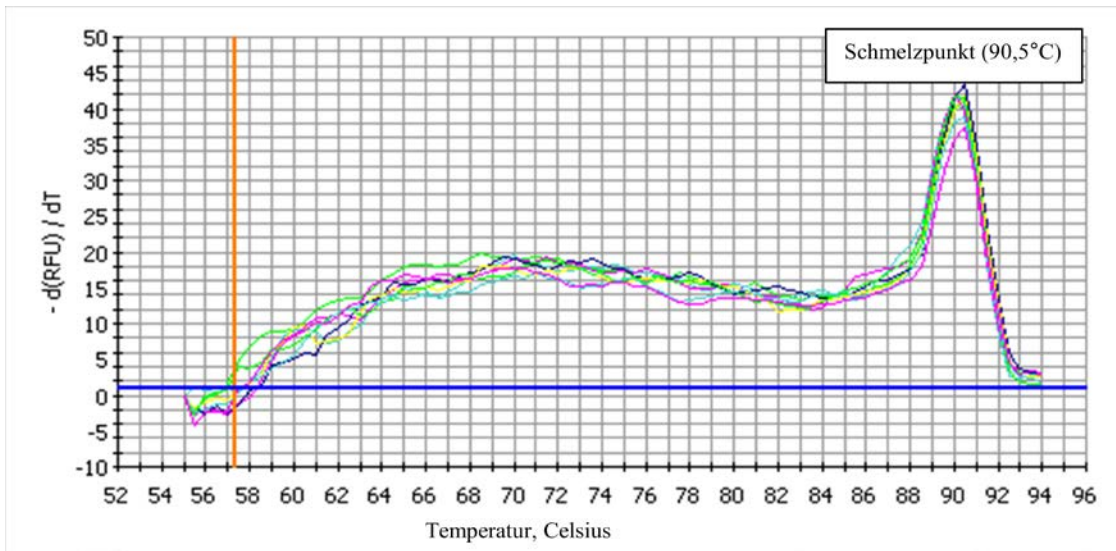


Abbildung 18: Schmelzkurve GATA3

STAT6

STAT6, *Signal transducer and activator of transcription protein 6*, liegt auf Chromosom 12.

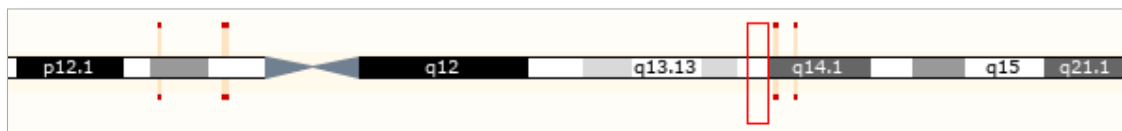


Abbildung 19: Position STAT6 auf Chromosom 12 (Ensembl.org)

STAT6 spielt eine Schlüsselrolle im IL-4/IL-13 Signalweg und ist damit essentiell für den IgE-Klassenwechsel (Kaplan et al., 1999). Außerdem gilt STAT6 als Mediator für die IL-4 Rezeptor induzierte Differenzierung der Th2-Zellen (Elo et al., 2010), unter anderem auch über Unterstützung der Expression von GATA3 (Murphy, 2008).

Für den Einzelnukleotid-Polymorphismus SNP rs324011 im zweiten Intron von STAT6 wird eine Assoziation mit der Höhe des IgE-Ausschüttung (Duetsch et al., 2002), eine Interaktion mit der STAT6 Promoter-Region und eine Allel-spezifische Bindung von NF- κ B und damit ein Einfluss auf die Regulation von STAT6 beschrieben (Schedel et al., 2009). Es gibt mehrere Splice-Varianten von STAT6, darunter auch STAT6d und STAT6e. Diese beiden Splice-Varianten entstehen über Intron-Retention und wurden im Rahmen der PARSIFAL Studie untersucht. In 239 Probanden erhöhte sich mit Vorliegen des Polymorphismus SNP rs324011 die mRNA Expression in den bisher bekannten STAT6 Isoformen (non-STAT6d/STAT6e). Stärkere Effekte zeigten sich aber in den Isoformen STAT6d und STAT6e. Ein potentieller Einfluss der beiden Splice-Varianten auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen wird vermutet (Schedel et al., 2009).

STAT6 (non-d, non-e) umfasst die bisher bekannten STAT6 Isoformen STAT6a, STAT6b und STAT6c (Patel et al., 1998a, Patel et al., 1998b, Patel et al., 1996). Zur Vereinfachung der Darstellung wird STAT6 (non-d, non-e) im Folgenden als STAT6 bezeichnet (Schedel et al., 2009).

<i>STAT6 (non-d, non-e)</i> <i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Länge</i>
<i>forward:</i> nonSTAT6d/STAT6e_fwd	AGCCACTACAAGC-CTGAAC	Exon 17/18	19 bp
<i>reverse:</i> non-STAT6d/STAT6e_rev	CATGGAGGAATCAGGGGC (Komplementäre Sequenz)	Exon 18	18 bp
Produktlänge (ohne Intron): 162 bp			

Tabelle 13: Eigenschaften STAT6

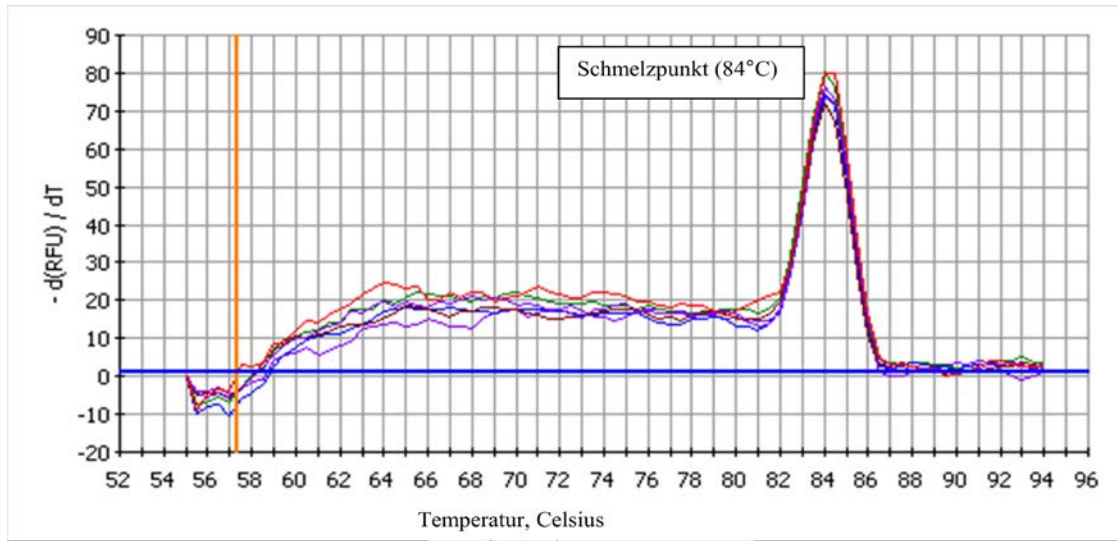


Abbildung 20: Schmelzkurve STAT6

Isoform STAT6d

<i>STAT6d</i> <i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Länge</i>
<i>forward:</i> STAT6d_fwd	CTTCCTGTCACCCACTTCCTC	Intron 17	21 bp
<i>reverse:</i> STAT6d_rev	AGTGGTTGGTCC-CTTCCAC (Komplementäre Sequenz)	Exon 18/19	20 bp
Produktlänge (ohne Intron): 246 bp			

Tabelle 14: Eigenschaften STAT6d

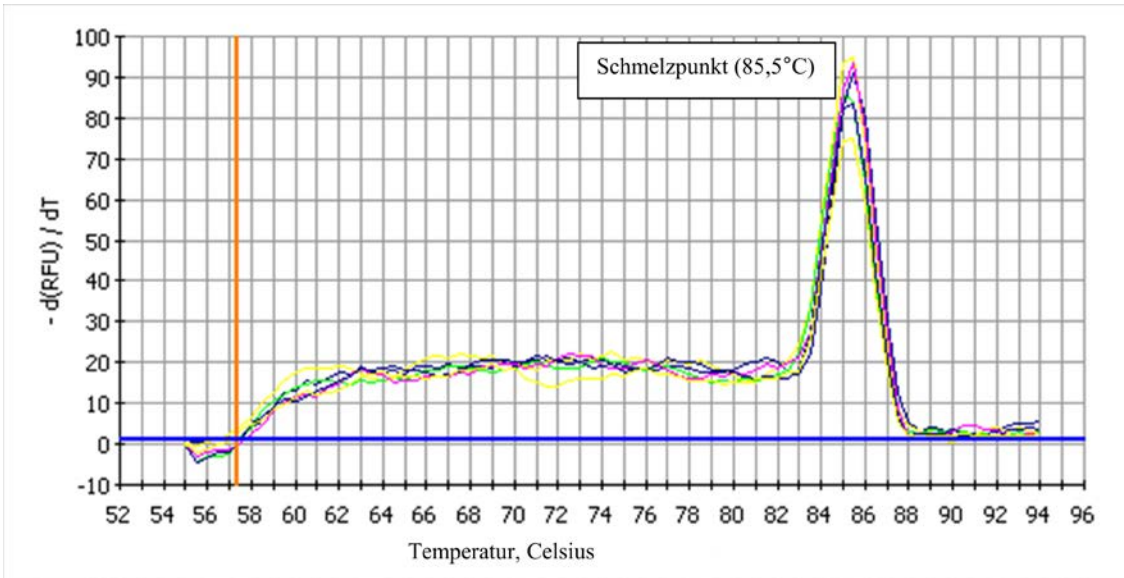


Abbildung 21: Schmelzkurve STAT6d

Isoform STAT6e

<i>STAT6e</i> Bezeichnung	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Länge</i>
<i>forward:</i> STAT6e_fwd	GGGGCCAGGATG-GCTCTC	Exon 16/17	18 bp
<i>reverse:</i> STAT6e_rev	TAAGCCCCTGACCTACCCACTG (Komplementäre Sequenz)	Intron 18	22 bp
Produktlänge (ohne Intron): 488 bp			

Tabelle 15: Eigenschaften STAT6e

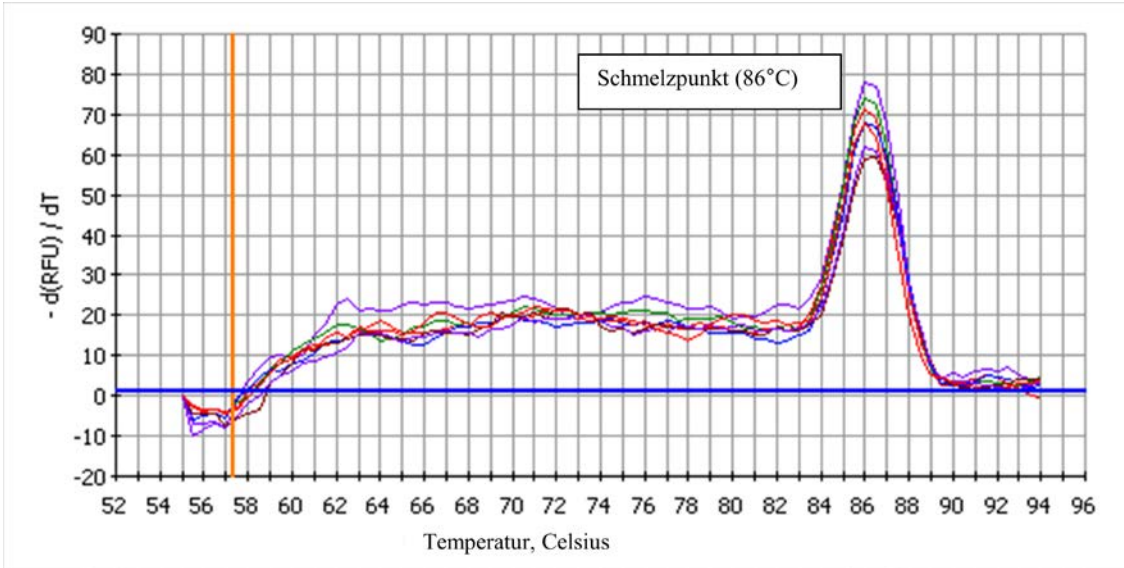


Abbildung 22: Schmelzkurve STAT6e

IL-9

Interleukin-9, im Folgenden IL-9 genannt, wird von aktivierten CD4+-T-Zellen produziert. IL-9 hat damit Einfluss auf eine Vielzahl von Untergruppen der T-Helferzellen und ist an verschiedensten Effekten dieser Untergruppen beteiligt (Li and Rostami, 2010).

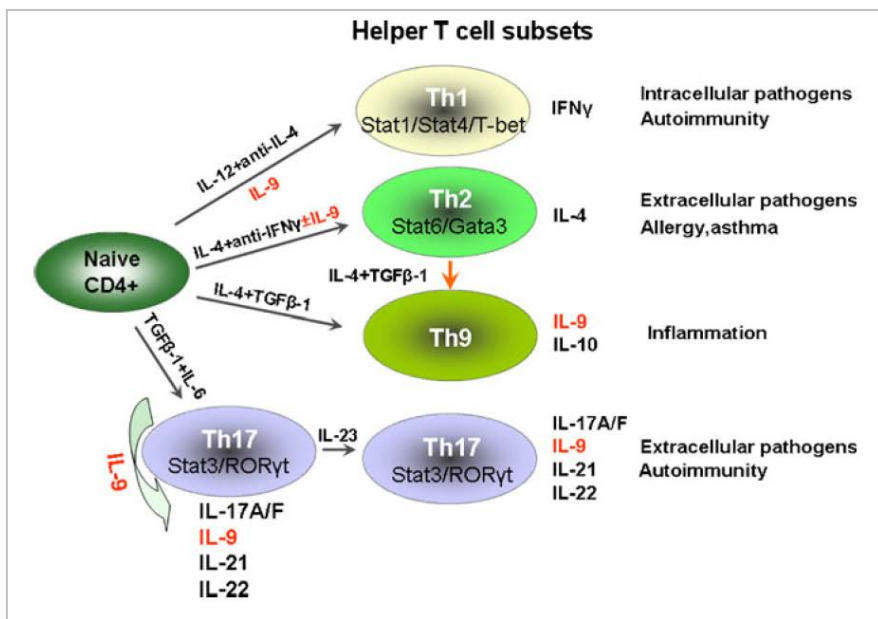


Abbildung 23: Einfluss von IL-9 (Li and Rostami, 2010)

IL-9 ist das Hauptzytokin der Th9-Zellen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen (Chang et al., 2010), bei Autoimmunerkrankungen (Jager et al., 2009) und der Antwort auf Wurminfektionen (Veldhoen et al., 2008). Die Differenzierung der Th9-Zellen ist abhängig von IL-4 und TGF β (Veldhoen et al., 2008). Ein wichtiger Transkriptionsfaktor ist PU.1 (Chang et al., 2010). Im Mausexperiment wurde gezeigt, dass bei PU.1-Defizienz keine Differenzierung der T-Zellen in Th9-Zellen möglich ist. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist IRF-4, dessen Expression wiederum von IL-4 und STAT6 – zentralen Transkriptionsfaktoren der Th2-Zellen – abhängig ist (Campos Carrascosa et al., 2017). Außerdem inhibiert IRF-4 beispielsweise Tbet als wichtigen Th1-assoziierten Transkriptionsfaktor (Goswami et al., 2012). Insofern besteht eine enge Interaktion zwischen Th1-, Th2- und Th9-Zellen, die Th9-Zellen sind essentiell für die Balance der Immunreaktion.

Speziell auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen bezogen stimuliert IL-9 als typisches Th9-Zytokin beispielsweise die Proliferation reifer T-Helferzellen und fördert bei B-Zellen unter anderem die IgE-Produktion. Außerdem stimuliert IL-9 das Wachstum von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten und reguliert den IgE-Rezeptor hoch, so dass IL-9 unter anderem eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale zugeschrieben wird (Wahn, 2005). Über den JAK/STAT-Pathway spielt IL-9 außerdem eine wichtige Rolle als Kontrollinstanz bei der Differenzierung der T-Helfer-Zellen (Adamson et al., 2009).

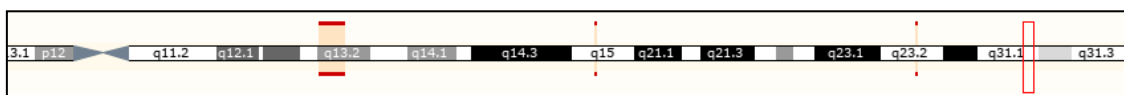


Abbildung 24: Position IL-9 auf Chromosom 5 (Ensembl.org)

<i>IL-9</i> Bezeichnung	<i>Sequenz</i>	<i>Position</i>	<i>Länge</i>
<i>forward:</i> IL9_B FW	CATGCAAACAAGATAC- CCACTG	Exon 4	22 bp
<i>reverse:</i> IL9_B REV	TTGCCTCTCATCCCTCTCATC (Komplementäre Sequenz)	Exon 5	21 bp
Produktlänge (ohne Intron): 189 bp			

Tabelle 16: Eigenschaften IL-9

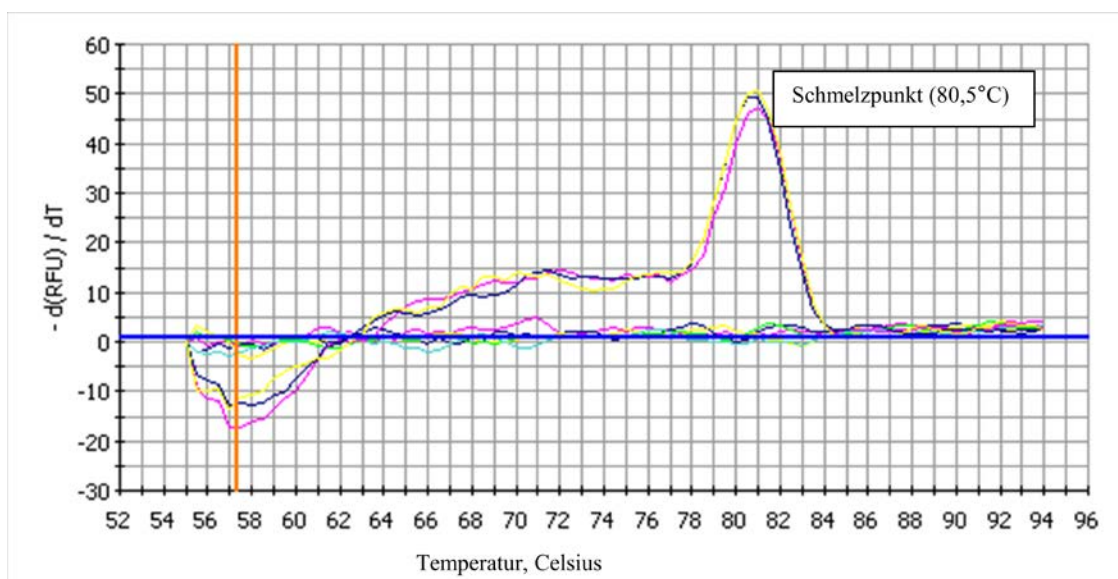


Abbildung 25: Schmelzkurve IL-9

2.7.4.3 Pipettierschema

Vor Beginn der real-time RT-PCR wird für jede Nabelschnurblut-Probe ein Pipettierschema erstellt.

	1 18S	2 GA- TA3	3 Tbet	4 HLX1	5 IRF-1	6 IL-9	7 STAT 6	8 STAT 6d	9 STAT 6e	10	11 NTC	12 NTC
A M	18S M	GATA3 M	Tbet M	HLX1 M	IRF-1 M	IL-9 M	STAT6 M	STAT6d M	STAT6e M		18S	
B M	18S M	GATA3 M	Tbet M	HLX1 M	IRF-1 M	IL-9 M	STAT6 M	STAT6d M	STAT6e M		GATA3	
C PHA	18S PHA	GATA3 PHA	Tbet PHA	HLX1 PHA	IRF-1 PHA	IL-9 PHA	STAT6 PHA	STAT6d PHA	STAT6e PHA		Tbet	
D PHA	18S PHA	GATA3 PHA	Tbet PHA	HLX1 PHA	IRF-1 PHA	IL-9 PHA	STAT6 PHA	STAT6d PHA	STAT6e PHA		HLX1	
E LpA	18S LpA	GATA3 LpA	Tbet LpA	HLX1 LpA	IRF-1 LpA	IL-9 LpA	STAT6 LpA	STAT6d LpA	STAT6e LpA		IRF-1	
F LpA	18S LpA	GATA3 LpA	Tbet LpA	HLX1 LpA	IRF-1 LpA	IL-9 LpA	STAT6 LpA	STAT6d LpA	STAT6e LpA		IL-9	
G Ppg	18S Ppg	GATA3 Ppg	Tbet Ppg	HLX1 Ppg	IRF-1 Ppg	IL-9 Ppg	STAT6 Ppg	STAT6d Ppg	STAT6e Ppg		STAT6	
H Ppg	18S Ppg	GATA3 Ppg	Tbet Ppg	HLX1 Ppg	IRF-1 Ppg	IL-9 Ppg	STAT6 Ppg	STAT6d Ppg	STAT6e Ppg		STAT6d	STAT6e

	1 18S	2 GA- TA3	3 Tbet	4 HLX1	5 IRF-1	6 IL-9	7 STAT 6	8 STAT 6d	9 STAT 6e	10	11 NTC	12
A Derp10	18S Derp10	GATA3 Derp10	Tbet Derp10	HLX1 Derp10	IRF-1 Derp10	IL-9 Derp10	STAT6 Derp10	STAT6d Derp10	STAT6e Derp10		18S	
B Derp10	18S Derp10	GATA3 Derp10	Tbet Derp10	HLX1 Derp10	IRF-1 Derp10	IL-9 Derp10	STAT6 Derp10	STAT6d Derp10	STAT6e Derp10		GATA3	
E D+P	18S D+P	GATA3 D+P	Tbet D+P	HLX1 D+P	IRF-1 D+P	IL-9 D+P	STAT6 D+P	STAT6d D+P	STAT6e D+P		Tbet	
F D+P	18S D+P	GATA3 D+P	Tbet D+P	HLX1 D+P	IRF-1 D+P	IL-9 D+P	STAT6 D+P	STAT6d D+P	STAT6e D+P		HLX1	
											IRF-1	
											IL-9	
											STAT6	
											STAT6d	STAT6e

Abbildung 26: Pipettierschema real-time RT-PCR, Platte 1 und 2

2.7.4.4 Vorbereitung der real-time RT-PCR

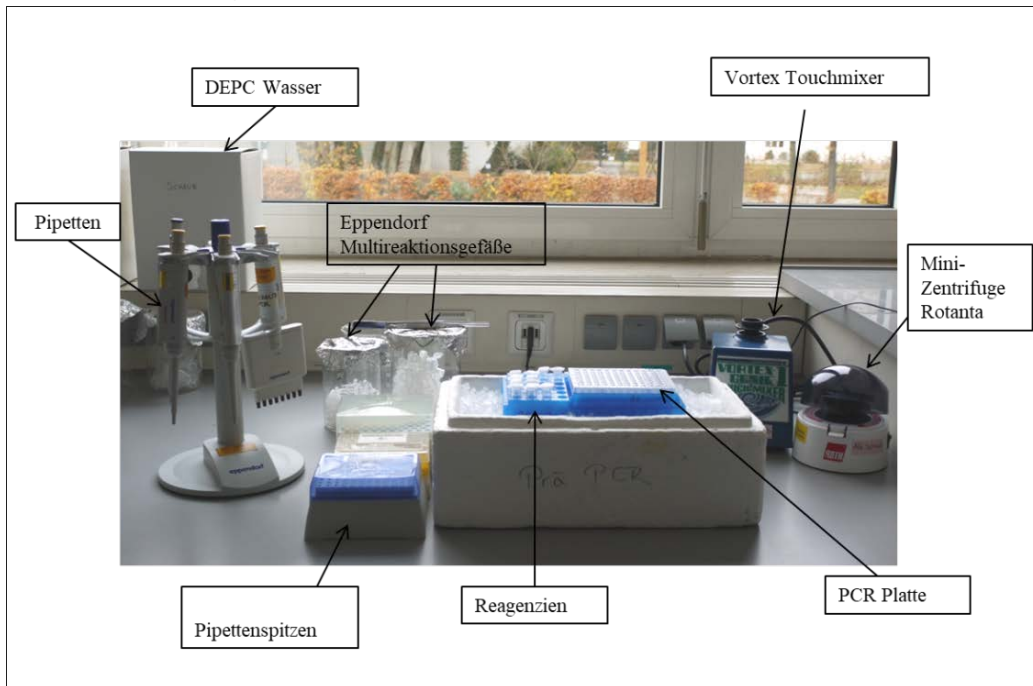


Abbildung 27: Versuchsaufbau real-time RT-PCR Vorbereitung (Foto: E. Klucker)

Zunächst werden ein cDNA-Mix, eine Fluorescein-Dilution (FITC), ein Mastermix A für die mit cDNA-versetzten Reaktionen und ein Mastermix B für die Negativkontrollen (non-template-control Reaktionen, NCT) vorbereitet. Die Negativkontrollen dienen zum Ausschluss einer Kontamination mit unspezifischer Primer-DNA (*primer-dimer*) bzw. einer Kontamination mit Fremd-DNA.

I. cDNA-Mix: Die cDNA wird so verdünnt, dass 12 ng cDNA pro Reaktion zur Verfügung stehen. Pro Reaktion (well) werden 3,6 µl cDNA-Mix pipettiert. Es wird eine 1:15 Verdünnung hergestellt:

$$= [\text{Anzahl der Reaktionen} + 2 (\text{Pipettierverlust})] \times 3,6 \mu\text{l cDNA-Mix}$$

$$= (\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times (0,24 \mu\text{l cDNA} + 3,36 \mu\text{l DEPC}).$$

II. Fluorescein-Dilution (FITC):

→ FITC Dilution 1 = 1 µl FITC Stock + 49 µl DEPC

→ FITC Dilution 2 = 1 µl FITC Dil.1 + 34 µl DEPC

III. Mastermix A:

Hergestellt aus DEPC Wasser + FITC Dil.2 + SYBR-Green. Pro Reaktion werden 18,9 µl Master-Mix verwendet.

$$= (\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times (5,3 \mu\text{l DEPC} + 1 \mu\text{l FITC Dil.2} + 12,6 \mu\text{l SYBR Green})$$

IV. Mastermix B (NTC-Mix):

Hergestellt aus DEPC Wasser + FITC Dil.2 + SYBR-Green.

Pro Reaktion werden 22,5 µl NTC-Mix pipettiert.

$$= (\text{Anzahl der Reaktionen} + 2) \times (8,9 \mu\text{l DEPC} + 1 \mu\text{l FITC Dil.2} + 12,6 \mu\text{l SYBR Green})$$

V. Die Primer werden jeweils in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ verwendet (siehe 2.7.4.2.1 Primer Design).

Protokoll siehe 8.7.4 im Anhang.

2.7.4.5 Real-time RT-PCR Ansatz

Für jede Reaktion werden $3,6 \mu\text{l}$ cDNA-Mix und $18,9 \mu\text{l}$ Mastermix A pipettiert. Anschließend werden je $7,5 \mu\text{l}$ des entsprechenden Primers hinzugefügt. Für die NCT-Reihe werden je $22,5 \mu\text{l}$ Mastermix B und $7,5 \mu\text{l}$ des entsprechenden Primers pipettiert. So hat jede Reaktion der Platte ein Volumen von $30 \mu\text{l}$.

Die pipettierte Platte wird mit Klebefolie verschlossen und anschließend für 4 Minuten bei 2.000 Umdrehungen pro Minute und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert.

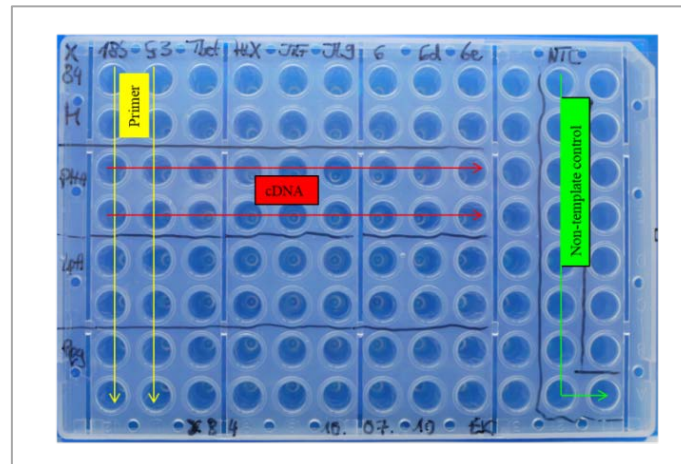


Abbildung 28: PCR-Platte (Foto: E. Klucker)

2.7.4.6 Durchführung der real-time RT-PCR

Die real-time RT-PCR wird in einem *iCycler* nach einem bereits etablierten Protokoll (siehe Tabelle 17) durchgeführt.

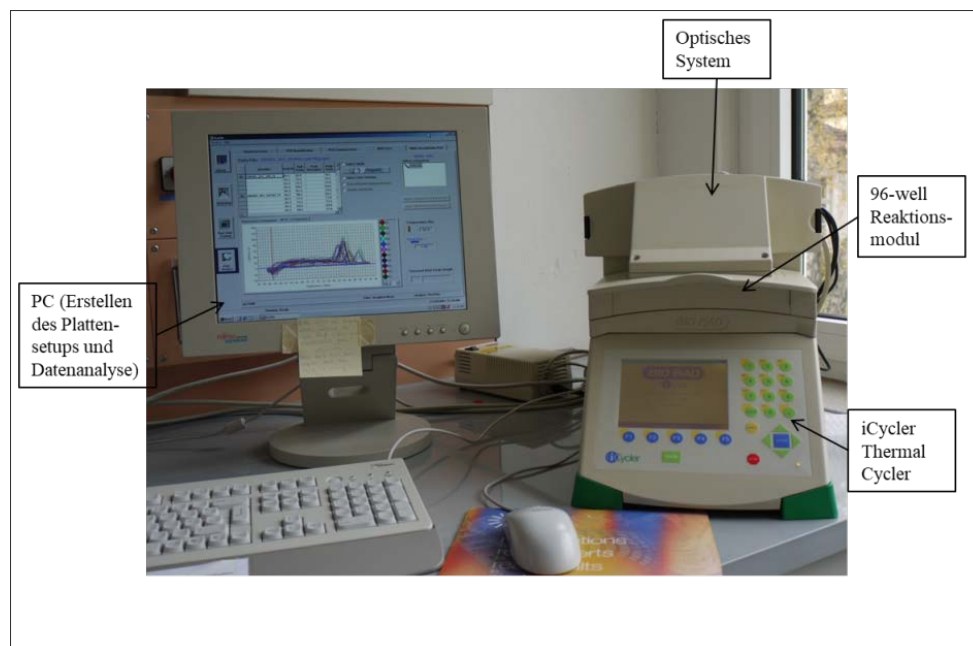


Abbildung 29: Versuchsaufbau iCycler (Foto: E. Klucker)

Zyklus	Wiederholungen	Temperatur	Dauer	Zweck
1	1	95,0 °C	10:00 min	Initialisierung
2	40	Step 1: 95,0 °C	00:20 min	Denaturierung
		Step 2: 62,5 °C	01:00 min	Annealing
		Step 3: 72,0 °C	00:40 min	Elongation
3	1	72,0 °C	02:00 min	Elongation
4	1	95,0 °C	00:30 min	
5	1	55,0 °C	00:30 min	
6	80	55,0 °C	00:10 min	
7	1	15,0 °C	HOLD	

Tabelle 17: Protokoll real-time RT-PCR „Paulina 62,5 long2.tmo“

2.7.5 Gel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Molekülgröße. In einem elektrischen Feld wandern die durch Phosphatreste negativ-geladenen DNA-Fragmente von der Anode zur Kathode durch ein Gel, das in einer ionischen Pufferlösung liegt. Lange DNA-Fragmente wandern langsamer als kurze DNA-Fragmente, so dass sie anhand ihrer Größe sortiert werden (Wahn, 2005). In Abhängigkeit von der Gel-Konzentration ist eine Auftrennung der DNA-Fragmente bis zu einer Länge von 50 Basenpaaren möglich.

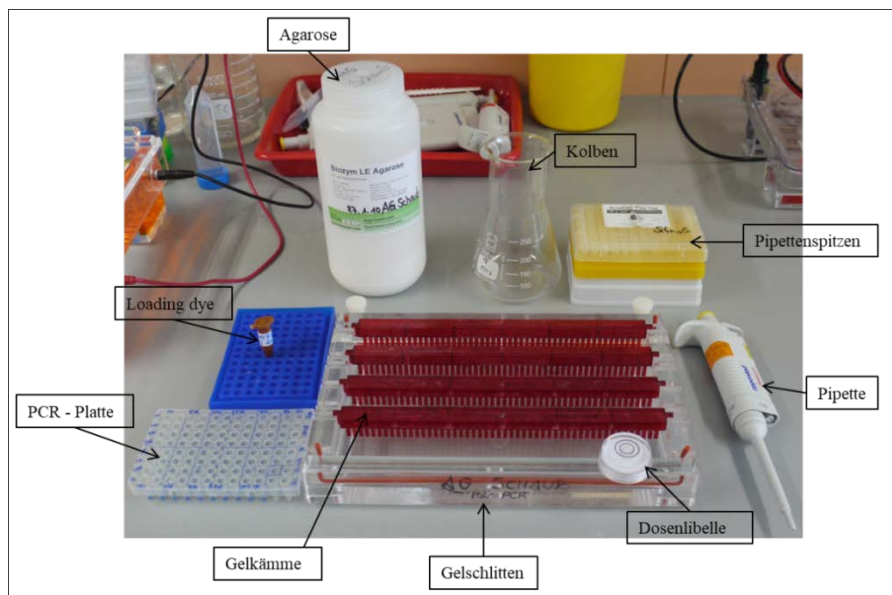


Abbildung 30: Versuchsaufbau Gießen eines Gels (Foto: E. Klucker)

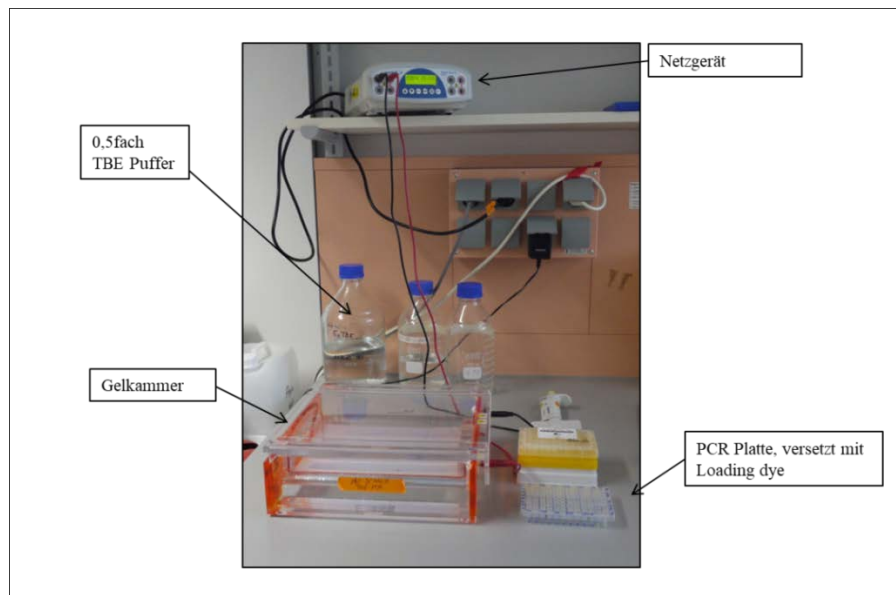


Abbildung 31: Versuchsaufbau Gel-Elektrophorese (Foto: E. Klucker)

Im Gel ist ein Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Zur Durchführung der Experimente im Rahmen dieser Dissertation wurde beispielsweise GelRed verwendet (siehe 2.5 Reagenzien). Es entsteht ein charakteristisches Bandenmuster, das unter UV-Licht sichtbar wird (Adkins and Burmeister, 1996). Eine Standardsubstanz, *ladder* genannt, wird jeweils am Anfang und am Ende eines jeden Gelstreifens aufgetragen. Diese Standardsubstanz enthält DNA-Fragmente einer Größe bis zu 100 bp und dient als Größensmarker. Die bekannte Länge der verwendeten Primer kann so mit der Anzahl der Basenpaare der amplifizierten Genprodukte verglichen werden und ermöglicht damit letztlich eine Qualitätskontrolle der durchgeführten real-time RT-PCR. Protokoll siehe 8.7.5 (Gießen eines Agarosegels) und 8.7.6 (Gelelektrophorese) im Anhang.

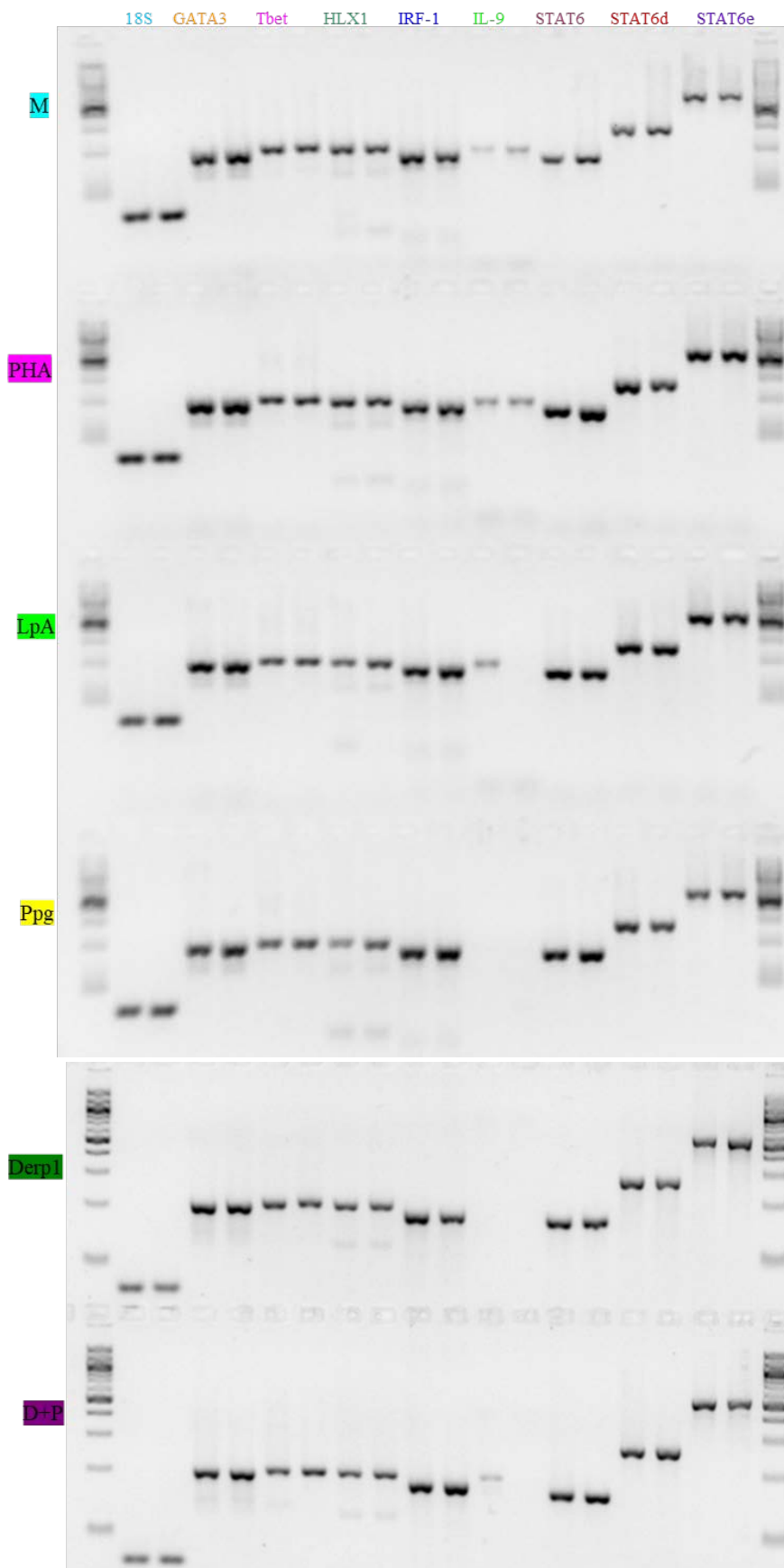


Abbildung 32: Resultat Gelelektrophorese (Foto: E. Klucker)

2.8 Auswertung der real-time RT-PCR

Alle Proben werden in Duplikaten pipettiert. Die real-time RT-PCR wird nach obigem Protokoll bei stets exakt gleicher Temperatur durchgeführt. Die Auswertung der generierten Daten erfolgt anhand der Schmelzkurve und der Rohdaten sowie der ct-Werte unter Berücksichtigung der Qualitätskontrolle mittels Gel-Elektrophorese.

Die PCR-Daten liegen pro Probe unstimuliert (Media) sowie in den fünf Stimulationsbedingungen (PHA, LpA, Ppg, Derp, DundP) vor.

Die Auswertung der real-time RT-PCR Daten erfolgt in folgenden Schritten:

1. Unmittelbar nach Durchführung der PCR Beurteilung der Schmelzkurven und ct-Werte der pipettierten Duplikate, ggf. Festlegen von Wiederholungen oder Ausschlüssen.
2. Pro pipettierter Patientenprobe wird ein Datenblatt mit allen erhobenen und für valide befundenen ct-Werten erstellt und der Mittelwert aus den Duplikaten errechnet.
3. Zusammenstellung der validen ct-Werte aller Proben in einem Tabellenblatt pro verwendetem Primer, Berechnung der delta-ct-Werte (Δ ct).

Der ct-Wert oder *threshold cycle* beschreibt den Teil der Schmelzkurve, in dem die Fluoreszenz erstmalig exponentiell über den Hintergrund ansteigt und bildet damit die Anzahl der abgelaufenen Zyklen bis zum Amplifikationsstart ab (Heid et al., 1996), vgl. Abbildung 33. Hierbei ist zu beachten, dass höhere ct-Werte eine niedrigere Genexpression bedeuten, da eine Amplifikation erst in einem späteren real-time RT-PCR Zyklus erfolgt. Bei gut detektierbaren Proben mit idealen Schmelzkurven und ähnlichen Werten der Duplikate wird der Mittelwert der ct-Werte berechnet.

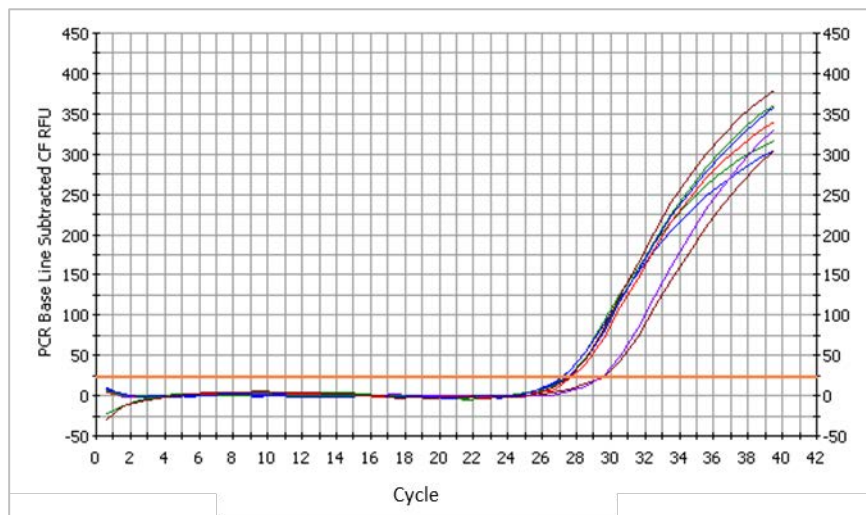


Abbildung 33: Beispiel für eine ideale exponentielle Amplifikationskurve (Tbet)

Eine ideale Schmelzkurve zeigt ein klares Temperaturmaximum. An diesem Punkt lagern sich die Primer an die komplementären cDNA-Abschnitte der dissoziierten Einzelstränge an, die Amplifikation beginnt.

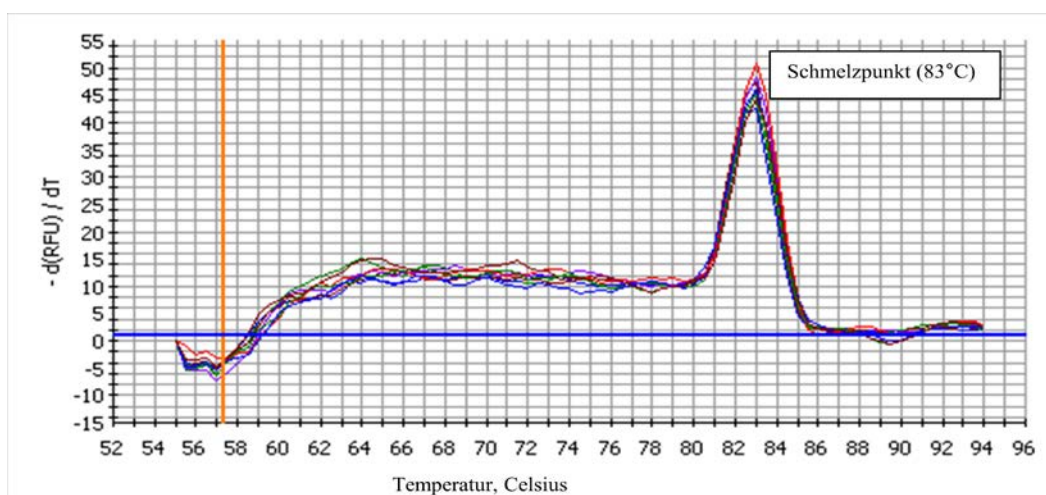


Abbildung 34: Beispiel für eine ideale Schmelzkurve (Tbet)

Die folgende Tabelle ist ein Beispiel für die ct-Werte der in Abbildung 34 dargestellten Probe (Genexpression Tbet unstimuliert sowie in 5 Stimulationsbedingungen in einer Patientenprobe):

Tbet	ct-Wert	Mittelwert	Schmelzkurve	Wert akzeptiert
M	28,6	28,45	+	+
	28,3		+	
PHA	27,3	27,15	+	+
	27		+	
LpA	27,6	27,45	+	+
	27,3		+	
Ppg	26,4	26,8	+	+
	27,2		+	
Derp	27,6	27,55	+	+
	27,5		+	
DundP	27,7	27,55	+	+
	27,4		+	

Tabelle 18: Beispiel einer Auswertung der real-time RT-PCR Daten (Tbet)

Im gewählten Beispiel zeigen sich ausschließlich gut detektierte ct-Werte mit einer idealen Schmelzkurve, so dass alle Werte in die Auswertung übernommen werden können.

Allerdings liegen auch laut der automatischen Auswertung sogenannte nicht-detektierbare Proben vor. Wenn allerdings dennoch ein adäquates Signal in der Schmelzkurve zu erkennen ist, wird der ct-Wert nachträglich auf den nahezu höchsten ct-Wert gesetzt, nämlich 38, was wiederum eine niedrige Expression bedeutet. Diese Werte werden als zensiert markiert und in der statistischen Analyse berücksichtigt. Insgesamt war dies bei Verwendung der Primer GATA3, Tbet, HLX1, IRF1 sowie STAT6 und den Isoformen STAT6d und STAT6e nur sehr selten notwendig. IL-9 hingegen zeigt generell eine sehr niedrige Expression im Nabelschnurblut, so dass möglicherweise das Signal zu schwach ist, um eine verlässliche Quantifizierung mittels real-time RT-PCR zu erreichen (vgl. Tabelle 38 im Anhang, Detektionsrate der real-time RT-

PCR). Aufgrund der im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen geringeren Detektion ist die Interpretation der IL-9 bezogenen Daten unter Vorbehalt zu sehen.

Nach erster Analyse der real-time RT-PCR Daten und Berechnung der Mittelwerte wird im letzten Schritt der Auswertung Δct berechnet. Hierfür wird die Differenz des untersuchten Gens zum sogenannten *housekeeping gene* 18S gebildet.

$$\Delta ct = (\text{ct-Wert Gen}) - (\text{ct-Wert 18S})$$

Die ct-Werte für das Referenzgen 18S waren stets niedriger als die der untersuchten Gene. Dies bedeutet also, dass 18S wie erwartet stets höher exprimiert ist.

2.9 Zytokine

Bereits im Vorfeld dieser Dissertation erfolgte eine Messung der Zytokin-Sekretion durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Schaub im Dr. von Haunerschen Kinderspital.

Nach Isolation der mononukleären Zellen aus dem Nabelschnurblut und Stimulation mit den bereits genannten Stimuli PHA, LpA, Ppg, Derp und DundP (vgl. Abschnitt 2.7.2 Zellisolation und -stimulation), wurde im Zellüberstand unter Verwendung des Human Cytokine-Multiplex-Assay-Kit (Bio-Rad, München) mittels der Luminex™-Technologie die Zytokin-Sekretion gemessen und quantifiziert (Schaub et al., 2009), Protokoll siehe 8.7.7 im Anhang.

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems und stellen ein Netzwerk von Signalen bereit, wodurch die Immunregulation koordiniert wird. Die Zytokine werden in vier Untergruppen eingeteilt: Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren und Koloniestimulierende Faktoren (Wahn, 2005). Im Rahmen dieser Dissertation wird der Fokus auf drei Zytokine gelegt, die allesamt der Gruppe der Interleukine zuzuordnen sind: Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-12 (IL-12). Diese wurden aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Pathogenese allergischen Erkrankungen und insbesondere Asthma bronchiale ausgewählt.

2.9.1 Interleukin-5

IL-5 wird von Th2-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten produziert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der eosinophilen Inflammationsreaktion in den Atemwegen bei Patienten mit Asthma bronchiale, es wirkt chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten (Lemanske and Busse, 2010). So ist beispielsweise der IL-5 Rezeptor Ziel einer Antikörpertherapie bei schwerem, therapierefraktärem Asthma bronchiale (Pelaia et al., 2018, Haldar et al., 2009). Bei Erwachsenen ist Anti-IL-5 in Form des Antikörpers Mepolizumab bei schwerem, therapierefraktärem eosinophilem Asthma bronchiale bereits etabliert (Haldar et al., 2009) und auch bei Kindern ist dieser Antikörper seit 2018 ab dem 6. Lebensjahr zur Behandlung des therapierefraktären Asthma bronchiale zugelassen (Just et al., 2019).

2.9.2 Interleukin-6

IL-6 wird von aktivierten T-Lymphozyten, mononukleären Phagozyten und Mastzellen gebildet. IL-6 ist ein endogenes Pyrogen. Die Schwere eines Infekts korreliert mit der systemischen Konzentration des Zytokins. Außerdem induziert IL-6 in der Leber die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und fördert die Synthese von Immunglobulinen als Kofaktor des Wachstums von B-Lymphozyten (Wahn, 2005). Auch bei Patienten mit Asthma bronchiale werden erhöhte IL-6 Spiegel sowohl im Serum (Yokoyama et al., 1995) als auch in der bronchoalveolären Lavage (Tillie-Leblond et al., 1999) beschrieben. Im Maus-Experiment zeigt sich, dass das IL-6 Gen in Lungenepithelzellen exprimiert und durch Allergenkontakt die Zytokinproduktion getriggert wird noch bevor es zur Rekrutierung der Entzündungszellen kommt (Kishimoto, 2010). Insofern wird der Nachweis von IL-6 im Lungenepithel asthmatischer Patienten nicht als Ergebnis einer Entzündungsreaktion, sondern als Zeichen einer Aktivierung der Lungenepithelzellen beschrieben. IL-6 hat damit eine Schlüsselrolle als Mediator der pulmonalen Immunantwort (Rincon and Irvin, 2012) und wird beispielsweise in seiner Zuverlässigkeit als Biomarker für Asthma bronchiale untersucht (Ilmarinen et al., 2016). Einschränkend ist allerdings zu erwähnen, dass der IL-6 Spiegel durch zahlreiche Komorbiditäten wie Adipositas oder virale Infektionen beeinflusst wird (Rincon and Irvin, 2012). Im Rahmen dieser Dissertation wurden Kinder mit Infektionen ausgeschlossen, die Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Geburtsgewichts, so dass diese möglichen Komorbiditäten in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss haben sollten. Die IL-6 Serumspiegel gelten auch als Verlaufsparemeter bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, beispielsweise der idiopathischen Arthritis (Lerkvaleekul and Vilaiyuk, 2018). Auch eine IL-6 Antikörpertherapie bei rheumatischen Erkrankungen steht derzeit im Fokus des Interesses (Hashimoto et al., 2018).

2.9.3 Interleukin-12

IL-12 wird hauptsächlich von B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert. IL-12 ist über Regulation von IFN- γ an der Antwort auf bakterielle, virale oder parasitäre Infekte beteiligt, es reguliert die Th1-Zell-Differenzierung und hemmt die Th2-assoziierte Immunantwort und indirekt auch die IgE-Synthese. Denn IL-12 induziert die IFN- γ Produktion durch aktivierte B-Zellen und IFN- γ wiederum hemmt die IL-4-abhängige IgE-Produktion (Yoshimoto et al., 1997). Der IL-12 Spiegel im Serum von Patienten, die an allergischem Asthma erkrankt sind, ist niedriger im Vergleich zu gesunden Probanden (van der Pouw Kraan et al., 1997). Im Tiermodell zeigt sich nach Behandlung mit IL-12 eine verminderte IgE-Synthese sowie eine verminderte antigeninduzierte bronchiale Hyperreagibilität (Kips et al., 1996). Bei malignen Erkrankungen ist rekombinantes IL-12 Gegenstand der Forschung als Therapeutikum beispielsweise in der Therapie des Mamma-Karzinoms. Es wird eine anti-proliferative, anti-angiogenetische und anti-metastatische Wirkung beschrieben (Shi et al., 2004).

3 STATISTISCHE METHODEN

Die statistischen Analysen wurden mittels Microsoft Excel, dem Statistikprogramm SPSS sowie R: A Language and Environment for Statistical Computing (vgl. Tab. 6: Software) durchgeführt.

Zur Berechnung der deskriptiven Daten wird für kategoriale Variablen der χ^2 -Test bzw. für ordinalskalierte Variablen der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert bzw. Median und Interquartilenabstand.

Nach Berechnung des Δ ct Wertes (vgl. 2.8 Auswertung der real-time RT-PCR) erfolgt nach Ausschluss einer Normalverteilung die statistische Analyse der PCR-Daten mittels Mann-Whitney-U- und Wilcoxon-Test. Die Ergebnisse werden als Boxplot dargestellt. Die Darstellung der Korrelation der Genexpression erfolgt mittels Spearman Rangkorrelationen. Statistische Signifikanzen werden definiert als p-Wert $\leq 0,05$, Trends als p-Wert $\leq 0,1$.

Um eine Änderung im Ergebnis durch eine Änderung des Prädiktors um eine Einheit zu beschreiben, wird der Regressionskoeffizient *Koeffizient* β verwendet. Als abhängige Variable gilt die Genexpression als Δ ct-Wert. Als Prädiktor gelten die Variablen Bauernkind, Geschlecht des Kindes, mütterliche Atopie, mütterliches Asthma und mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft.

Beispiel:

Abhängige Variable: Genexpression (Δ ct)

Prädiktor: Bauernkind

Koeffizient β : 3

Interpretation: Bauernkinder haben im Mittel einen um 3 höheren Δ ct-Wert als Nichtbauernkinder.

Aus dem Koeffizienten β wird der *CIE* (*change in estimate*) berechnet. Dieser errechnet sich aus den Koeffizienten vor und nach Adjustierung für Geschlecht, mütterliche Atopie, mütterliches Asthma und Rauchen.

$$\text{CIE} = [(\beta \text{ nach Adjustierung} - \beta \text{ vor Adjustierung}) / \beta \text{ vor Adjustierung}] * 100$$

Ergebnis ist eine Angabe in Prozent, die eine Einschätzung der Veränderung nach Adjustierung erlaubt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Epidemiologie

4.1.1 Charakteristika der PAULCHEN-Studienpopulation

Die Studienteilnehmer wurden in zwei Gruppen aufgeteilt (Schaub et al., 2009):

1.) Bauernkinder

Definition: Die Mutter lebt und arbeitet in den letzten 1-5 Jahren und während der Schwangerschaft auf einem Bauernhof.

2.) Nicht-Bauernkinder

Definition: Die Mutter lebt auf dem Land in der Gegend um Bad Tölz, jedoch nicht direkt auf einem Bauernhof und geht keiner landwirtschaftlichen Berufstätigkeit nach.

	Nicht-Bauernkind n = 66	Bauernkind n = 25	p-Wert
Mutter			
Alter (Median ± IQR)	31 (27/34)	30 (24/34,5)	0,321†
Rauchen n (%)			0,032 *
Nein	30 (45 %)	20 (80 %)	
Ja, während der Schwangerschaft	7 (11 %)	1 (4 %)	
Ja, bis Bekanntwerden der Schwangerschaft	12 (18 %)	2 (8 %)	
Ja, vor Schwangerschaft aufgehört	17 (25 %)	2 (8 %)	
Bildung n (%)			0,043 *
Hauptschule	16 (24 %)	10 (40 %)	
Realschule	26 (39 %)	13 (52 %)	
Gymnasium/FOS	13 (20 %)	0	
Universität/FH	11 (17 %)	2 (8 %)	
Atopie n (%)			
gesamt	21 (32 %)	5 (20 %)	0,265
Asthma bronchiale	5 (7 %)	2 (8 %)	0,946
Heuschnupfen	16 (24 %)	2 (8 %)	0,083
Atopisches Ekzem	5 (7 %)	1 (4 %)	0,54
Serum IgE (IU/ml, Median ± IQR)	34,3 (13/121,9)	27,4 (5,8/59,4)	0,274†
Entbindung vaginal n (%)	58 (88 %)	18 (72 %)	0,068
Vater			
Atopie n (%)			
gesamt	17 (26 %)	4 (2 %)	0,324
Asthma bronchiale	4 (6 %)	1 (4 %)	0,700
Heuschnupfen	15 (23 %)	3 (1 %)	0,252
Atopisches Ekzem	3 (4 %)	0	0,278
Kind			
Geschlecht Weiblich n (%)	32 (48 %)	15 (60 %)	0,326
Gestationsalter (Wochen, Median ± IQR)	40 (39,8/40,5)	40,4 (39/41)	0,490†
Geburtsgewicht (g, Median ± IQR)	3540 (3307/3852)	3600 (3270/4020)	0,660†
Geburtslänge (cm, Median ± IQR)	52 (50/53)	52 (50/53,5)	0,749†
Geschwister n (%)			0,129
0	35 (53 %)	12 (48 %)	
1	20 (30 %)	4 (16 %)	
2	5 (8 %)	6 (24 %)	
3	4 (6 %)	3 (12 %)	
4	2 (3 %)	0 (0 %)	

Tabelle 19: Charakteristika der PAULCHEN-Studienpopulation: Vergleich Bauernkind versus Nicht-Bauernkind.

† Wilcoxon-Rangsummentest, ansonsten χ^2 -Test. **p ≤ 0,05.**

In einer Untergruppe von 72 Probanden wurde die Genexpression mittels real-time RT-PCR gemessen. Die Auswahl der Probanden erfolgte anhand der verfügbaren RNA-Menge. Zusammengefasst ähnelt die Untergruppe der PAULCHEN-Studienpopulation, in welcher die real-time RT-PCR durchgeführt wurde, der Gesamtpopulation. Innerhalb der Subgruppe zeigen sich zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich atopischer Erkrankungen der Eltern, mütterlichem Rauchen und Höhe des IgE im mütterlichen Serum, Bildungsabschluss der Mutter, Entbindungsmodus, Gestationsalter, Geburtsmaße sowie Anzahl an Geschwisterkindern.

	Nicht-Bauernkind n = 52	Bauernkind n = 20	p-Wert
Mutter			
Alter (Median ± IQR)	30,5 (27/34)	31 (24/34,7)	0,504†
Rauchen n (%)			0,061
Nein	24 (46 %)	16 (80 %)	
Ja, während der Schwangerschaft	5 (10 %)	0 (0 %)	
Ja, bis Bekanntwerden der Schwangerschaft	8 (15 %)	2 (10 %)	
Ja, vor Schwangerschaft aufgehört	15 (29 %)	2 (10 %)	
Bildung n (%)			0,099
Hauptschule	14 (27 %)	8 (40 %)	
Realschule	18 (35 %)	10 (50 %)	
Gymnasium/FOS	10 (19 %)	0	
Universität/FH	10 (19 %)	2 (10 %)	
Atopie n (%)			
gesamt	17 (32 %)	4 (20 %)	0,289
Asthma bronchiale	4 (8 %)	2 (10 %)	0,751
Heuschnupfen	12 (23 %)	2 (10 %)	0,209
Atopisches Ekzem	4 (8 %)	0 (0 %)	0,202
Serum IgE (IU/ml, Median ± IQR)	24,7 (11,9/88,3)	28,3 (11,3/94)	0,702†
Entbindung vaginal n (%)	45 (86 %)	16 (80 %)	0,490
Vater			
Atopie n (%)			
gesamt	13 (25 %)	3 (15 %)	0,361
Asthma bronchiale	1 (2 %)	1 (5 %)	0,477
Heuschnupfen	13 (25 %)	2 (10 %)	0,16
Atopisches Ekzem	3 (6 %)	0	0,273
Kind			
Geschlecht Weiblich n (%)	25 (48 %)	12 (60 %)	0,365
Gestationsalter (Wochen, Median ± IQR)	40 (39,6/40,6)	40,1 (39/40,9)	0,676†
Geburtsgewicht (g, Median ± IQR)	3555 (3307/3885)	3575 (3245/3800)	0,94†
Geburtslänge (cm, Median ± IQR)	52 (50/53)	52,5 (50/53,7)	0,784†
Geschwister n (%)			0,242
0	26 (50 %)	9 (45 %)	
1	17 (33 %)	4 (20 %)	
2	5 (9 %)	4 (20 %)	
3	2 (4 %)	3 (15 %)	

Tabelle 20: Charakteristika der PAULCHEN-Studienpopulation, real-time RT-PCR Untergruppe: Vergleich Bauernkind versus Nicht-Bauernkind. † Wilcoxon-Rangsummentest, ansonsten χ^2 -Test. **p ≤ 0,05.**

4.2 Real-time RT-PCR

Es wurden Nabelschnurblut-Proben von insgesamt 72 Kindern untersucht, unterteilt in Proben von 52 Nicht-Bauernkindern und 20 Bauernkindern.

Basierend auf der Zellzahl und der RNA-Menge konnten bei wenigen Kindern nicht alle Stimulationsbedingungen analysiert werden. Außerdem wurden die Stimulationen mit Ppg, Derp und DundP nach den Stimulationen mit LpA und Ppg durchgeführt, da die Stimulation mit Derp und DundP nur für einen Teil der Kinder im Gesamtdesign geplant war.

Stimulus	n (Tbet)	n (HLX1)	n (IRF1)	n (GATA3)	n (STAT6)	n (STAT6d)	n (STAT6e)	n (IL-9)
M	72	72	71	72	72	72	72	72
PHA	69	69	68	69	69	69	69	69
LpA	69	69	67	69	69	69	69	69
Ppg	67	67	67	67	67	67	67	67
Derp	30	30	30	30	30	30	30	30
DundP	25	25	25	25	25	25	25	25

Tabelle 21: Anzahl der untersuchten Proben pro Gen und Stimulus

Die Detektionsrate beschreibt den Prozentsatz der real-time RT-PCR-Daten, die in die Auswertung einfließen. Alle untersuchten Gene außer IL-9 waren im Nabelschnurblut gut exprimiert. Für Tbet, HLX1, IRF1, GATA3, STAT6, STAT6d und STAT6e zeigt sich eine Detektionsrate von 97-100 %, für IL-9 liegt die Detektionsrate bei 78-90 % (vgl. Tab. 38 im Anhang).

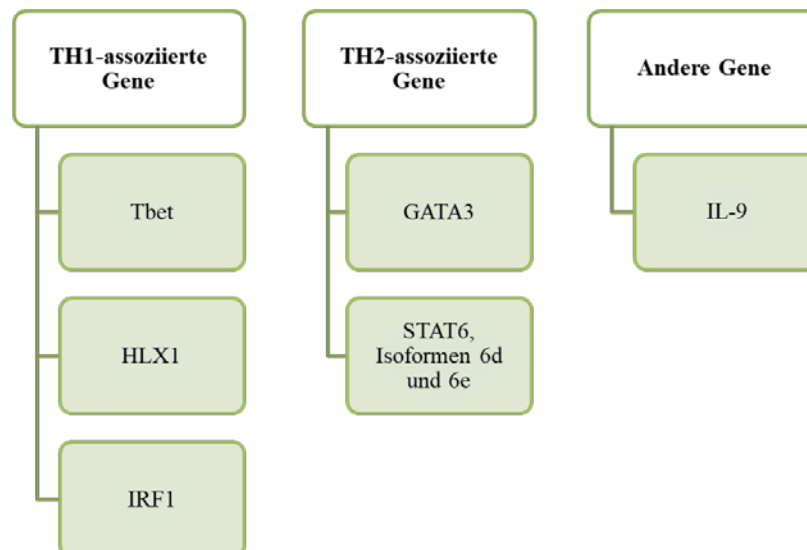


Abbildung 35: Überblick der untersuchten Gene

4.2.1 Th1-assoziierte Gene

4.2.1.1 Tbet

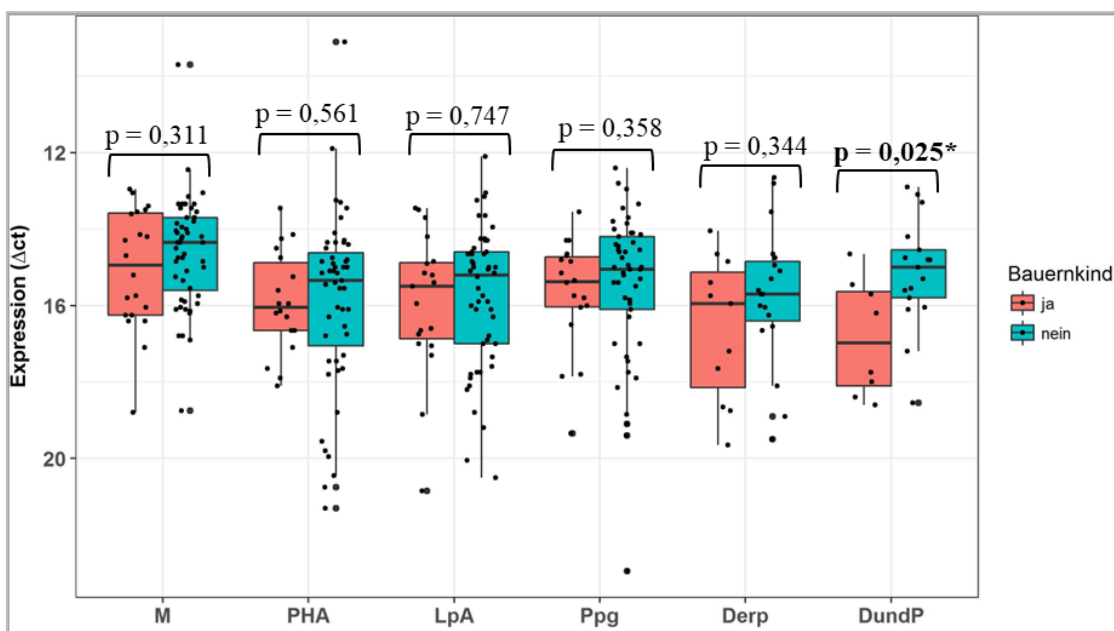


Abbildung 36: Genexpression Tbet. * $p \leq 0,05$

In der Genexpression von Tbet zeigt sich eine signifikant niedrigere Expression in Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern nach Stimulation mit DundP.

4.2.1.2 HLX1

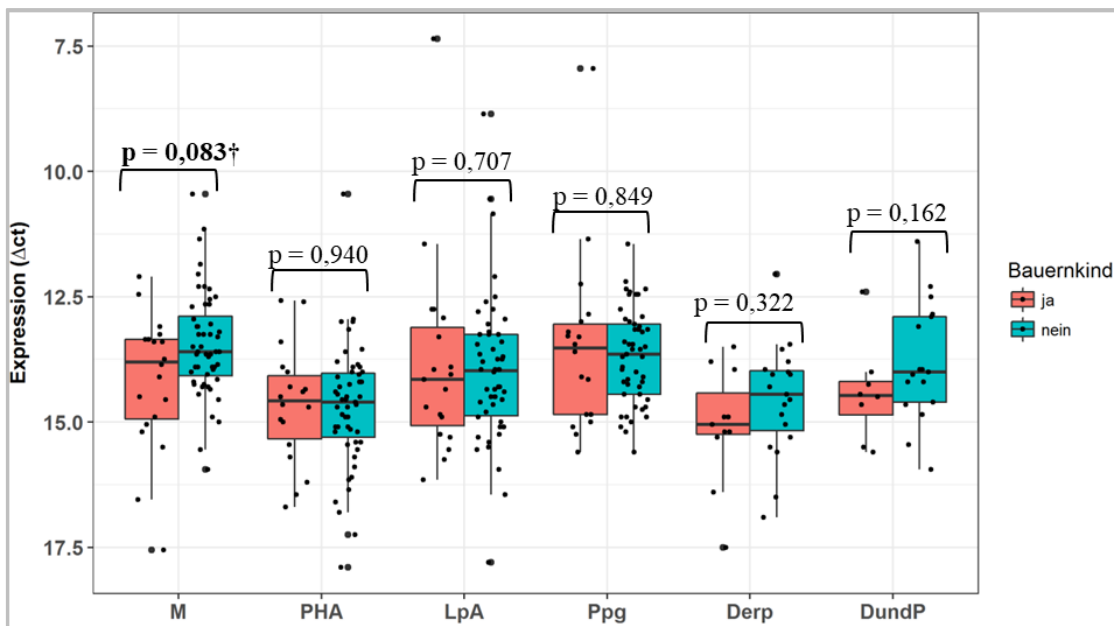


Abbildung 37: Genexpression HLX1. † $p \leq 0,1$ (Trend)

In der Genexpression für HLX1 ohne Stimulation zeigt sich im Nabelschnurblut von Bauernkindern eine tendentiell niedrigere Expression im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern ($p=0,083$).

4.2.1.3 IRF1

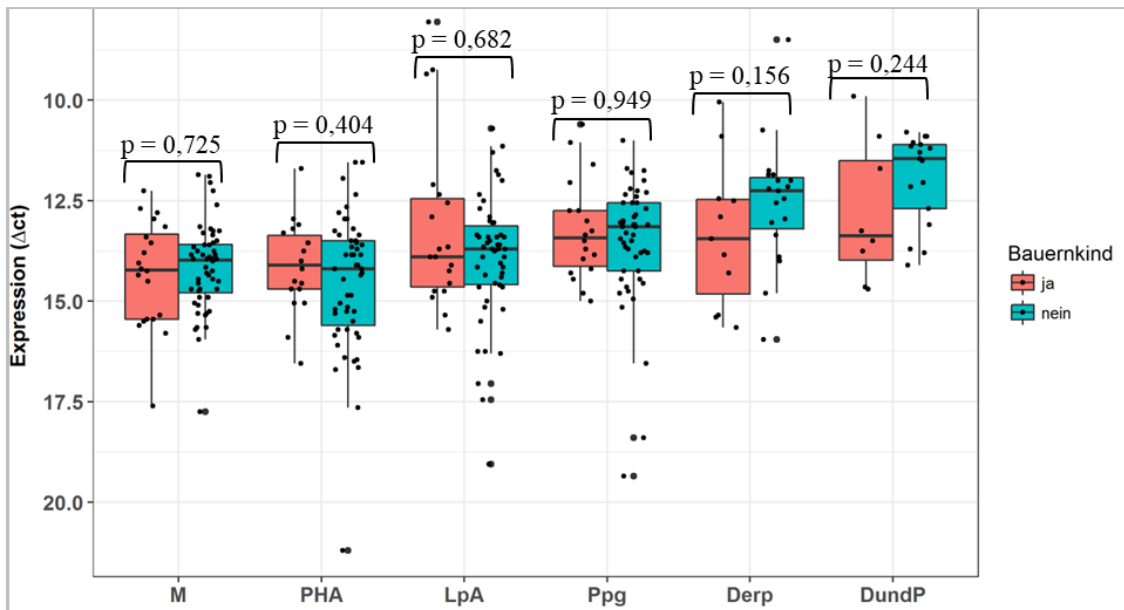


Abbildung 38: Genexpression IRF1.

In der Genexpression von IRF1 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern.

4.2.2 Th2-assozierte Gene

4.2.2.1 GATA3

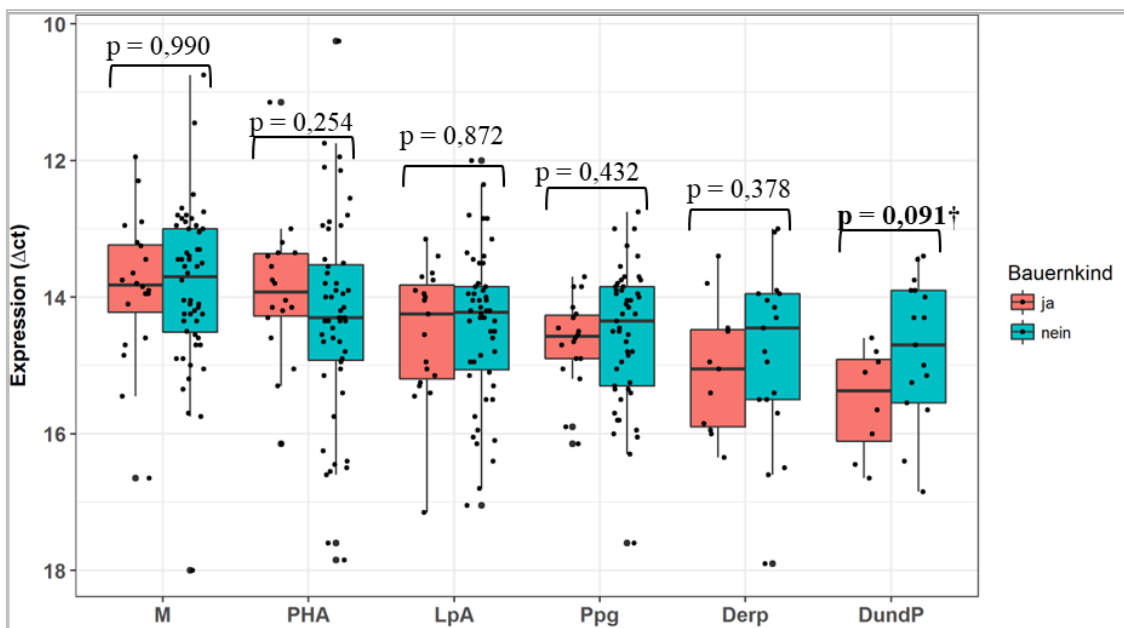
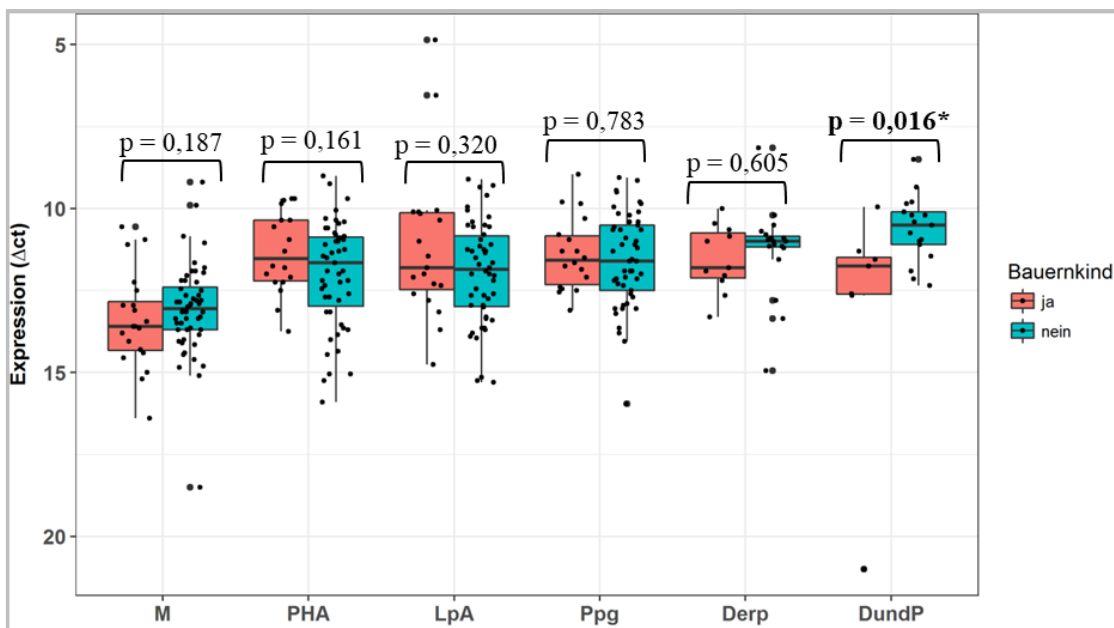


Abbildung 39: Genexpression GATA3. † $p \leq 0,1$ (Trend)

GATA3 ist im Nabelschnurblut von Bauernkindern nach Stimulation mit DundP im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern trendweise niedriger exprimiert ($p=0,091$).

4.2.2.2 STAT6

Abbildung 40: Genexpression STAT6. * $p \leq 0,05$

Nach Stimulation mit DundP ist STAT6 im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern signifikant niedriger exprimiert.

4.2.2.3 STAT6d

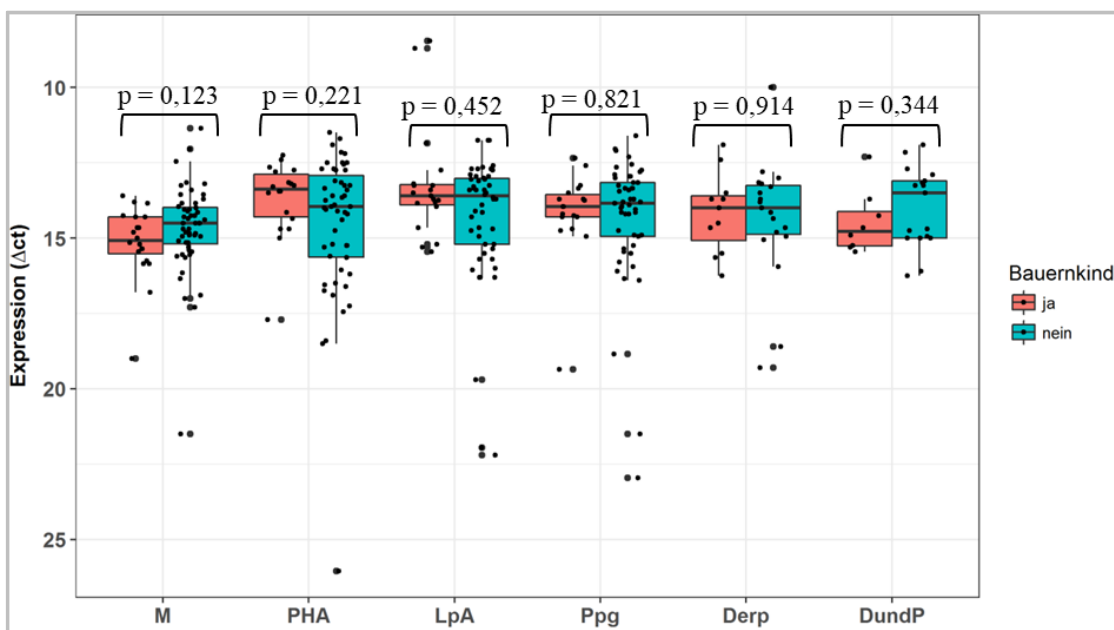


Abbildung 41: Genexpression STAT6d.

In der Genexpression von STAT6d zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern.

4.2.2.4 STAT6e

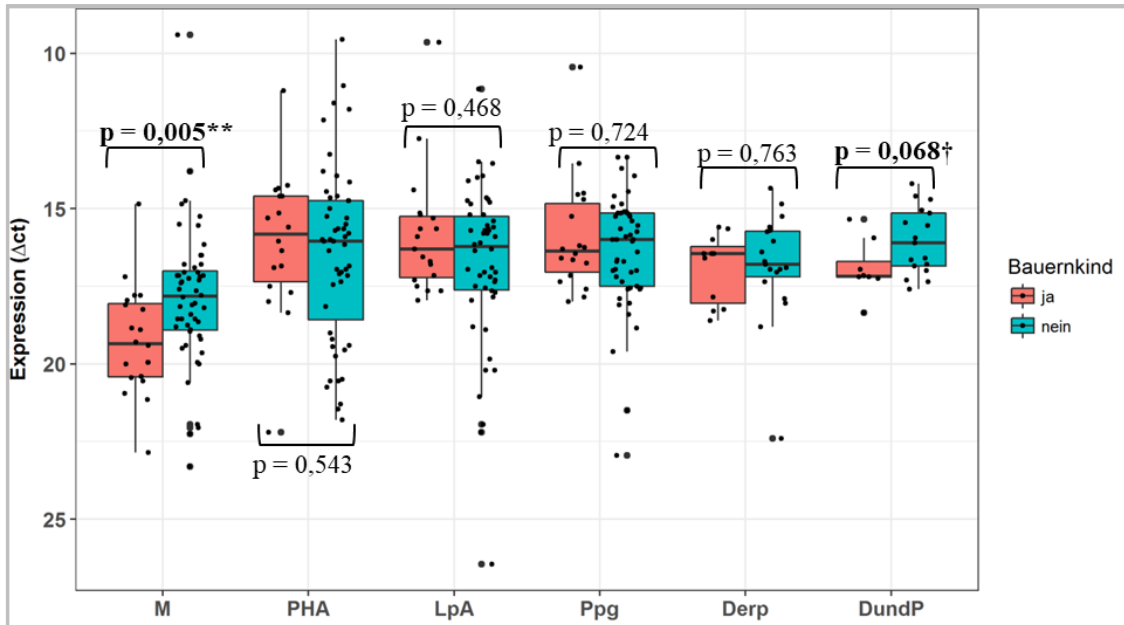


Abbildung 42: Genexpression STAT6e. † $p \leq 0,1$ (Trend), ** $p \leq 0,01$

STAT6e ist unstimuliert (signifikant) sowie nach Stimulation mit DundP (Trend) im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern niedriger exprimiert.

4.2.3 Andere Gene

4.2.3.1 IL-9

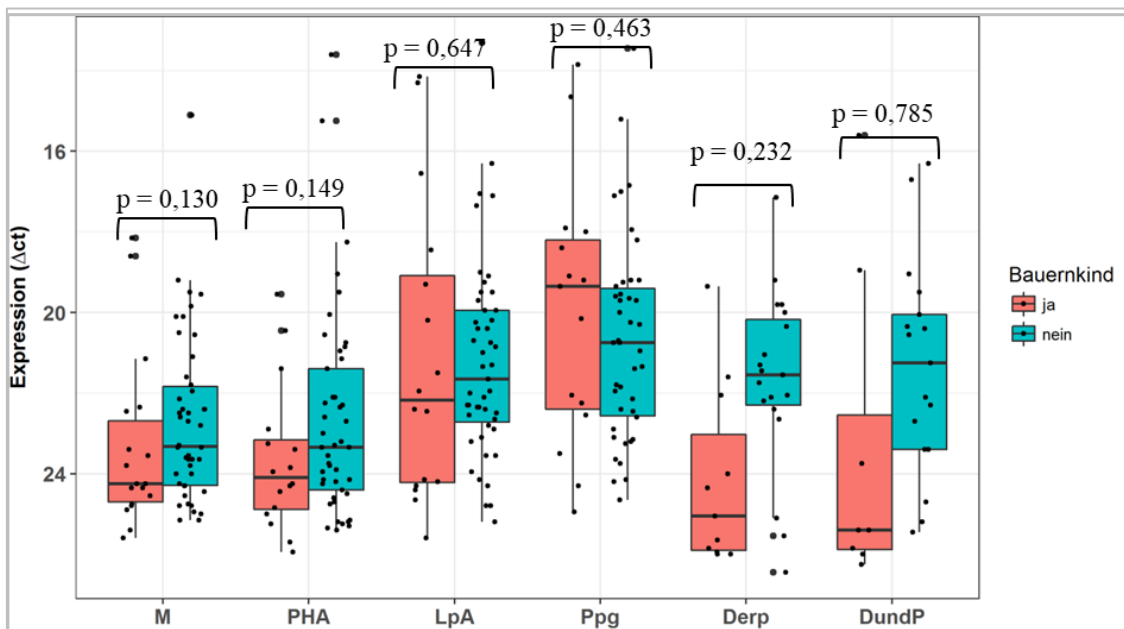


Abbildung 43: Genexpression IL-9.

In der Genexpression von IL-9 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern.

4.2.4 Zusammenfassung der Hauptergebnisse der real-time RT-PCR Daten

Gen	Stimulus	p-Wert	Koeffizient β	Expression Bauernkinder vs. Nicht-Bauernkinder
Th1				
Tbet	DundP	0,025*	1,694	↓
HLX1	M	0,083	0,713	↓
Th2				
STAT6	DundP	0,016*	2,198	↓
STAT6e	M	0,005*	1,362	↓
	DundP	0,068	0,872	↓
GATA3	DundP	0,091	0,754	↓

Tabelle 22: Zusammenfassung Hauptergebnisse real-time RT-PCR. * $p \leq 0,05$

Zusammengefasst ist die Genexpression in Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern für Th1- und Th2-assoziierte Gene tendenziell niedriger. Für die Gene Tbet und STAT6 nach Stimulation mit DundP sowie STAT6e unstimuliert ist dies signifikant, für HLX1 unstimuliert und STAT6e sowie GATA3 nach Stimulation zeigt sich ein Trend.

Nach Adjustierung der Daten für Geschlecht und die mütterlichen Faktoren Asthma, Atopie, Rauchen und Bildung sowie Berechnung des Koeffizienten β und des CIE (vgl. 3. Statistische Methoden) bleiben die Ergebnisse weiterhin signifikant.

Gen	Stimulus	p-Wert	Koeffizient β	p-Wert nach Adjustierung	Koeffizient β	CIE %
Th1				Geschlecht		
Tbet	DundP	0,025*	1,694	0,011*	1,787	5,49
HLX1	M	0,083	0,713	0,072	0,763	7,01
Th2						
STAT6	DundP	0,016*	2,198	0,016*	2,361	7,42
STAT6e	M	0,005*	1,362	0,013*	1,427	4,77
	DundP	0,068	0,872	0,068	0,874	0,23
GATA3	DundP	0,091	0,754	0,080	0,780	3,45

Tabelle 23: Adjustierung für Geschlecht des Kindes

Gen	Stimulus	p-Wert	Koeffizient β	p-Wert nach			p-Wert nach		
				Adjustierung	Koeffizient β	CIE %	Adjustierung	Koeffizient β	CIE %
Th1				mütterl. Asthma			mütterl. Atopie		
Tbet	DundP	0,025*	1,694	0,012*	1,694	0	0,036*	1,574	-7,08
HLX1	M	0,083	0,713	0,056	0,722	1,26	0,078	0,702	-1,54
Th2									
STAT6	DundP	0,016*	2,198	0,020*	2,198	0,00	0,030*	2,308	5,00
STAT6e	M	0,005*	1,362	0,019*	1,353	-0,66	0,020*	1,347	-1,10
	DundP	0,068	0,872	0,058	0,872	0,00	0,052	1,025	17,55
GATA3	DundP	0,091	0,754	0,078	0,754	0,00	0,186	0,625	-17,11

Tabelle 24: Adjustierung für mütterliche Faktoren: Asthma und Atopie

Gen	Stimulus	p-Wert	Koeffizient β	p-Wert nach			p-Wert nach		
				Adjustierung	Koeffizient β	CIE %	Adjustierung	Koeffizient β	CIE %
Th1				mütterl. Rauchen			mütterl. Bildung		
Tbet	DundP	0,025*	1,694	0,019*	1,714	1,18	0,014*	1,697	0,17
HLX1	M	0,083	0,713	0,065	0,679	-4,77	0,063	0,805	12,92
Th2									
STAT6	DundP	0,016*	2,198	0,040*	2,087	-5,05	0,028*	2,091	-4,88
STAT6e	M	0,005*	1,362	0,036*	1,254	-7,93	0,015*	1,166	-14,38
	DundP	0,068	0,872	0,102	0,808	-7,34	0,088	0,719	-17,50
GATA3	DundP	0,091	0,754	0,071	0,836	10,88	0,125	0,671	-10,95

Tabelle 25: Adjustierung für mütterliche Faktoren: Rauchen und Bildung

4.2.5 Th1-Th2 Ratio

Nachdem die Daten sowohl in Th1- als auch in Th2-assoziierten Genen eine niedrigere Expression im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern zeigen, wurde die Th1-Th2 Ratio berechnet. Als Th1-assoziierte Gene wurden Tbet, HLX1 und IRF1, als Th-2 assoziierte Gene GATA3, STAT6 und die Isoformen STAT6d und STAT6e zur Berechnung der Ratio Th1/Th2 verwendet. Hier zeigt sich in allen Stimulationsbedingungen bei Bauernkindern eine Ratio zu Gunsten der Th1-assoziierten Gene, wobei dies nur nach Stimulation mit Derp trendweise unterschiedlich ist ($p=0,057$).

Stimulus	Ratio		p-Wert
	Nicht-Bauernkinder	Ratio Bauernkinder	
M	0,950	0,945	0,845
PHA	1,050	1,082	0,135
LpA	1,013	1,025	0,235
Ppg	0,996	1,001	0,721
Derp	0,995	1,041	0,057
DundP	0,977	1,008	0,440

Tabelle 26: Th1-Th2 Ratio

Sämtliche Th1-assozierte Gene sind mit den anderen Th1-assozierten Genen positiv korreliert, ebenso gilt dies für die Korrelation Th2-assoziierter Gene mit anderen Th2-assozierten Genen.

Betrachtet man die Korrelationen der Th1-assozierten Gene mit Th2-assozierten Genen, so sind viele Gene positiv und signifikant miteinander korreliert, insbesondere IRF1, Tbet, GATA3 und STAT6 (vgl. Abb. 44 und Tab. 27).

Th1-assoziert	Th2-assoziert	Stimulus	n	Spearman Rangkorrelations- koeffizient	p-Wert
IRF1	STAT6	Derp	30	0,86	8,350E-10
Tbet	GATA3	Derp	30	0,85	1,863E-09
Tbet	GATA3	DundP	25	0,83	3,453E-07
Tbet	GATA3	Ppg	67	0,80	8,006E-16
Tbet	GATA3	LpA	69	0,79	8,047E-16
IRF1	GATA3	DundP	25	0,77	6,517E-06
Tbet	STAT6d	Derp	30	0,75	2,291E-06
Tbet	STAT6d	DundP	25	0,74	1,985E-05
HLX1	GATA3	DundP	25	0,74	2,515E-05
Tbet	STAT6	Derp	30	0,74	3,475E-06
IRF1	STAT6d	PHA	69	0,71	1,155E-11
IRF1	GATA3	Derp	30	0,70	1,536E-05
Tbet	STAT6d	Ppg	67	0,68	2,323E-10
Tbet	STAT6	DundP	25	0,68	1,996E-04
IRF1	STAT6d	Derp	30	0,68	4,124E-05
IRF1	STAT6d	DundP	25	0,67	2,260E-04
IRF1	STAT6	LpA	69	0,67	3,839E-10
HLX1	GATA3	PHA	69	0,66	7,797E-10
IRF1	STAT6d	Ppg	67	0,66	1,809E-09
Tbet	STAT6d	LpA	69	0,65	1,326E-09
Tbet	GATA3	PHA	69	0,65	1,327E-09
Tbet	STAT6e	Derp	30	0,65	1,033E-04
Tbet	GATA3	M	72	0,65	6,867E-10
IRF1	STAT6e	Derp	30	0,64	1,282E-04
HLX1	STAT6d	DundP	25	0,64	5,799E-04
HLX1	STAT6d	Ppg	67	0,64	5,796E-09
IRF1	GATA3	Ppg	67	0,64	5,931E-09
Tbet	STAT6d	M	72	0,64	1,923E-09
IRF1	STAT6d	LpA	69	0,63	5,424E-09
IRF1	GATA3	PHA	69	0,63	6,516E-09
Tbet	STAT6e	LpA	69	0,62	1,130E-08
Tbet	STAT6d	PHA	69	0,62	1,836E-08
HLX1	STAT6e	Ppg	67	0,61	4,991E-08
HLX1	STAT6d	Derp	30	0,61	3,969E-04
HLX1	STAT6	Derp	30	0,60	4,323E-04

Tabelle 27: Korrelation Th1- und Th2- assoziierter Gene in der real-time RT-PCR Population

Betrachtet man die Korrelationen der Th1-assoziierten Gene mit Th2-assoziierten Genen in Nicht-Bauernkindern, so sind weiterhin viele Gene positiv und signifikant miteinander korreliert, insbesondere Tbet, HLX1, IRF1, GATA3 und STAT6d nach Stimulation mit DundP (vgl. Abb. 45 und Tab. 28).

Th1- assoziiert	Th2- assoziiert	Stimulus	n	Spearman Rangkorrelations- koeffizient	p-Wert
Tbet	STAT6d	DundP	17	0,88	2,492E-06
HLX1	GATA3	DundP	17	0,88	3,868E-06
Tbet	GATA3	DundP	17	0,87	4,318E-06
IRF1	GATA3	DundP	17	0,85	1,763E-05
IRF1	STAT6	Derp	19	0,82	1,930E-05
Tbet	GATA3	Ppg	49	0,81	1,964E-12
Tbet	GATA3	Derp	19	0,81	3,100E-05
Tbet	GATA3	LpA	50	0,80	5,181E-12
Tbet	STAT6d	Ppg	49	0,74	1,205E-09
Tbet	STAT6	Derp	19	0,74	3,221E-04
Tbet	STAT6d	LpA	50	0,72	2,731E-09
HLX1	STAT6	Derp	19	0,72	5,510E-04
Tbet	STAT6e	LpA	50	0,72	5,222E-09
IRF1	STAT6d	PHA	51	0,71	7,203E-09
HLX1	STAT6d	Ppg	49	0,69	3,138E-08
Tbet	STAT6d	Derp	19	0,69	1,084E-03
IRF1	STAT6d	Ppg	49	0,67	1,266E-07
Tbet	STAT6d	PHA	51	0,66	1,067E-07
HLX1	STAT6d	DundP	17	0,66	4,814E-03
IRF1	GATA3	Ppg	49	0,66	2,759E-07
HLX1	GATA3	Ppg	49	0,65	3,648E-07
IRF1	STAT6	LpA	50	0,65	3,742E-07
HLX1	GATA3	PHA	51	0,64	4,968E-07
IRF1	STAT6d	DundP	17	0,63	8,687E-03
Tbet	STAT6e	PHA	51	0,62	1,150E-06
IRF1	GATA3	PHA	51	0,62	1,150E-06
HLX1	STAT6d	Derp	19	0,62	5,634E-03
HLX1	GATA3	LpA	50	0,61	2,166E-06
HLX1	STAT6e	Ppg	49	0,61	2,877E-06
Tbet	GATA3	M	52	0,61	1,553E-06
IRF1	STAT6d	Derp	19	0,61	5,557E-03
HLX1	STAT6d	LpA	50	0,60	3,421E-06
IRF1	STAT6e	Derp	19	0,60	6,754E-03
Tbet	STAT6e	Ppg	49	0,60	5,734E-06
IRF1	STAT6d	LpA	50	0,60	4,569E-06

Tabelle 28: Korrelation Th1- und Th2- assoziierter Gene in der Subpopulation der Nicht-Bauernkinder

4.3.3 Korrelationsanalysen in der Subgruppe der Bauernkinder

Im Nabelschnurblut der Bauernkinder sind die meisten Gene positiv korreliert. Vereinzelt zeigt sich auch eine negative Korrelation, beispielsweise bei Tbet und HLX1 unter Stimulation mit DundP, diese jedoch nicht signifikant.

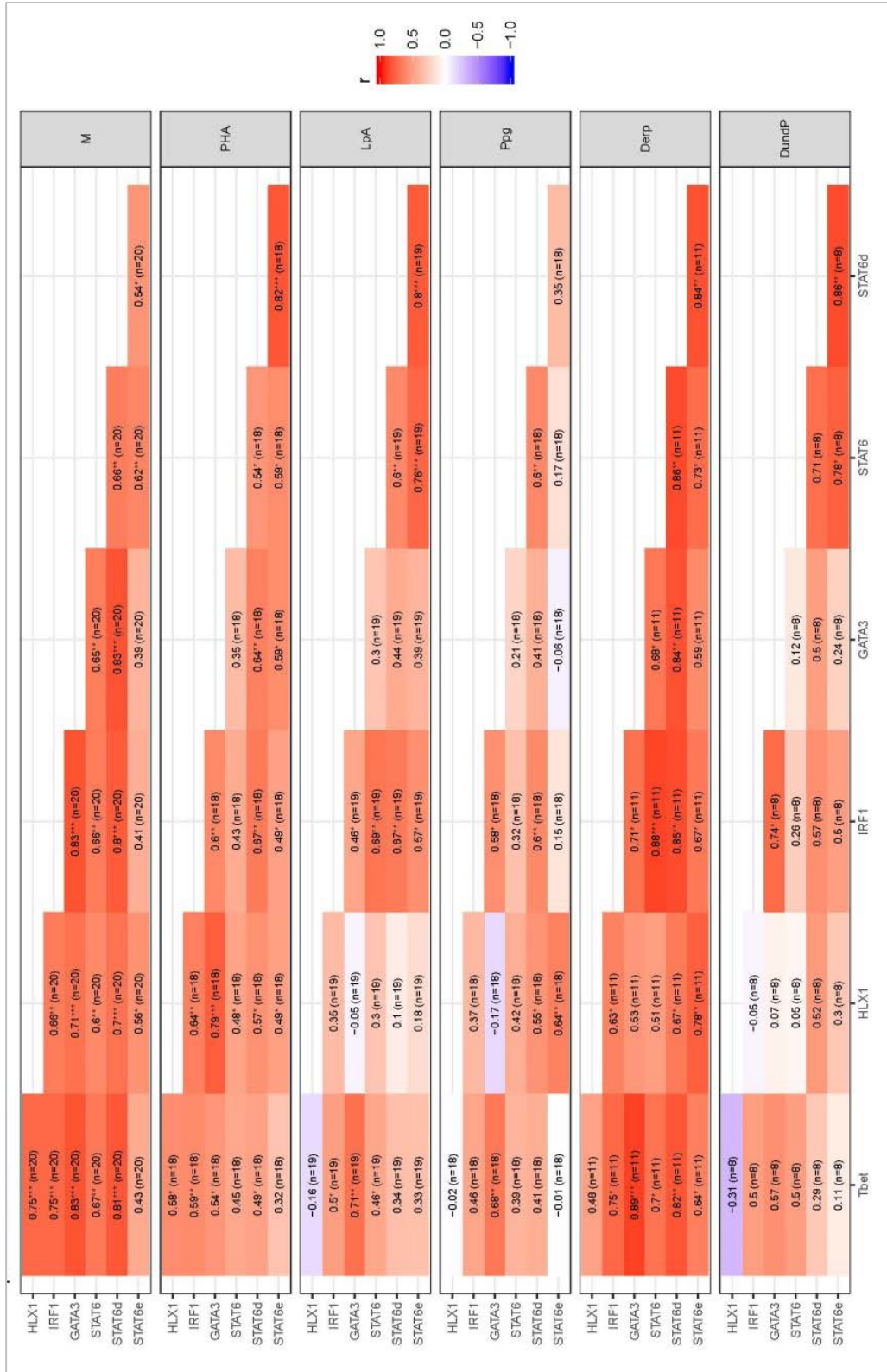


Abbildung 46: Gen-Gen-Korrelation der Bauernkinder, Spearman Rangkorrelationskoeffizient

In der Betrachtung der Korrelationen Th1- und Th2-assoziiierter Gene in Bauernkindern sind insbesondere IRF1, Tbet, GATA3, STAT6 und STAT6d unstimuliert und nach Stimulation mit Derp positiv korreliert (vgl. Abb. 46 und Tab. 29). Im Nabelschnurblut von Bauernkindern ist damit erstmalig eine positive, signifikante Korrelation auch unstimuliert zu sehen, was darauf hindeuten könnte, dass Bauernkinder die hohe Korrelation bereits ohne weitere Aktivierung des Immunsystems zeigen.

Th- assoziiert	Th2- assoziiert	Stimulus	n	Spearman Rangkorrelations- koeffizient	p-Wert
Tbet	GATA3	Derp	11	0,89	4,284E-04
IRF1	STAT6	Derp	11	0,88	6,683E-04
IRF1	STAT6d	Derp	11	0,85	1,649E-03
IRF1	GATA3	M	20	0,83	5,644E-06
Tbet	GATA3	M	20	0,83	6,949E-06
Tbet	STAT6d	Derp	11	0,82	3,734E-03
Tbet	STAT6d	M	20	0,81	1,243E-05
IRF1	STAT6d	M	20	0,80	2,424E-05
HLX1	GATA3	PHA	18	0,79	1,437E-04
HLX1	STAT6e	Derp	11	0,78	4,406E-03
IRF1	GATA3	Derp	11	0,71	1,873E-02
HLX1	GATA3	M	20	0,71	4,712E-04
Tbet	GATA3	LpA	19	0,71	1,006E-03
HLX1	STAT6d	M	20	0,70	5,558E-04
Tbet	STAT6	Derp	11	0,70	2,081E-02
IRF1	STAT6	LpA	19	0,69	1,061E-03
Tbet	STAT6	M	20	0,67	1,102E-03
IRF1	STAT6e	Derp	11	0,67	2,288E-02
IRF1	STAT6d	LpA	19	0,67	1,780E-03
IRF1	STAT6d	PHA	18	0,67	2,480E-03
HLX1	STAT6d	Derp	11	0,67	2,507E-02
IRF1	STAT6	M	20	0,66	1,546E-03
Tbet	STAT6e	Derp	11	0,64	3,306E-02
HLX1	STAT6e	Ppg	18	0,64	5,123E-03
IRF1	GATA3	PHA	18	0,60	8,212E-03
HLX1	STAT6	M	20	0,60	4,982E-03
IRF1	STAT6d	Ppg	18	0,60	8,961E-03

Tabelle 29: Korrelation Th1- und Th2- assoziierter Gene in der Subpopulation der Bauernkinder

4.4 Zytokin-Sekretion

Die Zytokine IL-5, IL-6 und IL-12 wurden im Rahmen der Gesamtstudie bei einer Subgruppe untersucht.

Zytokin	Stimulus	N (gesamt)	N (Nicht-Bauernkind)	N (Bauernkind)	Median \pm IQR	p-Wert	Sekretion Bauernkind
IL-5	DundP	33	23	10	4,91 (4,49/5,36)	0,031*	↓
IL-6	DundP	34	24	10	15,54 (15,11/15,94)	0,021*	↑
IL-12	Derp	9	7	2	0,92 (0,51/1,32)	0,055	↑

Tabelle 30: Zytokin-Sekretion

IL-5 wird im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern nach Stimulation mit DundP signifikant weniger sezerniert, IL-6 wird nach Stimulation mit DundP signifikant vermehrt sezerniert. Auch nach isolierter Derp-Stimulation zeigt sich eine Trend für eine vermehrte Sekretion von IL-6 im Nabelschnurblut von Bauernkindern ($p=0,064$). Nach Ppg-Stimulation ist kein signifikanter Unterschied zu sehen. IL-12 wird nach Stimulation mit Derp ebenfalls im Nabelschnurblut von Bauernkindern vermehrt sezerniert (Trend, $p=0,055$). Allerdings sind hier die Gruppengrößen sehr klein und eine weitere Interpretation muss mit Vorsicht erfolgen. Unter den weiteren Stimulationsbedingungen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zytokin-Sekretion.

4.5 Verlaufsbeobachtung der Studienpopulation

Veränderungen in der Fallzahl im Vergleich zum Studieneinschluss basieren auf einzelnen *missing data* aufgrund nicht zurückgesandter Fragebögen. Insgesamt nahmen 87 ursprünglich 91 Familien an der Verlaufsbeobachtung über zehn Jahre teil, dies entspricht einer *follow-up Rate* von 96 %. In der real-time RT-PCR Subpopulation nahmen 97 % an der Verlaufsbeobachtung teil.

4.5.1 Bauernhof-Exposition

Als Bauernkinder wurden die Kinder definiert, deren Mutter in den letzten 1-5 Jahren und während der Schwangerschaft auf einem Bauernhof lebt und arbeitet. Außerdem wurden Rohmilchkonsum und Stallexposition bis zum 10. Lebensjahr erfasst.

Die allergische Sensibilisierung wurde definiert als positiver Haut- und/oder Bluttest auf inhalative Allergene (Baum- und Gräserpollen, Hausstaubmilben, Tierhaare) im zehnten Lebensjahr, der durch die Eltern im Fragebogen berichtet wurde (vgl. 2.2. Epidemiologische Datenerhebung).

In der PAULCHEN-Studienpopulation sind signifikant weniger Bauernkinder unter den Kindern mit allergischer Sensibilisierung. Außerdem sind signifikant weniger Kinder allergisch sensibilisiert, die sich mindestens einmal pro Woche im Stall aufhalten.

Variable		keine allergische Sensibilisierung (N = 71)	allergische Sensibilisierung (N = 16)	p-Wert
Bauernkind				0,028*
	nein	47 (66 %)	15 (94 %)	
	ja	24 (34 %)	1 (6 %)	
Rohmilch				0,270
	nein	53 (75 %)	14 (88 %)	
	ja	18 (25 %)	2 (12 %)	
Stall				0,041*
	nein	43 (61 %)	14 (88 %)	
	ja	28 (39 %)	2 (12 %)	

Tabelle 31: PAULCHEN-Studienpopulation: Bauernhof-Exposition.

Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung. * $p \leq 0,05$

In der real-time RT-PCR Subpopulation zeigt sich der Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer allergischen Sensibilisierung und der Bauernhofexposition lediglich noch als Trend ($p=0,088$).

Variable		keine allergische Sensibilisierung (N = 58)	allergische Sensibilisierung (N = 12)	p-Wert
Bauernkind				0,088
	nein	39 (67 %)	11 (92 %)	
	ja	19 (33 %)	1 (8 %)	
Rohmilch				0,267
	nein	45 (78 %)	11 (92 %)	
	ja	13 (22 %)	1 (8 %)	
Stall				0,130
	nein	35 (60 %)	10 (83 %)	
	ja	23 (40 %)	2 (17 %)	

Tabelle 32: Real-time RT-PCR Untergruppe: Bauernhof-Exposition.

Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung. * $p \leq 0,05$

4.5.2 Familienanamnese

Die positive Familienanamnese für Asthma bronchiale wurde im ersten Fragebogen bei Geburt dokumentiert als positive Anamnese für Asthma bronchiale bei mindestens einem Elternteil.

In der Verlaufsbeobachtung im Alter von drei, sechs und zehn Jahren zeigt sich in der PAULCHEN-Gesamtpopulation ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer allergischen Sensibilisierung auf Inhalationsallergie bei den beobachteten Kindern und einer positiven Familienanamnese für allergische Erkrankungen.

Variable		keine allergische Sensibilisierung (N = 71)	allergische Sensibilisierung (N = 16)	p-Wert
Familienanamnese	mütterliche Atopie			0,052
		nein	53 (74%)	6 (50%)
		ja	18 (26 %)	6 (50%)
	mütterliches Asthma			0,081
		nein	67 (94%)	13 (81%)
		ja	4 (6%)	3 (19%)
	väterliche Atopie			0,127
		nein	57 (80%)	10 (62%)
		ja	14 (20%)	6 (38%)
	väterliches Asthma			0,095
		nein	69 (97%)	14 (88%)
		ja	2 (3%)	2 (12%)
	positive Familienanamnese Asthma			0,006*
		nein	66 (93%)	11 (69%)
	ja	5 (7%)	5 (31%)	

Tabelle 33: PAULCHEN-Studienpopulation: Familienanamnese.

Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung. * $p \leq 0,05$

In der Subpopulation, in der die real-time RT-PCR durchgeführt wurde, ist der Zusammenhang zwischen allergischer Sensibilisierung bei den beobachteten Kindern und positiver Familienanamnese für allergische Erkrankung als Trend zu sehen ($p=0,057$), es besteht keine statistische Signifikanz mehr.

Variable		keine allergische Sensibilisierung (N = 58)	allergische Sensibilisierung (N = 12)	p-Wert
Familienanamnese	mütterliche Atopie			0,097
		nein	43 (74%)	6 (50%)
		ja	15 (26%)	6 (50%)
	mütterliches Asthma			0,271
		nein	54 (93%)	10 (83%)
		ja	4 (7%)	2 (17%)
	väterliche Atopie			0,088
		nein	47 (81%)	7 (58%)
		ja	11 (19%)	5 (42%)
	väterliches Asthma			0,211
		nein	57 (98%)	11 (92%)
		ja	1 (2%)	1 (8%)
	positive Familienanamnese Asthma			0,057
		nein	54 (93%)	9 (75%)
	ja	4 (7%)	3 (25%)	

Tabelle 34: Real-time RT-PCR Untergruppe: Familienanamnese.

Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung. * $p \leq 0,05$

4.5.3 Entwicklung pfeifender Atemgeräusche (*wheeze*)

In der PAULCHEN-Gesamtpopulation besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und dem Auftreten pfeifender Atemgeräusche. Außerdem zeigen allergisch sensibilisierte Kinder vermehrt Atemgeräusche, die durch mindestens zwei unterschiedliche Trigger wie Kälte, Anstrengung, Hausstaub, Tierkontakt und Pollen verursacht werden (*multitrigger wheeze*). Auch im zeitlichen Auftreten der pfeifenden Atemgeräusche sind signifikante Unterschiede zu erkennen: Die allergisch sensibilisierten Kinder zeigen durchgehend Symptome (*persistent wheeze*) oder entwickeln eher spät pfeifende Atemgeräusche (*late onset wheeze*).

Variable		keine allergische Sensibilisierung (N = 71)	allergische Sensibilisierung (N = 16)	p-Wert
<i>any wheeze</i>				0,003*
	nein	48 (67%)	4 (25%)	
	ja	23 (33%)	12 (75%)	
<i>wheeze Typ</i>				< 0,001*
	viral	21 (30%)	4 (25%)	
	multitrigger	2 (3%)	8 (50%)	
	gesund	48 (67%)	4 (25%)	
<i>wheeze Verlauf</i>				< 0,001*
	early	13 (18%)	2 (13%)	
	persistent	4 (6%)	5 (31%)	
	late onset	4 (6%)	5 (31%)	
	gesund	50 (70%)	4 (25%)	

Tabelle 35: PAULCHEN-Studienpopulation: Entwicklung pfeifender Atemgeräusche.

Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung. * $p \leq 0,05$

In der real-time RT-PCR Subpopulation zeigt sich ein im Vergleich zur Gesamtpopulation ähnlicher Verlauf. Auch hier besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und dem Auftreten pfeifender Atemgeräusche. Außerdem zeigen allergisch sensibilisierte Kinder vermehrt *multitrigger wheeze* und zeigen durchgehend Symptome (*persistent wheeze*) oder entwickeln eher spät pfeifende Atemgeräusche (*late onset wheeze*).

Variable		keine allergische Sensibilisierung (N = 58)	allergische Sensibilisierung (N = 12)	p-Wert
<i>any wheeze</i>				0,002*
	nein	38 (65%)	2 (17%)	
	ja	20 (35%)	10 (83%)	
<i>wheeze Typ</i>				< 0,001*
	viral	19 (32%)	3 (25%)	
	multitrigger	2 (4%)	7 (58%)	
	gesund	37 (64%)	2 (17%)	
<i>wheeze Verlauf</i>				< 0,001*
	early	10 (18%)	1 (8%)	
	persistent	5 (7%)	5 (42%)	
	late onset	5 (7%)	4 (33%)	
	gesund	38 (68%)	2 (17%)	

Tabelle 36: Real-time RT-PCR Untergruppe: Entwicklung pfeifender Atemgeräusche.

Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung. * $p \leq 0,05$

Bei stratifizierter Analyse von Nicht-Bauernkindern und Bauernkindern zeigt sich eine Tendenz zu einer geringeren Prävalenz von *multitrigger wheeze* bei Bauernkindern, jedoch ist dies weder in der Gesamtpopulation noch bei den Kindern, bei denen die real-time RT-PCR durchgeführt wurde, signifikant (Gesamtpopulation $p=0,762$, real-time RT-PCR Untergruppe $p=0,817$).

5 DISKUSSION

Hintergrund dieser Dissertation ist die Hypothese, dass Bauernkinder bereits durch die präpartale Bauernhofexposition als Modell für eine exogene mikrobielle Stimulation ihres Immunsystems seltener eine allergische Sensibilisierung entwickeln als Nicht-Bauernkinder.

Das Hauptziel dieser Dissertation ist es, eine unterschiedliche Gensignatur von Th1- und Th2-assoziierten Genen bei Geburt zu identifizieren. Hierfür wurde im Nabelschnurblut von Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern der PAULCHEN-Geburtskohorte die Genexpression Th1- und Th2-assoziiierter Gene sowie die Sekretion Th1- und Th2-assoziiierter Zytokine zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Immunmaturation untersucht. Anhand von Fragebögen im Alter von drei, sechs und zehn Jahren wurde die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und pfeifender Atemgeräusche erfasst. Zudem wurde eine Vielzahl epidemiologischer Daten wie die mikrobielle Exposition sowie sozioökonomische Faktoren und die Familienanamnese erhoben.

Die Beantwortung der Frage, ob bereits die Immunregulation im Nabelschnurblut zur Prädiktion der späteren Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung geeignet ist, würde vor dem Hintergrund der Bauernhofexposition als Modell einer „allergieprotektiven“ Umgebung zum weiteren Verständnis des komplexen Netzwerkes immunologischer, genetischer und epigenetischer Faktoren beitragen, das dem Bauernhofeffekt zu Grunde liegt.

5.1 Epidemiologie bei Geburt

Im letzten Trimenon der Schwangerschaft wurden 91 Frauen in die PAULCHEN-Studie eingeschlossen. Das Studiendesign sah eine Gruppe von Nicht-Bauernkindern ($n = 66$) und eine Gruppe von Bauernkindern ($n = 25$) vor. Bezüglich der Studiencharakteristika sind signifikante Unterschiede bei Müttern von Bauern- und Nicht-Bauernkindern zu sehen: Eine größere Anzahl an Müttern von Nicht-Bauernkindern hat während der Schwangerschaft geraucht. Außerdem haben Mütter von Nicht-Bauernkindern einen höheren Bildungsstatus. Vergleicht man diese Beobachtungen mit anderen Studien, so sind dort ebenfalls Unterschiede hinsichtlich des Rauchens während der Schwangerschaft und des Bildungsstatus zu sehen (Alfven et al., 2006). Alfven et al. beschreiben allerdings eine höhere Anzahl an Abiturienten unter den Eltern der Bauernhofkinder, einen Hochschulabschluss haben jedoch mehr Eltern von Nichtbauernkindern.

Was atopische Erkrankungen in der Familie, Entbindungsmodus, Geburtsmaße und Geschwisteranzahl angeht, zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Analog zu Vordaten der Bauernhofstudien aus Deutschland, Österreich und der Schweiz sowie anderer Arbeitsgruppen (Riedler et al., 2001, Alfven et al., 2006, von Mutius and Schmid, 2006, Ege et al., 2008), gaben auch in der PAULCHEN-Geburtskohorte die Eltern von Nicht-Bauernkindern häufiger atopische Erkrankungen in der Anamnese an.

In die real-time RT-PCR Subgruppe wurden 72 Probanden eingeschlossen, davon 52 Nicht-Bauernkinder und 20 Bauernkinder. Die in der Gesamtpopulation beschriebenen Unterschiede in Bezug auf mütterliches Rauchen und Bildungsstatus sind in der Subpopulation noch als Trend zu sehen.

5.2 Erniedrigte Genexpression zentraler Th1- und Th2-assoziierter Transkriptionsfaktoren im Nabelschnurblut von Bauernkindern

Im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern zeigte sich eine signifikant niedrigere Genexpression von Tbet und STAT6 als zentralen Th1- und Th2-Transkriptionsfaktoren nach Stimulation mit DundP, einer Kombination aus der Hausstaubmilbe Derp1 und Peptidoglykan. Auch die STAT6 Isoform STAT6e war im Nabelschnurblut von Bauernkindern signifikant niedriger exprimiert. Parallel dazu waren weitere Th1- und Th2-assozierte Gene wie HLX1 unstimuliert oder GATA3 und STAT6e jeweils nach Stimulation mit DundP niedriger exprimiert, dies jedoch nicht signifikant.

Die Ergebnisse wurden für mögliche Confounder adjustiert, die Einfluss auf die Genexpression im Nabelschnurblut von Bauern- und Nicht-Bauernkindern haben könnten (Geschlecht des Kindes und die mütterlichen Faktoren Asthma, Atopie, Rauchen und Bildung). Diese Adjustierung erfolgte mit dem Ziel, sicherzustellen, dass die Unterschiede in der Genexpression tatsächlich auf den Bauernhofeffekt zurückzuführen sind. Die signifikanten Ergebnisse bleiben auch nach Adjustierung erhalten.

5.2.1 Th1-assozierte Gene: Tbet, HLX1, IRF1

Als Th1-assozierte Gene wurden Tbet, HLX1 und IRF1 als zentrale Th1-assozierte Transkriptionsfaktoren untersucht. Für Tbet sehen wir nach Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch DundP eine signifikant niedrigere Expression im Nabelschnurblut von Bauernkindern gegenüber Nicht-Bauernkindern. Die Genexpression von Tbet ist in allen Stimulationsbedingungen im Nabelschnurblut von Bauernkindern tendenziell niedriger. Tbet spielt als Induktor der Th1-Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle (Szabo et al., 2015) und gilt als typisches Kandidaten-Gen für atopische Erkrankungen (Suttner et al., 2009). Für HLX1 und IRF1 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

5.2.2 Th2-assozierte Gene: GATA3, STAT6, STAT6d, STAT6e

Als zentrale Transkriptionsfaktoren der Th2-Zellen wurde die mRNA-Expression von GATA3 und STAT6 untersucht. Zusätzlich wurden die Isoformen STAT6d und STAT6e analysiert. Diese Isoformen wurden bereits im Rahmen der PARSIFAL-Studie beschrieben: Bei Vorliegen des Polymorphismus SNP rs324011 erhöhte sich die mRNA Expression insbesondere in den Isoformen STAT6d und STAT6e. Ein potentieller Einfluss der beiden Splice-Varianten auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen wird vermutet (Schedel et al., 2009).

Die Expression von STAT6 nach Stimulation mit DundP und STAT6e (unstimuliert) ist im Nabelschnurblut von Bauernkindern signifikant niedriger als im Nabelschnurblut von Nicht-Bauernkindern. Für GATA3 und STAT6d sehen wir keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression.

STAT6 ist ein wichtiger Regulator bei der Th2-Zelldifferenzierung (Elo et al., 2010) und spielt eine Schlüsselrolle beim IgE-Klassenwechsel (Kaplan et al., 1999). Die signifikant niedrigere Expression des zentralen Th2-Regulators STAT6 im Nabelschnurblut von Bauernkindern könnte bereits auf eine pränatale Suppression der Th2-

Immunregulation hindeuten. Allerdings ist parallel zu dieser Beobachtung auch die Expression Th1-assoziiierter Gene wie beispielsweise Tbet reduziert. Insofern ist eher von einer allgemeinen Suppression sowohl Th1- als auch Th2-assoziiierter Gene auszugehen. Auch Braun-Fahrländer et al. haben eine allgemeine Suppression der Immunantwort bei Schulkindern nach Endotoxin-Exposition beschrieben (Braun-Fahrländer et al., 2002). Im Rahmen der PAULCHEN-Geburtskohorte sehen wir diese Suppression nach exogener Stimulation des Immunsystems nun bereits im Nabelschnurblut, was für eine Modifikation des Immunsystems bereits zum frühest möglichen Zeitpunkt spricht.

5.2.3 IL9

IL-9 nimmt eine Sonderrolle in der Auswahl der untersuchten Gene ein, da es nicht klar einer T-Zell Untergruppe zugeordnet werden kann, sondern Einfluss auf eine Vielzahl von Untergruppen der T-Helferzellen hat und damit auch an verschiedensten Effekten der T-Helferzellen beteiligt ist (Li and Rostami, 2010). Die biologische Funktion von IL-9 ist noch nicht final geklärt. Neben einer Assoziation mit der Th2-assoziierten, „pro-allergischen“ Immunantwort (Hauber et al., 2004) hat IL-9 eine Mediatorfunktion bei Th17-medierten entzündlichen Erkrankungen (Nowak et al., 2009). Es induziert die Differenzierung der Th17-Zellen, die insbesondere bei Gewebsentzündungen und Autoimmunreaktionen eine wichtige Rolle spielen, und verstärkt aber auch die Aktivität der regulatorischen T-Zellen (Elyaman et al., 2009). Die Genexpression von IL-9 im Nabelschnurblut von Bauernkindern ist niedrig, so dass eine Detektion mittels real-time RT-PCR im Rahmen dieser Dissertation schwierig war. Es zeigen sich keine signifikanten Ergebnisse. Unstimuliert und nach Stimulation des erworbenen Immunsystems durch PHA und Derp sowie nach Stimulation mit DundP ist die IL-9 Expression im Nabelschnurblut von Bauernkindern niedriger, was dem Konzept der generell erniedrigten Immunantwort im Nabelschnurblut von Bauernkindern entspricht. Nach Stimulation des angeborenen Immunsystems durch LpA und Ppg wird IL-9 allerdings im Nabelschnurblut von Bauernkindern höher exprimiert im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern. Ob diese Unterschiede nun durch die heterogenen Effekte von IL-9 auf die verschiedenen T-Zell Subpopulationen oder durch die generell niedrige Expression von IL-9 im Nabelschnurblut zum Tragen kommt und damit zu inkonsistenten Ergebnissen führt, bleibt offen. Eine weitere Bestätigung der Beobachtungen ist aufgrund der niedrigen Expressionsrate sicherlich notwendig.

5.2.4 Fazit real-time RT-PCR

Im Nabelschnurblut von Bauernkindern ist die Genexpression sowohl Th1- als auch Th2-assoziiierter Gene niedriger als bei Nicht-Bauernkindern. Dies spricht für eine generelle Suppression der Immunantwort bereits bei Geburt. Möglicherweise entwickeln die Bauernkinder bereits pränatal aufgrund einer exogenen Stimulation durch die Bauernhofumgebung während der Schwangerschaft eine Veränderung der Immunregulation, die zu einer Reduktion von sowohl Th1- als auch Th2-Zellen führt. Yu et al. beschreiben ebenfalls eine insgesamt schwächere Immunantwort im Nabelschnurblut von Bauernkindern, was unter anderem auf die andauernde mikrobielle Stimulation während der Schwangerschaft zurückgeführt wird (Yu et al., 2018).

Betrachtet man die Korrelation der Genexpression in unserer Studie, so ist in der real-time RT-PCR Population die Expression aller untersuchten Gene hoch positiv korreliert, insbesondere nach Stimulation. Dieser Effekt bleibt in der Subgruppe der Nicht-Bauernkinder bestehen. Im Nabelschnurblut von Bauernkindern ist erstmalig eine positive, signifikante Korrelation auch unstimuliert zu sehen. Dies könnte darauf hindeuten, dass Bauernkinder die hohe Korrelation bereits ohne weitere Aktivierung des Immunsystems zeigen. Es ist festzuhalten, dass in der Gruppe der Nicht-Bauernkinder als potentielle Risikogruppe für die Entstehung allergischer Erkrankungen eine höhere Korrelation der Expression Th1- und Th2-assoziiierter Gene besteht als in der Gruppe der Bauernkinder, die bezogen auf das Allergierisiko der Niedrigrisikogruppe angehören. Die positive Korrelation von sowohl Th1- als auch Th2-assoziierten Genen bei Nicht-Bauernkindern kann auf eine parallele Aktivierung hindeuten, die möglicherweise während der Immunreifung zu einem höheren Risiko für allergische Erkrankungen beiträgt. Es kann jedoch auch bereits eine sekundär induzierte Aktivierung einer Zellreihe nach Aktivierung der ersten erfolgt sein, die bereits bei Geburt sichtbar wird. Dies ist bei Bauernkindern in dem Ausmaß nicht detektierbar.

Bedenkt man nun, dass Bauernkinder sowohl Th1- als auch Th2-assoziiert eine niedrigere Genexpression zeigen als Nicht-Bauernkinder, so stellt sich doch die Frage, ob bei dieser generell schwächeren Immunantwort bereits im Nabelschnurblut die Th1- oder die Th2- Zellen überwiegen. Bei der Berechnung der Th1-Th2 Ratio zeigen sich keine signifikanten Ergebnisse. Tendenziell besteht eine Ratio zu Gunsten der Th1-assoziierten Gene, wobei dies nur nach Stimulation mit Derp trendweise zu sehen ist. Dies muss sicherlich in weiteren Studien untersucht werden. In Anlehnung an das Th1/Th2 Paradigma (Mosmann and Coffman, 1989) spräche eine Ratio zu Gunsten der Th1-assoziierten Gene für eine bereits pränatal Th1-gewichtete, „allergie-protective“ Ausrichtung des Immunsystems. Eine ähnliche Beobachtung teilen Yu et al., die ebenfalls ein Überwiegen der Th1-Antwort im Nabelschnurblut von Bauernkindern beschreiben (Yu et al., 2018).

5.3 „Allergie-protective“ Prägung des Immunsystems anhand der Zytokin-Sekretion im Nabelschnurblut

In einer Subgruppe der real-time RT-PCR Population wurde mittels Luminex™-Technologie die Sekretion von IL-5, IL-6 und IL-12 untersucht.

5.3.1 Interleukin-5

IL-5 wird im Nabelschnurblut von Bauernkindern nach Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch DundP im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern signifikant weniger sezerniert. Da IL-5 unter anderem von Th2-Zellen produziert wird und eine wichtige Rolle bei der eosinophilen Inflamationsreaktion in den Atemwegen von Patienten mit Asthma bronchiale spielt (Lemanske and Busse, 2010), könnte eine verminderte Sekretion im Nabelschnurblut von Bauernkindern zum Konzept der „allergie-protectiven“ Ausrichtung des Immunsystems nach pränataler Bauernhofexposition passen.

In der aktuellen Literatur wird IL-5 auch als Ziel einer Antikörpertherapie bei therapieresistentem Asthma bronchiale diskutiert (Wu et al., 2019) und steht damit im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen anhaltend im Fokus des Interesses. Bei Erwachsenen ist Anti-IL-5 in Form des Antikörpers Mepolizumab bei schwerem, therapieresistentem eosinophilem Asthma bronchiale bereits etabliert (Halder et al., 2009) und auch bei Kindern ist dieser Antikörper seit 2018 ab dem 6. Lebensjahr zur Behandlung des therapieresistenten Asthma bronchiale zugelassen (Just et al., 2019).

5.3.2 Interleukin-6

Die Sekretion von IL-6 ist im Nabelschnurblut von Bauernkindern nach Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch DundP im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern signifikant erhöht, nach Stimulation mit Derp ist ein Trend für eine erhöhte Sekretion zu sehen. Bei allen anderen Stimulationsbedingungen ist die Sekretion von IL-6 nicht signifikant unterschiedlich. IL-6 ist insbesondere als endogenes Pyrogen bekannt, die Schwere eines Infekts korreliert mit seiner systemischen Konzentration. Aber auch bei Patienten mit Asthma bronchiale werden erhöhte IL-6 Spiegel sowohl im Serum (Yokoyama et al., 1995) als auch in der bronchoalveolären Lavage (Tillie-Leblond et al., 1999) beschrieben. IL-6 hat eine Schlüsselrolle als Mediator der pulmonalen Immunantwort, der Nachweis von IL-6 im Lungenepithel asthmatischer Patienten gilt nicht als Ergebnis einer Entzündungsreaktion, sondern vielmehr als Zeichen einer Aktivierung der Lungenepithelzellen (Rincon and Irvin, 2012).

Insofern ist es auffällig, dass die Sekretion von IL-6 im Nabelschnurblut von Bauernkindern erhöht ist. IL-6 stellt kein „typisches“ Zytokin in der Kaskade einer allergischen Reaktion dar, sondern geht vielmehr mit zahlreichen Komorbiditäten wie beispielsweise Infektionen einher. Eine Infektion der Mutter oder eine perinatale Infektion des Neugeborenen stellen allerdings Ausschlusskriterien der PAULCHEN-Studie dar. Barug et al. untersuchten die Rolle von IL-6 im Nabelschnurblut. Es zeigten sich bei 93 gesunden Neugeborenen erhöhte IL-6 Spiegel im Nabelschnurblut nach vaginaler Entbindung im Vergleich zu einer Entbindung per Sectio, eine perinatale Infektion wurde durch eine Verlaufsbeobachtung über 72 h ausgeschlossen (Barug et al., 2014). Möglicherweise könnte also auch der Entbindungsmodus Einfluss auf die IL-6 Messungen im Nabelschnurblut haben. Für den Entbindungsmodus der Neugeborenen der PAULCHEN-Studie zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Kinder wurden überwiegend vaginal entbunden, allerdings war die vaginale Entbindung in der Gruppe der Nicht-Bauernkinder tendenziell häufiger als in der Gruppe der Bauernkinder.

Letztlich bleibt unklar, warum die Sekretion von IL-6 im Nabelschnurblut von Bauernkindern nach Stimulation mit DundP signifikant und nach Stimulation mit Derp tendenziell erhöht ist. Einschränkend ist anzumerken, dass in allen weiteren Stimulationsbedingungen kein signifikanter Unterschied zu sehen ist und die Fallzahl 34 Kinder (24 Nicht-Bauernkinder und 10 Bauernkinder) umfasst. Da IL-6 zahlreiche Funktionen unter anderem in Inflammationsreaktionen übernimmt, können verschiedenste Gründe zu dieser Beobachtung der PAULCHEN-Studie führen. Letztlich gilt es, dies in größeren Kohorten zu überprüfen.

5.3.3 Interleukin-12

Die Sekretion von IL-12 ist im Nabelschnurblut von Bauernkindern nach Stimulation des erworbenen Immunsystems durch Derp im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern erhöht ($p=0,055$, Trend). IL-12 gilt als ein Regulator der Th1-Zell-Differenzierung und hemmt indirekt die IgE-Synthese (Yoshimoto et al., 1997). Es wirkt also damit der Genese allergischer Erkrankungen entgegen. Auch im Rahmen der PASTURE-Studie wurde bereits berichtet, dass Bauernhofexposition während der Schwangerschaft gemeinsam mit Tierkontakt und Verzehr von selbst hergestellten Milchprodukten zu einem veränderten Muster der Zytokinsekretion in Richtung Th1-assoziiierter Zytokine führt (Pfefferle et al., 2010). Die Beobachtungen im Rahmen der PAULCHEN-Studie bestätigen dies.

5.3.4 Fazit Zytokin-Sekretion

Zusammengefasst kann die signifikant verminderte Sekretion von IL-5 und die trendweise vermehrte Sekretion von IL-12 im Nabelschnurblut von Bauernkindern auf eine „allergie-protektive“ Prägung des Immunsystems nach pränataler Bauernhofexposition hindeuten.

Die vermehrte Sekretion von IL-6 ist auffällig, allerdings ist die Sekretion auch abhängig von einer Vielzahl an Faktoren, wie beispielsweise dem Entbindungsmodus. Die Beobachtung der vermehrten IL-6 Sekretion gilt es in einer größeren Kohorte zu überprüfen.

In Zusammenschau der Daten von Genexpression und Zytokinsekretion ist neben der Suppression der Th1- und Th2-assoziierten Gene Tbet und STAT6 bei Bauernkindern bereits bei Geburt eine Zytokinsekretion zu beobachten, die eher auf eine Th1-verschobene Proteinsekretion hindeutet. Dies könnte bereits eine erste Modulation hin zu einer „allergie-protektiven“ Immunregulation darstellen.

5.4 Verlaufsbeobachtung über zehn Jahre

5.4.1 Bauernhofexposition und Reduktion der allergischen Sensibilisierung

Die an der PAULCHEN-Studie teilnehmenden Familien wurden drei, sechs und zehn Jahre nach Studieneinschluss um Beantwortung von Fragebögen zur Gesundheit des Kindes, Familienanamnese und Leben auf dem Bauernhof gebeten. Veränderungen in der Fallzahl im Vergleich zum Studieneinschluss basieren auf einzelnen *missing data* aufgrund nicht zurückgesandter Fragebögen. Insgesamt nahmen 87 der ursprünglich 91 Familien an der Verlaufsbeobachtung über zehn Jahre teil, dies entspricht einer sehr guten *follow-up* Rate von 96 %. In der Subpopulation der Kinder mit real-time RT-PCR Daten nahmen 97 % an der Verlaufsbeobachtung teil.

In der Gesamtpopulation sehen wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer allergischen Sensibilisierung auf inhalative Allergene (Baum- und Gräserpollen, Hausstaubmilben, Tierhaare) in Form eines positiven Blut- und/oder Hauttestes bei den beobachteten Kindern und einer positiven Familienanamnese für Asthma bronchiale. In der Subpopulation, in der die real-time RT-PCR durchgeführt wurde, ist der Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung bei den beobachteten

Kindern und der positiven Familienanamnese für allergische Erkrankungen noch als Trend zu sehen. Der Zusammenhang zwischen einer positiven Familienanamnese und der späteren Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung wurde bereits in zahlreichen Studien berichtet, unter anderem in der MAS-Studie, einer großen Geburtskohorte, in der 1.314 Kinder bis zum Alter von 20 Jahren beobachtet wurden (Lau et al., 2019).

Vor dem Hintergrund der Bauernhofexposition als Modell einer „allergie-protektiven“ Umgebung (Bloomfield et al., 2006) zeigt sich, dass in der PAULCHEN-Gesamtpopulation Bauernkinder signifikant seltener eine allergische Sensibilisierung auf Inhalationsallergene entwickeln als Nicht-Bauernkinder. In der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten real-time RT-PCR Subpopulation ist der beschriebene Zusammenhang zwischen Bauernkindern und einer selteneren allergischen Sensibilisierung noch als Trend zu sehen.

In einer Vielzahl von Studien wurde für Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, eine niedrigere Prävalenz für eine Sensibilisierung auf Inhalationsallergene beschrieben (Von Ehrenstein et al., 2000, Riedler et al., 2001). Bereits die präpartale Bauernhofexposition durch die Mutter während der Schwangerschaft führt dazu, dass die Kinder im Verlauf seltener allergische Erkrankungen entwickeln (Douwes et al., 2008). Spricht man vom Bauernhofeffekt, so stellt sich die Frage, ob dieser Effekt multifaktoriell bedingt ist oder durch einen bestimmten Aspekt der Bauernhofumgebung wie zum Beispiel Rohmilchverzehr, Tierkontakt oder Endotoxinexposition entsteht (von Mutius and Vercelli, 2010). Einen einzelnen Faktor der Bauernhofexposition zu untersuchen gestaltet sich schwierig, da es in der Bauernhofumgebung zumeist zu Überschneidungen dieser Einzelfaktoren kommt. Vielmehr besteht dieser Effekt wohl aus einem komplexen Zusammenspiel der Umwelt mit immunologischen, genetischen und epigenetischen Faktoren. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Bauernhofumgebung per se als Modell einer „allergie-protektiven“ Umgebung untersucht.

5.4.2 Entwicklung pfeifender Atemgeräusche und Assoziation mit einer allergischen Sensibilisierung

Pfeifende Atemgeräusche, die als *wheeze* bezeichnet werden, sind typische Symptome bei Kindern in den ersten Lebensjahren. Ein Drittel aller Kinder erkrankt bis zum dritten Geburtstag mindestens einmal an pfeifenden Atemgeräuschen (Martinez et al., 1995). Triggerabhängig wird *wheeze* einerseits in *multitrigger wheeze* eingeteilt, welches durch mindestens zwei verschiedene Trigger wie Kälte, Anstrengung, Hausstaub, Tierkontakt, Pollen ausgelöst wird, und andererseits in *viral wheeze* im Rahmen von Atemwegsinfekten (Brand et al., 2008, Frey and von Mutius, 2009). Eine weitere Einteilung kann – modifiziert nach Depner et al. – nach dem zeitlichen Auftreten der pfeifenden Atemgeräusche erfolgen: Früh aufgetretene Symptome (*early wheeze*), spät aufgetretene Symptome ab dem sechsten Lebensjahr (*late onset wheeze*) oder *persistent wheeze* mit Symptomen im Alter von drei, sechs und zehn Jahren (Martinez et al., 1995, Depner et al., 2014).

In der PAULCHEN-Gesamtpopulation besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und dem Auftreten pfeifender Atemgeräusche.

Außerdem zeigen allergisch sensibilisierte Kinder vermehrt *multitrigger wheeze*. Auch im zeitlichen Auftreten der pfeifenden Atemgeräusche sind signifikante Unterschiede zu erkennen: Die allergisch sensibilisierten Kinder entwickeln eher spät pfeifende Atemgeräusche (*late onset wheeze*) oder zeigen durchgehend Symptome (*persistent wheeze*). Die Ergebnisse in der real-time RT-PCR Subpopulation ähneln denen der Gesamtpopulation. Es besteht weiterhin ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und dem Auftreten pfeifender Atemgeräusche. Außerdem zeigen allergisch sensibilisierte Kinder vermehrt *multitrigger wheeze* und entwickeln eher spät pfeifende Atemgeräusche (*late onset wheeze*) oder zeigen sogar durchgehend Symptome (*persistent wheeze*). Bei Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern ist eine Tendenz für eine geringere Prävalenz an *multitrigger wheeze* zu sehen (n=2), jedoch nicht signifikant. Diese Tendenz erfordert weitere Untersuchungen in größerer Fallzahl.

Van Wonderen et al. berichten für Kinder mit *multitrigger wheeze* ein deutlich erhöhtes Risiko, später an Asthma bronchiale zu erkranken (van Wonderen et al., 2016). Ein *persistent wheeze* ist mit Asthma bronchiale, einer eingeschränkten Lungenfunktion in Form eines erniedrigten Tiffenau-Index und höheren Werten für exhalierendes Stickstoffmonoxid als Modell einer chronischen Inflammation der Atemwege assoziiert (Granell et al., 2016). Auch die Kombination aus *persistent wheeze* und einer nachgewiesenen allergischen Sensibilisierung führt zu einem erhöhten Risiko, später an Asthma bronchiale zu erkranken (Amin et al., 2014). Insofern kann also der im Rahmen dieser Dissertation beobachtete Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und Symptomen eines *multitrigger wheeze* oder eines *persistent wheeze* auf ein erhöhtes Risiko, später an Asthma bronchiale zu erkranken, hindeuten. Einschränkend ist anzumerken, dass diese Beobachtungen in einer kleinen Gruppe erfolgt sind. Zum einen ist dies also in einer größeren Kohorte zu überprüfen. Zum anderen ist eine weitere Verlaufsbeobachtung der im Rahmen der PAULCHEN-Studie untersuchten Kinder notwendig mit dem Fokus auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen und insbesondere Asthma bronchiale. Dies wird in einem weiteren Projekt der Arbeitsgruppe derzeit untersucht.

5.5 Schlussfolgerung

In dieser Dissertation wurde im Rahmen der PAULCHEN-Studie eine prospektive Geburtskohorte mit dem Fokus auf Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern in der Genexpression Th1- und Th2-assoziiierter Gene sowie in der Sekretion Th1- und Th2-assoziiierter Zytokine untersucht. Über einen Zeitraum von zehn Jahren wurde beobachtet, ob die Kinder eine allergische Sensibilisierung und pfeifende Atemgeräusche (*wheeze*) als mögliches Frühsymptom eines Asthma bronchiale entwickeln. Langfristig soll die Frage beantwortet werden, ob bereits die Immunregulation im Nabelschnurblut zur Prädiktion einer späteren Entwicklung allergischer Erkrankungen geeignet ist. Vor dem Hintergrund der Bauernhofexposition als Modell einer „allergieprotektiven“ Umgebung würde dies zum weiteren Verständnis des komplexen Netzwerkes immunologischer, genetischer und epigenetischer Faktoren beitragen, das dem Bauernhofeffekt zu Grunde liegt.

Die PAULCHEN-Studie ist in ihrer detailgetreuen Beobachtung außergewöhnlich, da sie als Geburtskohorte mehrere wichtige Ergebnisse beinhaltet. Bereits bei Geburt konnten wir zeigen, dass die zentralen Th1- und Th2-Regulatoren Tbet und STAT6 im Nabelschnurblut von Bauernkindern signifikant vermindert sind, was für eine Suppression der Immunantwort spricht. Die Zytokinsekretion mit signifikant verminderter Sekretion von IL-5 und trendweise vermehrter Sekretion von IL-12 im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern deutet auf eine eher Th1-gewichtete Sekretion hin und könnte damit auf eine „allergie-protective“ Ausrichtung des Immunsystems nach pränataler Bauernhofexposition hinweisen. Außerdem ist diese Studienpopulation im Detail epidemiologisch charakterisiert und über einen langen Beobachtungszeitraum von drei, sechs und zehn Jahren in einer sehr guten Follow-up Rate von 97% verfolgt wurden. Hierdurch wurde es möglich zu zeigen, dass Kinder, die in der „allergie-protectiven“ Bauernhofumgebung aufwachsen, seltener eine allergische Sensibilisierung entwickeln als die Nicht-Bauernkinder. Dies ist in der Untergruppe, in der die real-time RT-PCR durchgeführt wurde, nicht mehr signifikant, wobei hier sicherlich durch die geringe Fallzahl eine Limitation erreicht wird. Die Beobachtung, dass allergisch sensibilisierte Kinder häufiger an *multitrigger wheeze* und *persistent wheeze* erkranken, kann auf ein erhöhtes Risiko, später an Asthma bronchiale zu erkranken, hindeuten und spiegelt die aktuelle Literatur wider.

Weiteren Aufschluss über die Entwicklung der untersuchten Kinder insbesondere im Hinblick auf atopische Erkrankungen können Verlaufsuntersuchungen geben, zumal die bisherige Verlaufsbeobachtung aus einer rein epidemiologischen Datenerhebung besteht. Hier wäre insbesondere eine klinische Verlaufsuntersuchung inklusive Lungenfunktion und Messung des exhalieren Stickstoffmonoxids interessant sowie die Analyse peripherer Blutzellen, um die Ergebnisse mit denen aus dem Nabelschnurblut zu vergleichen.

Die Tatsache, dass wir bereits bei Geburt Unterschiede zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern in der Genexpression und der Zytokinsekretion zentraler Th1- und Th2-Regulatoren sehen, kann zukünftig gemeinsam mit einer detaillierten Verlaufsbeobachtung der Kinder für eine frühe Prädiktion der Allergieentwicklung genutzt werden. Dies könnte in der Folge neue Therapieoptionen in der Prävention und Behandlung allergischer Erkrankungen eröffnen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Seit mehreren Jahrzehnten wird in den Industrienationen eine erhöhte Prävalenz atopischer Erkrankungen im Kindesalter beschrieben. Insbesondere die pränatale Modulation des Immunsystems durch Umwelteinflüsse steht im Fokus des Interesses. Dies kann bereits zum frühest möglichen Zeitpunkt, nämlich im Nabelschnurblut, erfasst werden. So gilt die sinkende Exposition gegenüber mikrobiellen Stimuli als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen (Bloomfield et al., 2006). Ein Modell für die frühe Immunstimulation ist das Leben auf einem Bauernhof. Bereits die präpartale Bauernhofexposition durch die Mutter während der Schwangerschaft führt zu einer niedrigeren Prävalenz atopischer Erkrankungen bei den Kindern (Douwes et al., 2008). Dieser Bauernhofeffekt basiert auf einem komplexen Netzwerk immunologischer, genetischer und epigenetischer Faktoren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss der Th1- und Th2-Zellen in der frühen Immunmaturation auf die Entstehung einer allergischen Sensibilisierung im Kindesalter untersucht. Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung der Genexpression und der Zytokinsekretion im Nabelschnurblut von Bauern- und Nicht-Bauernkindern sowie die Auswertung der epidemiologischen Daten. Der Fokus liegt hierbei auf der Identifikation einer unterschiedlichen Genexpression bereits im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern mit der Hypothese, dass Bauernkinder durch mikrobielle Stimulation und infolge dessen auch Stimulation ihres Immunsystems seltener eine allergische Sensibilisierung entwickeln als Nicht-Bauernkinder. Deshalb wird bei den untersuchten Kinder in einer Verlaufsbeobachtung bis zum Alter von zehn Jahren die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung sowie das Auftreten pfeifender Atemgeräusche (*wheeze*) als mögliches Symptom eines Asthma bronchiale anhand von Fragebögen erfasst.

91 Frauen wurden im letzten Trimenon der Schwangerschaft in die PAULCHEN-Studie eingeschlossen. Das Studiendesign sah eine Gruppe von Nicht-Bauernkindern ($n = 66$) und eine Gruppe von Bauernkindern ($n = 25$) vor. In einer Subgruppe von 72 Kindern wurde die Genexpression zentraler Th1- und Th2-assoziiierter Transkriptionsfaktoren mittels real-time RT-PCR untersucht und die Sekretion Th1- und Th2-assoziiierter Zytokine gemessen.

Im Nabelschnurblut von Bauernkindern ist im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern die Genexpression zentraler Th1- und Th2-assoziiierter Transkriptionsfaktoren erniedrigt. Für Tbet als zentralen Th1-Regulator sehen wir nach Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch DundP, einer Kombination aus der Hausstaubmilbe Derp1 und Peptidoglykan, eine signifikant niedrigere Expression im Nabelschnurblut von Bauernkindern gegenüber Nicht-Bauernkindern ($p=0,025$). Auch die Expression des zentralen Th2-Transkriptionsfaktors STAT6 nach Stimulation durch DundP ($p=0,016$) und der Isoform STAT6e unstimuliert ($p=0,005$) ist im Nabelschnurblut von Bauernkindern signifikant erniedrigt im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern. Dass die Genexpression sowohl Th1- als auch Th2-assoziiierter Gene im Nabelschnurblut von

Bauernkindern erniedrigt ist, spricht für eine generelle Suppression der Immunantwort bereits bei Geburt. Möglicherweise entwickeln die Bauernkinder bereits pränatal bei exogener Stimulation durch die Bauernhofumgebung während der Schwangerschaft eine Veränderung der Immunregulation, die zu einer Reduktion von sowohl Th1- als auch Th2-Zellen führt. Mit dem Ziel, sicherzustellen, dass die Unterschiede in der Genexpression tatsächlich auf den Bauernhofeffekt zurückzuführen sind, wurden die Ergebnisse für mögliche Confounder adjustiert, die Einfluss auf die Genexpression im Nabelschnurblut von Bauern- und Nicht-Bauernkindern haben könnten (Geschlecht des Kindes und die mütterlichen Faktoren Asthma, Atopie, Rauchen und Bildung).

Betrachtet man die Korrelation der Genexpression, so ist die Expression aller untersuchten Gene hoch positiv korreliert, insbesondere nach Stimulation. Dieser Effekt bleibt in der Subgruppe der Nicht-Bauernkinder bestehen. Im Nabelschnurblut von Bauernkindern ist eine positive, signifikante Korrelation auch unstimuliert zu sehen. Dies könnte darauf hindeuten, dass Bauernkinder die hohe Korrelation bereits ohne weitere Aktivierung des Immunsystems zeigen.

In der Analyse der Zytokin-Sekretion deutet die signifikant verminderte Sekretion von IL-5 und die trendweise vermehrte Sekretion von IL-12 in Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern auf eine „allergie-protective“ Prägung des Immunsystems nach pränataler Bauernhofexposition hin. IL-5 als typisches Th2-Zytokin wird im Nabelschnurblut von Bauernkindern nach Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch DendP im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern signifikant weniger sezerniert ($p=0,031$). IL-12 als Th1-Zytokin wird hingegen vermehrt sezerniert (Trend, $p=0,055$).

Die an der PAULCHEN-Studie teilnehmenden Familien wurden drei, sechs und zehn Jahre nach Studieneinschluss um Beantwortung von Fragebögen zur Gesundheit des Kindes, Familienanamnese und Leben auf dem Bauernhof gebeten. Insgesamt nahmen 87 der ursprünglich 91 Familien an der Verlaufsbeobachtung über zehn Jahre teil, dies entspricht einer follow-up Rate von 96 %. In der Subpopulation der Kinder mit real-time RT-PCR Daten nahmen 97 % an der Verlaufsbeobachtung teil. Die Fragebögen wurden mit dem Fokus auf die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und pfeifender Atemgeräusche (*wheeze*) als mögliches Symptom von Asthma bronchiale ausgewertet.

Über den Beobachtungszeitraum von zehn Jahren entwickeln Kinder, die in einer „allergie-protectiven“ Bauernhofumgebung aufwachsen, signifikant seltener eine allergische Sensibilisierung als die Nicht-Bauernkinder ($p=0,028$), in der real-time RT-PCR Subpopulation ist dies als Trend zu sehen. Die Kinder mit allergischer Sensibilisierung erkrankten signifikant häufiger an pfeifenden Atemgeräuschen (*wheeze*) und insbesondere an *multitrigger wheeze*, verursacht durch mindestens zwei verschiedene Trigger wie Kälte, Anstrengung, Hausstaub, Tierkontakt und Pollen. Auch im zeitlichen Auftreten der pfeifenden Atemgeräusche sind signifikante Unterschiede zu erkennen: Die allergisch sensibilisierten Kinder entwickeln eher spät pfeifende Atemgeräusche (*late onset wheeze*) oder zeigen durchgehend Symptome (*persistent wheeze*). Diese Beobachtungen sind sowohl in der Gesamtpopulation der PAULCHEN-Geburtskohorte als auch in der real-time RT-PCR Untergruppe signifikant. Der Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und Symptomen eines *multitrigger wheeze* oder eines *persistent*

wheeze kann auf ein erhöhtes Risiko, später an Asthma bronchiale zu erkranken, hindeuten.

Zusammengefasst sehen wir in einer prospektiven Geburtskohorte im Nabelschnurblut von Bauernkindern – als Modell einer bereits pränatalen Modulation des Immunsystems durch eine „allergie-protective“ Umgebung – eine signifikant niedrigere Genexpression für Tbet und STAT6 als zentrale Th1- und Th2-Regulatoren. Dies spricht für eine generelle Suppression der Immunantwort bereits bei Geburt. Die signifikant verminderte Sekretion des Th2-Zytokins IL-5 und die tendenziell vermehrte Sekretion des Th1-Zytokins IL-12 im Nabelschnurblut von Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern deuten auf eine „allergie-protective“ Prägung des Immunsystems nach pränataler Bauernhofexposition hin. In der Verlaufsbeobachtung über zehn Jahre entwickeln Bauernkinder seltener eine allergische Sensibilisierung als Nichtbauernkinder. Es ist außerdem ein Zusammenhang zwischen einer allergischen Sensibilisierung und der Entwicklung pfeifender Atemgeräusche, insbesondere *multitrigger wheeze*, zu sehen, was auf ein erhöhtes Risiko, an Asthma bronchiale zu erkranken, hindeuten könnte.

Langfristig soll die Frage beantwortet werden, ob bereits die Immunregulation im Nabelschnurblut zur Prädiktion einer späteren Entwicklung allergischer Erkrankungen geeignet ist. Weiteren Aufschluss über die Entwicklung der untersuchten Kinder insbesondere im Hinblick auf allergische Erkrankungen können Verlaufsuntersuchungen geben, zumal die bisherige Verlaufsbeobachtung aus einer rein epidemiologischen Datenerhebung besteht. Eine klinische Verlaufsbeobachtung der Kinder inklusive Analyse der peripheren Blutzellen würde eine detaillierte Charakterisierung der Studienpopulation im Kindesalter ermöglichen, dies könnte dann mit den bei Geburt erhobenen Daten aus dem Nabelschnurblut verglichen werden. Die Tatsache, dass wir bereits bei Geburt Unterschiede zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern in der Genexpression und der Zytokinsekretion zentraler Th1- und Th2-Regulatoren sehen, kann gemeinsam mit einer detaillierten Verlaufsbeobachtung der Kinder für eine frühe Prädiktion der Allergieentwicklung genutzt werden. Dies könnte in der Folge neue Therapieoptionen in der Prävention und Behandlung allergischer Erkrankungen eröffnen und würde zum weiteren Verständnis des komplexen Netzwerkes immunologischer, genetischer und epigenetischer Faktoren beitragen, das dem Bauernhofeffekt als Modell einer „allergie-protectiven“ Umgebung zu Grunde liegt.

7 ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFSERLÄUTERUNGEN

18S	Housekeeping gene
A20	TNFAIP3 oder TNF alpha induced protein 3
bp	Basenpaare
CBMC	Mononukleäre Zellen aus dem Nabelschnurblut
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (hergestellt aus RNA mittels reverser Transkriptase)
CD	Cluster of Differentiation
CIE	Change in estimate
CT	Cycle-Threshold (der Abschnitt der PCR-Kurve, an dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt)
° C	Temperatur in Grad Celsius
ct	Cycle threshold oder Schwellenwert-Zyklus
Derp	Dermatophagoides pteronyssinus
DundP	Kombination aus Der p 1 und Ppg
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	DNase-, RNase- Protease-free water
Derp	Dermatophagoides pteronyssinus Peptidase 1
DundP	Kombination aus Derp und Ppg
Δ ct	Delta-ct (Differenz aus dem ct-Wert des untersuchten Gens und dem ct-Wert von 18S)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein isothiocyanate
h	Stunde
HLX1	H20.-like homebox 1
IgE	Immunglobulin E
IL-	Interleukin-
IFN- γ	Interferon-gamma
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus-Kinase
LpA	Lipid A
M	Media (unstimulierte CBMC)
MHC	Major Histocompatibility Complex oder Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ppg	Peptidoglykan
PHA	Phytohämagglutinin
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
Real-time RT-PCR	Quantitative real-time Reverse-Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
STAT6	Signal transducer and activator of transcription protein 6
Tbet	T-box transcription factor
TfH-Zellen	Follikuläre T-Helferzellen
Th1	Typ1-T-Helferzellen
Th2	Typ2-T-Helferzellen
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha

8 ANHANG

8.1 Einverständniserklärung

EINVERSTÄNDNIS

Zur Nabelschnurblutstudie PAULCHEN

„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

8.2 Fragebogen bei Studieneinschluss

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

_____ **LMU**
Ludwig _____
Maximilians-
Universität _____
München _____

Datum: _____

Studiennummer: _____

Nabelschnurblutstudie PAULCHEN 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. Das Ausfüllen des Fragebogens dürfte nicht mehr als 15 Minuten dauern. Die meisten Fragen können mit Ja/Nein beantwortet werden. Bei einigen Fragen gibt es Auswahlmöglichkeiten. Wenn Sie eine Frage nicht beantworten möchten, lassen Sie sie bitte aus. Wenn Ihnen etwas unklar ist, bitte auf dem Fragebogen notieren.

Die ersten Angaben sind allgemein zu Ihrer Person:

1. Wann wurden Sie geboren?

____/____/____
Tag/ Monat/ Jahr

2. Wie groß sind Sie?

____ cm

3. Welches Körpergewicht hatten Sie vor Beginn der Schwangerschaft?

____ kg

4. Sind Sie in Deutschland geboren?

Ja

Nein, ich bin in _____ geboren.

5. Welche Staatsangehörigkeit haben Sie?

Wir fragen nach der Staatsangehörigkeit, damit wir einschätzen können, welche Bevölkerungsgruppe wir untersucht haben.

6. Welche Staatsangehörigkeit hat der Vater des Kindes?

7. Wie ist Ihr gegenwärtiger Familienstand? Sind Sie:

- verheiratet
- in einer festen Beziehung lebend, aber nicht verheiratet
- geschieden oder getrennt lebend
- alleinlebend
- sonstiges (z.B. verwitwet)

8. Welche Schulausbildung haben Sie abgeschlossen?

- Hauptschule
- Realschule
- Gymnasium
- Universität/ Fachhochschule
- Kein Schulabschluss
- Andere: bitte angeben: _____

9. Welchen Beruf haben Sie vorwiegend in den letzten 5 Jahren ausgeübt?

Die nächsten Fragen beziehen sich auf Gesundheitsbeschwerden:**10. Hat ein Arzt jemals eine der folgenden Erkrankungen bei Ihnen diagnostiziert?**

- Asthma
- Heuschnupfen
- Neurodermitis (atopisches Ekzem, atopische Dermatitis)
- Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis.
- Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche _____
- Darmerkrankung (Morbus Crohn, ulzerative Kolitis)
- Weitere: _____

Nein

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

- Asthma
- Heuschnupfen
- Neurodermitis (atopisches Ekzem, atopische Dermatitis)
- Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis.
- Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche: _____
- Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)
- Weitere: _____

Nein

12. Haben Sie dafür Medikamente eingenommen?

Ja, ich habe folgendes Medikament eingenommen: _____
 Dosis: _____

Nein

13. Haben Sie während der Schwangerschaft Medikamente eingenommen?

Ja, ich habe folgende Medikamente eingenommen: _____
 Dosis: _____
 von der _____ SSW (Schwangerschaftswoche) bis zur _____ SSW.

Nein

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

	Ja	Nein
Asthma		
Heuschnupfen		
Neurodermitis (atopisches Ekzem, atopische Dermatitis)		

15. 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.

16. Ist dies Ihre erste Schwangerschaft?

Ja
 Nein, ich habe bereits _____ Kinder.

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

Ja, in der _____ Schwangerschaftswoche.
 Nein

18. Falls Sie weitere Kinder haben:

Leidet eines oder mehrere Kinder unter einer der folgenden Erkrankungen, die von einem Arzt diagnostiziert wurden:

	Ja	Nein
Asthma		
Heuschnupfen		
Neurodermitis (atopisches Ekzem, atopische Dermatitis)		

Die folgenden Fragen beziehen sich auf ihr Lebensumfeld:

19. Leben Sie auf einem Bauernhof, auf dem Vieh gehalten wird ?

- Ja
Nein (bitte weiter mit Frage 26)

20. Bewirtschaftet Ihre Familie den Hof?

- Ja
Nein (bitte weiter mit Frage 26)

21. Sind Sie selbst aktiv an der Bewirtschaftung des Hofes beteiligt?

- Ja
Nein (bitte weiter mit Frage 26)

22. Seit wann und wie viele Jahre arbeiten Sie auf dem Hof?

Seit dem Jahre _____ für _____ Jahre

23. Welche Nutztiere werden gehalten und in welcher Zahl?

Milchkühe	_____	Anzahl
Schweine	_____	Anzahl
Geflügel (Hühner, Puten, Enten, Gänse etc.)	_____	Anzahl
Pferde (Ponys, Esel etc.)	_____	Anzahl
Schafe/Ziegen	_____	Anzahl
Hasen/Kaninchen	_____	Anzahl

24. Welches Futter erhalten die Tiere?

Heu	Ja	Nein
Grassilage	Ja	Nein
Maissilage	Ja	Nein
Andere Silage	Ja	Nein
Grascops	Ja	Nein
Anderes Futter in pelletierter Form	Ja	Nein
Kraffutter bzw. Milchleistungsfutter	Ja	Nein
Sonstiges:	_____	

25. Bei welcher der folgenden Tätigkeiten sind Sie normalerweise beteiligt oder bei der Durchführung anwesend?

Melken	Ja	Nein
Entmisten	Ja	Nein
Einstreuen	Ja	Nein
Waschen der Melkutensilien	Ja	Nein
Kälber tränken	Ja	Nein

Reinigen der Tiere	Ja	Nein
Umgang mit Heu	Ja	Nein
Umgang mit Silage	Ja	Nein
Umgang mit Kompost	Ja	Nein
Vieh überwachen, Medikamente verabreichen	Ja	Nein
Kehren des Bodens /	Ja	Nein
Reinigung von Ställen oder Scheunen		
Bewegen der Tiere innerhalb des Stalls	Ja	Nein
Tätigkeiten mit engem Kontakt zum Vieh (z.B. Zähne-Schneiden, Anbringen der Ohmarken, Kastrierung)	Ja	Nein
Dreschen oder Getreidemahlen	Ja	Nein
Eier im Geflügelstall einsammeln	Ja	Nein
Reinigung des Hühnerstalles	Ja	Nein
Sonstiges:	_____	

26. Wie häufig im Durchschnitt haben Sie sich während dieser Schwangerschaft auf einem Bauernhof im Stall aufgehalten, dort ausgeholfen oder gearbeitet ?

Gemeint sind Ställe von Großvieh, d.h. Kühe, Schweine, Pferde, Schafe, Ziegen. Es können auch halbe Stunden (0,5 Std.) angegeben werden.

Im 1. bis 3. Schwangerschaftsmonat,

O gar nicht

O seltener als einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat

O mindestens einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

Im 4. bis 6. Schwangerschaftsmonat,

O gar nicht

O seltener als einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat

O mindestens einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

Im 7. bis 9. Schwangerschaftsmonat,

O gar nicht

O seltener als einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat

O mindestens einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

27. Wie häufig im Durchschnitt haben Sie sich während dieser Schwangerschaft auf einem Bauernhof in der Scheune aufgehalten, dort ausgeholfen oder gearbeitet?

Im 1. bis 3. Schwangerschaftsmonat,

O gar nicht

O seltener als einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat

O mindestens einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

Im 4. bis 6. Schwangerschaftsmonat,

O gar nicht

O seltener als einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat

O mindestens einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

Im 7. bis 9. Schwangerschaftsmonat,

O gar nicht

O seltener als einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat

O mindestens einmal pro Woche:

Durchschnittlich _____ Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

28. Wie oft hatten Sie während dieser Schwangerschaft Kontakt zu den folgenden Nutztieren?

Im 1. bis 3. Schwangerschaftsmonat:

	nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde (Ponys, Esel etc.)				
Kühe				
Schweine				
Schafe / Ziegen				
Hasen / Kaninchen				
Geflügel (Hühner, Puten, etc.)				

Im 4. bis 6. Schwangerschaftsmonat:

	nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde (Ponys, Esel etc.)				
Kühe				
Schweine				
Schafe / Ziegen				
Hasen / Kaninchen				
Geflügel (Hühner, Puten, etc.)				

Im 7. bis 9. Schwangerschaftsmonat:

	Nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde (Ponys, Esel etc.)				
Kühe				
Schweine				
Schafe / Ziegen				
Hasen / Kaninchen				
Geflügel (Hühner, Puten, etc.)				

Nun folgen Fragen zum Lebensumfeld während Ihrer Kindheit:

29. Lebten Sie als Kind auf einem Bauernhof

Ja
Nein (dann weiter mit Frage 32)

30. Wurde auf diesem Hof Vieh gehalten?

Ja
Nein (dann weiter mit Frage 32)

31. Welche Tierarten wurden gehalten?

	Als hauptsächliche Tierart	Zusätzlich
Kühe, Rinder, Jungvieh		
Schweine		
Andere Tiere (z.B. Schafe, Ziegen, Geflügel, Hasen)		

32. Haben Sie als Kind beim Heuen geholfen?

	Ja	Nein
Bis zum 10. Lebensjahr		
Zwischen 10. und 18. Lebensjahr		
Nach dem 18. Lebensjahr		

33. Wie viele Personen leben zur Zeit ständig in Ihrem Haushalt, Sie selbst mit eingerechnet?

___ Personen

34. Wie viele Personen sind davon unter 18 Jahre?

___ Kinder und Jugendliche

35. Haben Sie Haustiere?

Ja
Nein (dann weiter mit Frage 38)

36. Wie viele Tiere der folgenden Tierarten haben Sie?

Katzen ___ Anzahl
Hunde ___ Anzahl
Vögel ___ Anzahl

Sonstige (bitte angeben): _____ Anzahl

37. Halten Sie die Tiere innerhalb der Schlafräume auf?

Ja
Nein

Es folgen nun noch einige Fragen zur Ernährung:

38. Haben Sie während der Schwangerschaft Frischmilch direkt vom Bauernhof getrunken?

- Ja
- Nein

39. Kochen Sie diese Milch normalerweise vor dem Trinken ab?

- Ja, aber nur während der Sommermonate
- Ja, immer
- Nein

40. Wie viele Gläser Frischmilch vom Bauernhof haben Sie durchschnittlich pro Tag während dieser Schwangerschaft getrunken?

Ein Glas entspricht etwa 0,2 Liter.

Im 1. bis 3. Schwangerschaftsmonat

Wie viele Gläser pro Tag? _____

Im 4. bis 6. Schwangerschaftsmonat

Wie viele Gläser pro Tag? _____

Im 7. bis 9. Schwangerschaftsmonat

Wie viele Gläser pro Tag? _____

Vielen herzlichen Dank

für Ihre Zeit den Fragebogen auszufüllen!

Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

Studienleitung:

Prof. Dr. med. Erika von Mutius

Studienärztin:

Dr. med. Bianca Schaub

Dr. von Haunersches Kinderspital
Lindwurmstr. 4
80337 München
(Tel: 089/5160-7856 oder -7783)

8.3 Fragebogen zum 3. Lebensjahr

ID: _____



PAULCHEN

Fragebogen zum **3. Lebensjahr**

Ihres Kindes

München, 01.09.2008

Von wem wurde der Fragebogen ausgefüllt?
 Mutter , Vater , Andere: _____
Datum des Ausfüllens: ____/____/_____(Tag/ Monat/ Jahr)

Allgemeine Angaben zu Ihrem Kind:
Wann wurde das Kind geboren? ____/____/_____(Tag / Monat / Jahr)
Wie heißt das Kind? _____
Wie schwer ist Ihr Kind jetzt? _____ kg
Wie groß ist Ihr Kind jetzt? _____ cm

Angaben zur Gesundheit des Kindes
 Wir beginnen mit Fragen zur Gesundheit Ihres Kindes.
 Die Fragen zur Gesundheit Ihres Kindes beziehen sich – wo nicht anders angegeben – auf die letzten 3 Jahre (± 3 Monate), d.h. die Zeit seit Geburt.

Es folgen Fragen zu pfeifenden und keuchenden Atemgeräuschen. Mit pfeifenden Atemgeräuschen meinen wir ein pfeifendes Geräusch, das aus dem Brustkorb kommt, aber nicht geräuschvolles Atmen durch die Nase.

1. Wie häufig hatte Ihr Kind in den letzten 3 Jahren pfeifende oder keuchende Atemgeräusche?

Nie ⇒ weiter mit Frage 8!
 Seltener als einmal pro Monat
 Einmal pro Monat
 Mindestens zweimal pro Monat

2. Wie häufig hatte Ihr Kind in den letzten 3 Jahren pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Nie ⇒ weiter mit Frage 8!
 Seltener als einmal pro Monat
 Einmal pro Monat
 Mindestens zweimal pro Monat

3. Hat Ihr Kind in den letzten 3 Jahren jemals durch Aufregung oder körperliche Aktivität pfeifende oder keuchende Atemgeräusche bekommen, ohne dass es erkältet war?

Ja Nein

4. Wodurch wurden bei Ihrem Kind die pfeifenden / keuchenden Atemgeräusche ausgelöst?

	Ja	Nein
Anstrengung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Erkältung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Tieren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Hausstaub	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Gras.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

5. Hat Ihr Kind jemals in den letzten 3 Jahren von einem Arzt Medikamente gegen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche verschrieben bekommen? (Gemeint sind damit nicht nur Medikamente zum Schlucken, sondern auch Inhalationen oder Sprays)

Ja

Nein..... ⇒ weiter mit Frage 8!

6. Welche Medikamente waren dies?
Bitte notieren Sie jeweils möglichst genau den Markennamen.

1. _____

2. _____

3. _____

7. Erhält Ihr Kind solche Medikamente gegen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche

nur bei besonders schweren Phasen solcher Atemgeräusche?.....

bei (fast) jeder Phase pfeifender oder keuchender Atemgeräusche?

sowohl während akuter Phasen derartiger Geräusche als auch vorbeugend?


8. Wurde bei Ihrem Kind jemals von einem Arzt ein Allergietest durchgeführt?

Ja Nein

Ein Hauttest

Ein Bluttest.....

Ein anderer Test, z.B. Bioresonanz

 **Achtung: wenn alle drei Test-Arten mit „Nein“ beantwortet wurden, weiter mit Frage 10!**

9. Welche Allergie wurde dabei festgestellt?

Ja Nein

Gegen Pollen.....

Gegen Hausstaub(milben).....

Gegen Tiere

Gegen Nahrungsmittel.....

Andere:
 _____

Es folgen Fragen zu Hauterkrankungen

10. Hatte Ihr Kind jemals in den letzten 3 Jahren einen juckenden Hautausschlag mit Kratzen und Reiben der Haut?

Ja Nein => weiter mit Frage 15!

11. War der Hautausschlag in den letzten 3 Jahren je an einer der folgenden Stellen?

Ja Nein

Gesicht

Hals

Ellenbeugen / Kniekehlen

Hand- / Fußgelenke

12. Wenn Sie die Zeiten, in denen Ihr Kind diesen Hautausschlag hatte, zusammen zählen: Wie lange haben Sie in den letzten 3 Jahren diesen Hautausschlag jeweils pro Jahr beobachtet?

Für insgesamt weniger als 6 Wochen / Jahr

Für insgesamt 6 Wochen bis 2 Monate/ Jahr

Für insgesamt 3-5 Monate/ Jahr.....

Für insgesamt 6-11 Monate/ Jahr.....

Praktisch für die gesamten 12 Monate/ Jahr

13. Ist der Hautausschlag wieder völlig verschwunden, oder „kommt und geht“ der Hautausschlag?

Der Hautausschlag ist vollständig
 verschwunden

Der Hautausschlag „kommt und geht“ ... ⇒ weiter mit Frage 15!

Der Hautausschlag ist noch da ⇒ weiter mit Frage 15!

14. Wie alt war Ihr Kind, als der Hautausschlag wieder vollständig verschwunden ist? _____ Monate

15. Wie häufig kam es in den letzten 3 Jahren vor, dass ihr Kind sich kratzt?

Nie ⇒ weiter mit Frage 19!

Seltener als einmal pro Monat

1 bis 3 mal pro Monat

4 bis 6 mal pro Woche

Ein- oder mehrmals täglich

16. Wie häufig kam es in den letzten 3 Jahren vor, dass Ihr Kind sich wegen eines starken Juckreizes blutig gekratzt hat?

Nie

Seltener als einmal pro Monat

1 bis 3 mal pro Monat

4 bis 6 mal pro Woche

Ein- oder mehrmals täglich

17. Wie häufig ist Ihr Kind in den letzten 3 Jahren nachts wegen Juckreiz aufgewacht?

Seltener als einmal pro Monat

Einmal pro Monat

Mindestens zweimal pro Monat

18. Haben Sie die Haut Ihres Kindes in den letzten 3 Jahren mit einer cortisonhaltigen Creme / Salbe oder einer Tacrolimus- bzw. Pimecrolimus-haltigen Salbe (Protopic, Elidel) behandelt?

Ja Nein

Es folgen Fragen zu Nahrungsunverträglichkeiten oder -allergien

19. Reagiert Ihr Kind auf irgendwelche Nahrungsmittel mit Hautveränderungen? Wir meinen damit eine Nesselsucht oder das Auftreten bzw. die Verschlechterung einer Neurodermitis.

Ja Nein => weiter mit Frage 23!

20. Auf welche Nahrungsmittel reagiert Ihr Kind mit derartigen Hautveränderungen?

	Ja	Nein
Milch und Milchprodukte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hühnereier	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Weizenmehl oder andere Getreideprodukte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nüsse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Soja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zitrusfrüchte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderes Obst oder Gemüse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderer Nahrungsmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche? _____		

21. Wurde bei Ihrem Kind von einem Arzt / einer Ärztin in den letzten 3 Jahren eine Nahrungsmittelallergie diagnostiziert?

Ja

Nein ⇒ weiter mit Frage 23!

22. Wurde diese Nahrungsmittelallergie durch einen Allergietest bestätigt?

Ja Nein

Durch einen Hauttest, einen Bluttest oder

einen oralen Provokationstest

Durch einen anderen Test, z.B. Bioresonanz

23. Haben Sie Ihr Kind gestillt?

Ja Wie lange haben Sie Ihr Kind gestillt? _____

Nein

24. Hat Ihr Kind in den letzten 3 Jahren Frischmilch direkt vom Bauernhof getrunken?

Ja

Nein ⇒ weiter mit Frage 27!

25. Kochen Sie diese Milch normalerweise vor dem Trinken ab?

Ja, aber nur während der Sommermonate

Ja, immer

Nein

26. Wie viele Gläser Frischmilch vom Bauernhof hat Ihr Kind in den letzten 3

Jahren durchschnittlich pro Tag getrunken? (Ein Glas entspricht etwa 0,2 Liter)

Im 1. bis 12. Lebensmonat

Wie viele Gläser pro Tag? _____

Im 12. bis 24. Lebensmonat

Wie viele Gläser pro Tag? _____

Im 24. bis 36. Lebensmonat

Wie viele Gläser pro Tag? _____

Es folgen Fragen zu anderen Erkrankungen

27. Wurde bei Ihrem Kind in den letzten 3 Jahren von einem Arzt/einer Ärztin eine spastische Bronchitis, obstruktive Bronchitis oder asthmatische Bronchitis diagnostiziert?

Nein, nie.....

Ja, einmal

Ja, mehrmals

28. Wurde bei Ihrem Kind in den letzten 3 Jahren von einem Arzt/einer Ärztin eine der folgenden Diagnosen gestellt?

	Ja	Nein
Asthma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neurodermitis, atopische Dermatitis oder endogenes Ekzem.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Angaben zur Wohnungs- und Lebenssituation

29. Hat Ihre Familie in den letzten 3 Jahren auf einem Bauernhof gelebt, auf dem Vieh gehalten wird? Ja Nein

30. Bewirtschaftete Ihre Familie den Hof in den letzten 3 Jahren?

Ja Nein

31. Welche Nutztiere werden gehalten und in welcher Zahl?

Milchkühe	_____ Anzahl
Schweine	_____ Anzahl
Geflügel (Hühner, Puten, Enten, Gänse etc.)	_____ Anzahl
Pferde (Ponys, Esel etc.)	_____ Anzahl
Schafe/Ziegen	_____ Anzahl
Hasen/Kaninchen	_____ Anzahl

32. Welches Futter erhalten die Tiere?	Ja	nein
Heu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grassilage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maissilage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere Silage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grascops	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderes Futter in pelletierter Form	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kraftfutter bzw. Milchleistungsfutter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges:		

33. Wie häufig wurde Ihr Kind <u>im ersten Lebensjahr</u> mit in den <u>Stall</u> genommen? (Gemeint sind Ställe von Großvieh, d.h. Kühe, Schweine, Pferde, Schafe, Ziegen).	
gar nicht	<input type="checkbox"/>
seltener als einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat	
mindestens einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Tage pro Woche	
An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag	

34. Wie häufig wurde Ihr Kind <u>im zweiten Lebensjahr</u> mit in den <u>Stall</u> genommen?	
gar nicht	<input type="checkbox"/>
seltener als einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat	
mindestens einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Tage pro Woche	
An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag	

35. Wie häufig wurde Ihr Kind <u>im dritten Lebensjahr</u> mit in den <u>Stall</u> genommen?	
gar nicht	<input type="checkbox"/>
seltener als einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat	
mindestens einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Tage pro Woche	
An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag	

36. Wie häufig wurde Ihr Kind <u>im ersten Lebensjahr</u> mit in die <u>Scheune</u> genommen?	
gar nicht	<input type="checkbox"/>
seltener als einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat	
mindestens einmal pro Woche:	<input type="checkbox"/>
Durchschnittlich _____ Tage pro Woche	
An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag	

37. Wie häufig wurde Ihr Kind im zweiten Lebensjahr mit in die Scheune genommen?

- gar nicht
- seltener als einmal pro Woche:**
 Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat
- mindestens einmal pro Woche:**
 Durchschnittlich _____ Tage pro Woche
 An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

38. Wie häufig wurde Ihr Kind im dritten Lebensjahr mit in die Scheune genommen?

- gar nicht
- seltener als einmal pro Woche:**
 Durchschnittlich _____ Stunden pro Monat
- mindestens einmal pro Woche:**
 Durchschnittlich _____ Tage pro Woche
 An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

39. Hatte Ihr Kind im ersten Lebensjahr regelmäßig direkten Kontakt zu Heu, beispielsweise in dem es (z.B. auf einer Decke) aufs Heu gelegt wurde / wird? (*Regelmäßig bedeutet mindestens einmal pro Woche*).

ja nein

40. In welchem Alter wurde Ihr Kind erstmals mit zur Heuernte genommen?

- bereits im ersten Lebensjahr
- erst nach dem ersten Geburtstag, nämlich mit _____ Jahren
- noch nie

41. Wie häufig im Durchschnitt halte Ihr Kind in letzten 3 Jahren Kontakt zu den folgenden Nutztieren?

Im 0. bis 12. Lebensmonat,

	nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde (Ponys, Esel etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kühe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schweine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schafe / Ziegen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hasen / Kaninchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Geflügel (Hühner, Puten, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Im 12. bis 24. Lebensmonat,

	nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde (Ponys, Esel etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kühe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schweine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schafe / Ziegen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hasen / Kaninchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Geflügel (Hühner, Puten, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Im 24. bis 36. Lebensmonat,

	Nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde (Ponys, Esel etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kühe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schweine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schafe / Ziegen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hasen / Kaninchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Geflügel (Hühner, Puten, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

42. Welche der folgenden Haustiere haben/hatten Sie innerhalb der Wohnung ?
 (Mehrere Antworten sind möglich)

	Zur Zeit	Im 1. oder 2. Lebensjahr
Hund.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Katze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hamster.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Meerschweinchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kaninchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vögel.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aquarium (Fische).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

A) Darf oder durfte sich eine Katze im Zimmer, in dem Ihr Kind schläft aufhalten?
 Ja Nein

B) Darf oder durfte sich eine Katze im Bett Ihres Kindes aufhalten?
 Ja Nein

C) Darf oder durfte sich ein Hund im Zimmer, in dem Ihr Kind schläft aufhalten?
 Ja Nein

D) Darf oder durfte sich ein Hund im Bett Ihres Kindes aufhalten?
 Ja Nein

43. Hat Ihr Kind sonst regelmäßig (ca. 1x/Woche) Kontakt zu folgenden Tieren (z.B. in der Wohnung von Freunden/ Verwandten, Käfig/Stall außerhalb der Wohnung)?
 (Mehrere Antworten sind möglich)

	Zur Zeit	Im 1. oder 2. Lebensjahr
Hund.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Katze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pferde.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Es folgen Fragen zum Rauchverhalten

44. Haben Sie und Ihre Familie in den letzten 3 Jahren mit dem Rauchen in der Wohnung aufgehört bzw. das Rauchen innerhalb der Wohnräume eingeschränkt?

Ja

Nein

Es wurde nie geraucht => weiter mit Frage 46!

45. Wie viele Zigaretten werden durchschnittlich am Tag in Ihrer Wohnung (damit meinen wir auch die Küche) geraucht? Zigaretten, die auf dem Balkon oder der Terrasse geraucht werden, brauchen nicht mitgezählt zu werden.

Wie viele davon von... (keine=0)

Mutter	_____	pro Tag
Partner	_____	pro Tag
Andere Personen	_____	pro Tag
Insgesamt	_____	pro Tag

46. A) Wie viele jüngere Geschwister hat Ihr Kind?
Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben!

Schwestern.....Stiefschwestern.....
Brüder.....Stiefbrüder.....

B) Wie viele ältere Geschwister hat Ihr Kind?
Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben!

Schwestern.....Stiefschwestern.....
Brüder.....Stiefbrüder.....

47. Bitte notieren Sie Name und Geburtsdatum der Geschwister Ihres Kindes.
Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben!

Name	Mädchen	Junge	Geburtsdatum
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___

48. Wird Ihr Kind regelmäßig zusammen mit anderen Kindern betreut (z.B. durch eine Tagesmutter, in einer Kinderkrippe oder bei den Großeltern)? Die eigenen Geschwister sind dabei nicht gemeint.

Ja Mit wie vielen anderen Kindern? _____

Nein

**49. Falls Sie andere Kinder haben:
Leidet eines oder mehrere Kinder unter einer der folgenden Erkrankungen, die von einem Arzt diagnostiziert wurden:**

	Ja	Nein
Asthma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Heuschnupfen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neurodermitis(atopisches Ekzem, atopische Dermatitis)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

50. Sind Sie in den letzten 3 Jahren (d.h. seit das Kind geboren wurde) umgezogen?

Ja ⇒ **Bitte neue Adresse mitteilen!**

Nein

Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

Studienleitung:

Prof. Dr. med. Erika von Mutius

Studienärztin:

PD Dr. med. Bianca Schaub

Dr. von Haunersches Kinderspital
Lindwurmstr. 4
80337 München

Tel: 089/5160-7856 (Büro)
089/5160-7781 (Labor)

Haben Sie noch weitere Kommentare zum Fragebogen oder allgemein?

Wir danken Ihnen herzlich für das Ausfüllen des Fragebogens!



8.4 Fragebogen zum 6. Lebensjahr



ID:



PAULCHEN

Fragebogen zum **6. Lebensjahr**

Ihres Kindes

München, 03.08.2010

Datum: _____

Studiennummer: _____

Fragebogen für die Eltern

Wir freuen uns, dass Sie bereit sind weiterhin an der Paulchen Studie teilzunehmen. Bitte kreuzen Sie die folgenden Fragen an. Ihre Antworten werden vertraulich behandelt. Wenn Sie eine Frage nicht beantworten möchten, lassen Sie sie bitte aus.

Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Mitarbeit!

<p>Wir beginnen mit Fragen zu pfeifenden und keuchenden Atemgeräuschen. Mit pfeifenden Atemgeräuschen meinen wir ein pfeifendes Geräusch, das aus dem Brustkorb kommt, aber nicht geräuschvolles Atmen durch die Nase.</p>	
<p>1. Hat Ihr Kind <u>jemals pfeifende bzw. keuchende Atemgeräusche</u> gehabt?</p>	<p>Ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>Falls Ja, wann sind diese zum ersten Mal aufgetreten:</p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/>... <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 12</p>
<p>2. Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 3 Jahren</u> pfeifende bzw. keuchende Atemgeräusche?</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/></p> <p>Nein <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 12</p>
<p>3. Wie oft hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> pfeifende bzw. keuchende Atemgeräusche?</p>	<p>Gar nicht..... <input type="checkbox"/></p> <p>1-3 mal..... <input type="checkbox"/></p> <p>4-12mal..... <input type="checkbox"/></p> <p>Mehr als 12 mal..... <input type="checkbox"/></p>
<p>4. Hatte Ihr Kind in den letzten <u>12 Monaten</u> jemals <u>Atemnot</u>, als die pfeifenden/ keuchenden Atemgeräusche auftraten?</p>	<p>Ja <input type="checkbox"/></p> <p>Nein <input type="checkbox"/></p>

5. Wie häufig ist Ihr Kind in den letzten 12 Monaten nachts wegen pfeifender oder keuchender Atemgeräusche aufgewacht?

Seltener als einmal pro Monat.....

Einmal pro Monat.....

Mindestens zweimal pro Monat.....

6. Wodurch wurden bei Ihrem Kind die pfeifenden / keuchenden Atemgeräusche ausgelöst?

	Ja	Nein
Anstrengung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Erkältung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Tieren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Hausstaub.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Gras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7. Wie häufig hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Nie.....

Seltener als einmal pro Monat.....

Einmal pro Monat.....

Mindestens zweimal pro Monat.....

8. Ist das Kind zwischen diesen Episoden völlig beschwerdefrei?

Ja..... => weiter mit Frage 12

Nein.....

9. Hat Ihr Kind zwischen diesen Episoden folgende Beschwerden bei Anstrengung?

	Ja	Nein
Husten.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pfeifende Atemgeräusche.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atemnot	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges:_____		

Bei Temperaturwechsel/Nebel?	
	Ja Nein
Husten.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Pfeifende Atemgeräusche.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Atemnot	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____	
Nachts?	
	Ja Nein
Husten.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Pfeifende Atemgeräusche.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Atemnot	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____	
Sonstige Beschwerden?	
: _____	
10.	Hat Ihr Kind jemals <u>in den letzten 3 Jahren</u> von einem Arzt Medikamente gegen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, oder Giemen oder Atemnot verschrieben bekommen?
	<i>(Gemeint sind damit nicht nur Medikamente zum Schlucken, sondern auch Inhalationen oder Sprays)</i>
Ja <input type="checkbox"/>
Nein <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 12
11.	Welche Medikamente waren dies?
	<i>Bitte geben Sie den Markennamen möglichst genau an! Und sofern Sie es wissen die Dosis sowie den Zeitraum, in dem das Medikament eingenommen wurde.</i>
1.	_____
2.	_____
3.	_____

<p>12. Wurde bei Ihrem Kind jemals von einem Arzt ein Allergietest durchgeführt?</p>	
	Ja Nein
Ein Hauttest	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Ein Bluttest	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Ein anderer Test, z.B. Bioresonanz	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<p>13. Welche Allergie wurde dabei festgestellt?</p>	
	Ja Nein
Gegen Pollen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Gegen Hausstaub(milben)	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Gegen Tiere.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Gegen Nahrungsmittel	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Andere:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<p>14. Hat Ihr Kind jemals <u>in den letzten 3 Jahren</u> von einem Arzt Medikamente aus einem anderen Grund verschrieben bekommen? <i>(Gemeint sind damit nicht nur Medikamente zum Schlucken, sondern auch Inhalationen oder Sprays)</i></p>	
Ja <input type="checkbox"/>
Nein <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 16
<p>15. Welche Medikamente waren dies? <i>Bitte geben Sie den Markennamen möglichst genau an! Und sofern Sie es wissen die Dosis sowie den Zeitraum in dem das Medikament eingenommen wurde.</i></p>	
1.
2.
3.

Es folgen Fragen zu Beschwerden der Nase und der Augen

16. Hat Ihr Kind jemals Niesanfalle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war?

Ja

Falls Ja, wann ist dies zum ersten Mal aufgetreten:

Nein ⇒ weiter mit Frage 21

17. Hatte Ihr Kind in den letzten 3 Jahren Niesanfalle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war?

Ja

Nein ⇒ weiter mit Frage 21

18. Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten gleichzeitig mit diesen Nasenbeschwerden juckende oder tränende Augen?

Ja

Nein

19. Wann in den letzten 12 Monaten traten diese Nasen-Beschwerden auf?

Mehrere Antworten sind möglich.

Januar Mai September

Februar Juni Oktober

März Juli November

Apri August Dezember

20. Ist von einem Arzt bei Ihrem Kind schon einmal Heuschnupfen oder eine allergische Rhinitis bzw. Rhinokonjunktivitis festgestellt worden?

Ja

Nein

Es folgen Fragen zu Hauterkrankungen

21. Hatte Ihr Kind jemals eine Neurodermitis/atopische Dermatitis/ atopisches Ekzem

Ja

Falls Ja, wann ist diese zum ersten Mal aufgetreten: _____

Nein ⇒ weiter mit Frage 31

22.	Wurde bei Ihrem Kind die Diagnose einer Neurodermitis/atopischen Dermatitis/ atopisches Ekzem von einem Arzt gestellt?	
	Ja	<input type="checkbox"/>
	Nein	<input type="checkbox"/>
23.	Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 3 Jahren</u> eine Neurodermitis/atopische Dermatitis/ atopisches Ekzem	
	Ja	<input type="checkbox"/>
	Nein	<input type="checkbox"/>
24.	War der Hautausschlag je an einer der folgenden Stellen?	
		Ja Nein
	Gesicht.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Hals	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Ellenbeugen / Kniekehlen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Hand- / Fußgelenke.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Brust/Rücken.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
25.	Hat sich die Lokalisation des Ausschlages im Laufe der Zeit geändert?	
	Ja.....	<input type="checkbox"/> Nein..... <input type="checkbox"/>
	Falls Ja, wo war er zu Beginn? Wo befindet er sich heute?	
	Zu Beginn:	
		Ja Nein
	Gesicht.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Hals	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Ellenbeugen / Kniekehlen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Hand- / Fußgelenke.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Brust/Rücken.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Heute:	
		Ja Nein
	Gesicht.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Hals	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Ellenbeugen / Kniekehlen	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Hand- / Fußgelenke.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Brust/Rücken.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

<p>26. Wenn Sie die Zeiten, in denen Ihr Kind diesen Hautausschlag hatte, zusammenzählen: Wie lange haben Sie diesen Hautausschlag insgesamt beobachtet?</p> <p>Für insgesamt weniger als 3 Monate.... <input type="checkbox"/></p> <p>Für insgesamt 3-6 Monate..... <input type="checkbox"/></p> <p>Für insgesamt 6-12 Monate <input type="checkbox"/></p> <p>Für länger als 12 Monate <input type="checkbox"/></p>
<p>27. Ist der Hautausschlag wieder völlig verschwunden, oder „kommt und geht“ der Hautausschlag?</p> <p>Der Hautausschlag ist vollständig Verschwunden <input type="checkbox"/></p> <p>Der Hautausschlag „kommt und geht“ . <input type="checkbox"/></p> <p>Der Hautausschlag ist noch da..... <input type="checkbox"/></p>
<p>28. Wie alt war Ihr Kind, als der Hautausschlag vollständig verschwunden ist?</p> <p style="text-align: right;">_____ Monate</p>
<p>29. Wie häufig ist Ihr Kind <u>nachts</u> wegen Juckreiz aufgewacht?</p> <p>Seltener als einmal pro Monat oder nie..... <input type="checkbox"/></p> <p>Einmal pro Monat..... <input type="checkbox"/></p> <p>Mindestens zweimal pro Monat..... <input type="checkbox"/></p>
<p>30. Haben Sie die Haut Ihres Kindes <u>in den letzten 12 Monaten</u> mit einer cortisonhaltigen Creme / Salbe oder einer Tacrolimus- bzw. Pimecrolimus-haltigen Salbe (Protopic, Elidel) behandelt?</p> <p style="text-align: right;">Ja <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">Nein <input type="checkbox"/></p>

Es folgen Fragen zu Nahrungsunverträglichkeiten oder –allergien

<p>31. Hat Ihr Kind eine Nahrungsmittelallergie?</p> <p style="text-align: right;">Ja <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">Nein <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 34</p>

32. Wie äußert sich diese Nahrungsmittelallergie?

- Ausschlag/rote Flecken um den Mund herum.....
- Ausschlag/rote Flecken an anderen Körperstellen
- Schwellung der Lippen
- Juckreiz
- Durchfall
- Erbrechen.....
- Verschlechterung der Neurodermitis
- Pfeifende Atemgeräusche
- Atemnot
- Kreislaufreaktion/Blutdruckabfall
- Sonstiges:

33. Auf welche Nahrungsmittel reagiert Ihr Kind?

Ja Nein

- Milch und Milchprodukte
- Hühnereier
- Fisch.....
- Weizenmehl oder andere Getreideprodukte.....
- Nüsse.....
- Soja
- Zitrusfrüchte
- Anderes Obst oder Gemüse
- Andere Nahrungsmittel

Welche? _____

Es folgen Fragen zu anderen Erkrankungen		
34. Wurde bei Ihrem Kind jemals <u>von einem Arzt/einer Ärztin</u> eine spastische Bronchitis, obstruktive Bronchitis oder asthmatische Bronchitis diagnostiziert?		
Nein, nie	<input type="checkbox"/>	
Ja, einmal.....	<input type="checkbox"/>	
Ja, mehrmals	<input type="checkbox"/>	
35. Wurde bei Ihrem Kind in den letzten 12 Monaten <u>von einem Arzt/einer Ärztin</u> eine der folgenden Diagnosen gestellt?		
	Ja	Nein
Asthma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neurodermitis, atopische Dermatitis oder endogenes Ekzem.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Allergische Rhinitis/Heuschnupfen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36. Hatte Ihr Kind bisher eine der folgenden Erkrankungen <u>nach dem dritten Lebensjahr</u>?		
	Ja	Nein
Mittelohrentzündung.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pseudokrupp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lungenentzündung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bronchitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bronchiolitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Keuchhusten.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere Infektionen.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche?		
Waren stationäre Aufenthalte im Krankenhaus notwendig....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Warum?		
.....		

Angaben zur Wohnungs- und Lebenssituation																			
<p>37. A) Wie viele <u>jüngere</u> Geschwister hat Ihr Kind? Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben! Schwestern..... Brüder.....</p> <p>B) Wie viele <u>ältere</u> Geschwister hat Ihr Kind? Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben! Schwestern.....Brüder.....</p>																			
<p>38. Bitte notieren Sie Name und Geburtsdatum der Geschwister Ihres Kindes. Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben!</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Name</th> <th style="text-align: center;">Mädchen</th> <th style="text-align: center;">Junge</th> <th style="text-align: left;">Geburtsdatum</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>_____</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>___/___/___</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>___/___/___</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>___/___/___</td> </tr> </tbody> </table>				Name	Mädchen	Junge	Geburtsdatum	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___
Name	Mädchen	Junge	Geburtsdatum																
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___																
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___																
_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___																
<p>39. Wird Ihr Kind <u>regelmäßig</u> zusammen mit anderen Kindern durch eine Tagesmutter oder bei den Großeltern betreut? Die eigenen Geschwister sind dabei nicht gemeint.</p> <p style="text-align: right;">Ja, <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">Mit wie vielen anderen Kindern: _____</p> <p style="text-align: right;">Nein..... <input type="checkbox"/></p>																			
<p>40. Wird Ihr Kind <u>regelmäßig</u> zusammen mit anderen Kindern in einer Kinderkrippe oder im Kindergarten betreut? Die eigenen Geschwister sind dabei nicht gemeint.</p> <p style="text-align: right;">Ja, <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">Mit wie vielen anderen Kindern? _____</p> <p style="text-align: right;">Nein <input type="checkbox"/></p>																			

<p>Anderes Futter in pelletierter Form <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Kraftfutter bzw. Milchleistungsfutter <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Sonstiges: _____</p>
<p>48. Wie häufig war Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> im Stall? (Gemeint sind Ställe von Großvieh, d.h. Kühe, Schweine, Pferde, Schafe, Ziegen).</p> <p>Gar nicht <input type="checkbox"/></p> <p>Seltener als einmal pro Woche..... <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 40px;">Durchschnitt _____ Stunden pro Monat</p> <p>Mindestens einmal pro Woche <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 40px;">Durchschnitt _____ Tage pro Monat</p> <p style="padding-left: 40px;">An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag</p>
<p>49. Wie häufig war Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> in der Scheune?</p> <p>Gar nicht <input type="checkbox"/></p> <p>Seltener als einmal pro Woche..... <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 40px;">Durchschnitt _____ Stunden pro Monat</p> <p>Mindestens einmal pro Woche <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 40px;">Durchschnitt _____ Tage pro Monat</p> <p style="padding-left: 40px;">An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag</p>
<p>50. Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> regelmäßig direkten Kontakt zu Heu? (Regelmäßig bedeutet mindestens einmal pro Woche)</p> <p style="padding-left: 40px;">Ja <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 40px;">Nein <input type="checkbox"/></p>
<p>51. In welchem Alter wurde Ihr Kind zum ersten Mal mit zur Heuernte genommen?</p> <p>Mit _____ Jahren <input type="checkbox"/></p> <p>Noch nie</p>

52. Wie häufig hatte Ihr Kind im Durchschnitt in den letzten 12 Monaten Kontakt zu folgenden Nutztieren?				
	Nie oder ≤ 1/Monat	mehrmals pro Monat	mehrmals pro Woche	täglich
Pferde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kühe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schweine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schafe/Ziegen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hasen/Kaninchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Geflügel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
53. Welche der folgenden Haustiere haben/hatten Sie innerhalb der Wohnung? Mehrere Antworten sind möglich.				
Keine	<input type="checkbox"/>	Kaninchen	<input type="checkbox"/>	
Hund	<input type="checkbox"/>	Meerschweinchen	<input type="checkbox"/>	
Katze	<input type="checkbox"/>	Vögel	<input type="checkbox"/>	
Hamster	<input type="checkbox"/>	Aquarium (Fische)	<input type="checkbox"/>	
Sonstige <input type="checkbox"/>	Welche: -----			
A) Darf oder durfte sich eine Katze <u>im Zimmer</u>, in dem Ihr Kind schläft aufhalten?				
Ja	<input type="checkbox"/>			
Nein	<input type="checkbox"/>			
B) Darf oder durfte sich eine Katze <u>im Bett</u> Ihres Kindes aufhalten?				
Ja	<input type="checkbox"/>			
Nein	<input type="checkbox"/>			
C) Darf oder durfte sich ein Hund <u>im Zimmer</u>, in dem Ihr Kind schläft aufhalten?				
Ja	<input type="checkbox"/>			
Nein	<input type="checkbox"/>			
D) Darf oder durfte sich ein Hund <u>im Bett</u> Ihres Kindes aufhalten?				
Ja	<input type="checkbox"/>			
Nein	<input type="checkbox"/>			

54. Hat Ihr Kind sonst regelmäßig (ca. 1x/Woche) Kontakt zu Tieren (z.B. in der Wohnung von Freunden/ Verwandten)? Mehrere Antworten sind möglich.		
	Ja	Nein
Hund	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Katze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstige	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche:		
55. Gibt es in Ihrer Wohnung Feuchtigkeitsflecken bzw. Schimmelbefall an Wänden oder Decken?		
<i>Feuchtigkeitsflecken in Bad oder Küche sind dabei nicht gemeint, sondern nur in Räumen wie Wohnzimmer, Schlafzimmer oder Kinderzimmer.</i>		
	Ja	Nein
Feuchtigkeitsflecken, aber <u>ohne</u> Schimmelbefall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Ja	Nein
Feuchtigkeitsflecken mit Schimmelbefall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Es folgen Fragen zum Rauchverhalten	
56. Rauchen Sie oder Ihre Familie in Ihrer Wohnung/Haus?	
Ja	<input type="checkbox"/>
Nein	<input type="checkbox"/>
57. Haben Sie und Ihre Familie <u>in den letzten 12 Monaten</u> mit dem Rauchen in der Wohnung aufgehört bzw. das Rauchen innerhalb der Wohnräume eingeschränkt?	
Ja	<input type="checkbox"/>
Nein	<input type="checkbox"/>
Es wurde nie geraucht	<input type="checkbox"/>

58. Wie viele Zigaretten werden durchschnittlich am Tag in Ihrer Wohnung (damit meinen wir auch die Küche) geraucht? Zigaretten, die auf dem Balkon oder der Terrasse geraucht werden, brauchen nicht mitgezählt zu werden. Wie viele davon von... (keine=0)

Mutter	_____	pro Tag
Partner	_____	pro Tag
Andere Personen	_____	pro Tag
Insgesamt	_____	pro Tag

Haben Sie noch weitere Kommentare zum Fragebogen oder allgemein?

Wir danken Ihnen herzlich für das Ausfüllen des Fragebogens!

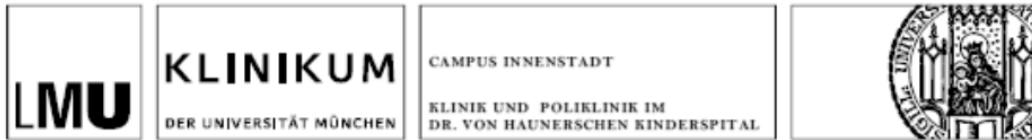


Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

Studienleitung:

PD Dr. med. Bianca Schaub, i.A. Fr. Isolde Schleich
 Dr. von Haunersches Kinderspital
 Lindwurmstr. 4
 80337 München
 Tel: 089/ 5160-7781

8.5 Fragebogen zum 10. Lebensjahr



ID:



PAULCHEN

Fragebogen zum **10. Lebensjahr**

Ihres Kindes

München, 10.07.2015

Datum: _____

Studiennummer: _____

Fragebogen für die Eltern

Wir freuen uns, dass Sie bereit sind, weiterhin an der Paulchen-Studie teilzunehmen. Bitte kreuzen Sie die folgenden Fragen an. Ihre Antworten werden vertraulich behandelt. Wenn Sie eine Frage nicht beantworten möchten, lassen Sie diese bitte aus.

Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Mitarbeit!

Wir beginnen mit Fragen zu pfeifenden und keuchenden Atemgeräuschen. Mit pfeifenden Atemgeräuschen meinen wir ein pfeifendes Geräusch, das aus dem Brustkorb kommt, aber nicht geräuschvolles Atmen durch die Nase.

1. Hatte Ihr Kind jemals pfeifende bzw. keuchende Atemgeräusche?

Ja

Falls Ja,

wann sind diese zum ersten Mal aufgetreten: _____

Nein.....

2. Wie oft hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten pfeifende bzw. keuchende Atemgeräusche?

Gar nicht

1-3 mal

4-12mal.....

Mehr als 12 mal.....

3. Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten jemals Atemnot, als die pfeifenden/ keuchenden Atemgeräusche auftraten?

Ja

Nein

4. Wie häufig ist Ihr Kind in den letzten 12 Monaten nachts wegen pfeifender oder keuchender Atemgeräusche aufgewacht?

Seltener als einmal pro Monat

Einmal pro Monat

Mindestens zweimal pro Monat.....

5. Wodurch wurden bei Ihrem Kind die pfeifenden / keuchenden Atemgeräusche ausgelöst?

	Ja	Nein
Anstrengung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Erkältung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Tieren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Hausstaub	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontakt mit Gras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6. Wie häufig hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Nie.....
 Seltener als einmal pro Monat.....
 Einmal pro Monat

Mindestens zweimal pro Monat.....

7. Ist Ihr Kind zwischen diesen Episoden völlig beschwerdefrei?

Ja..... => weiter mit Frage 15
 Nein.....

8. Hat Ihr Kind zwischen diesen Episoden folgende Beschwerden:

Bei Anstrengung?

	Ja	Nein
Husten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pfeifende Atemgeräusche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atemnot	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____		

Bei Temperaturwechsel/Nebel?

	Ja	Nein
Husten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pfeifende Atemgeräusche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atemnot	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____		

Nachts?	
	Ja Nein
Husten	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Pfeifende Atemgeräusche	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Atemnot	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____	
Sonstige Beschwerden? _____	
9. Hatte Ihr Kind <u>seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren</u> pfeifende oder keuchende Atemgeräusche?	
Ja	<input type="checkbox"/>
Nein.....	<input type="checkbox"/> => weiter mit Frage 15
10. War Ihr Kind <u>seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren</u> zwischen den Episoden pfeifender oder keuchender Atmung völlig beschwerdefrei?	
Ja	<input type="checkbox"/>
Nein.....	<input type="checkbox"/> => weiter mit Frage 12
11. Hatte Ihr Kind <u>seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren</u> zwischen diesen Episoden folgende Symptome...	
	Ja Nein
Husten nachts	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Husten bei Anstrengung.....	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Atemnot nachts	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Atemnot bei Anstrengung	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
12. Hatte Ihr Kind <u>seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren</u> pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?	
Ja	<input type="checkbox"/>
Nein.....	<input type="checkbox"/> => weiter mit Frage 15

13. Hatte Ihr Kind seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren nachts pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Ja

Nein.....

14. Hatte Ihr Kind seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren durch Aufregung oder körperliche Aktivität (z.B. Rennen, Toben) pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Ja

Nein.....

15. Hat Ihr Kind seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren von einem Arzt / einer Ärztin Medikamente gegen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, Giemen, Atemnot oder gegen allergische Reaktionen verschrieben bekommen?
(Gemeint sind damit nicht nur Medikamente zum Schlucken, sondern auch Inhalationen oder Sprays)

Ja.....

Nein..... ⇒ weiter mit Frage 18

16. Welche Medikamente waren dies?
Bitte geben Sie den Namen, die Dosis und den Zeitraum, in dem das Medikament eingenommen wurde, an.

Nahm ihr Kind in den letzten 12 Monaten dieses Medikament für insgesamt mindestens 2 Monate ein?

	Ja	Nein
1. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

17. Erhält Ihr Kind solche Medikamente gegen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche
 nur bei besonders schweren Phasen solcher Atemgeräusche.....
 in (fast) jeder Phase pfeifender oder keuchender Atemgeräusche.....
 sowohl während akuter Phasen als auch vorbeugend.....

18. Wurde bei Ihrem Kind jemals von einem Arzt / einer Ärztin ein Allergietest durchgeführt?

	Ja	Nein
Ein Hauttest.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ein Bluttest.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ein anderer Test, z.B. Bioresonanz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

19. Welche Allergie wurde dabei festgestellt?

	Ja	Nein
Gegen Pollen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gegen Hausstaub(-milben).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gegen Tiere	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gegen Nahrungsmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

20. Wird bei Ihrem Kind eine Hyposensibilisierung durchgeführt?
 Ja Nein

Falls Ja,
wann wurde die Therapie begonnen: _____

Wogegen wird hyposensibilisiert?

	Ja	Nein
Gegen Hausstaubmilben	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gegen Bäume	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gegen Gräser.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Art der Therapie

	Ja	Nein
Spritzen (SCIT)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tablette (SLIT)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

21.	<p>Hat Ihr Kind <u>seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren</u> von einem Arzt Medikamente aus einem anderen Grund verschrieben bekommen?</p> <p><i>(Gemeint sind damit nicht nur Medikamente zum Schlucken, sondern auch Inhalationen oder Sprays)</i></p> <p>Ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 23</p>
22.	<p>Welche Medikamente waren dies?</p> <p><i>Bitte geben Sie den Namen, die Dosis und den Zeitraum, in dem das Medikament eingenommen wurde, an.</i></p> <p>1. _____</p> <p>2. _____</p> <p>3. _____</p>

Es folgen Fragen zu Beschwerden der Nase und der Augen													
23.	<p>Hat Ihr Kind <u>jemals</u> Niesanfalle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es <u>nicht</u> erkältet war?</p> <p>Ja..... <input type="checkbox"/></p> <p>Falls Ja, wann ist dies zum ersten Mal aufgetreten: _____</p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/> ⇒ weiter mit Frage 27</p>												
24.	<p>Hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> gleichzeitig mit diesen Nasenbeschwerden juckende oder tränende Augen?</p> <p>Ja <input type="checkbox"/></p> <p>Nein..... <input type="checkbox"/></p>												
25.	<p>Wann <u>in den letzten 12 Monaten</u> traten diese Nasen-Beschwerden auf?</p> <p><i>Mehrere Antworten sind möglich.</i></p> <p>Ganzjährig <input type="checkbox"/></p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">Januar <input type="checkbox"/></td> <td style="width: 33%;">Mai..... <input type="checkbox"/></td> <td style="width: 33%;">September <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Februar..... <input type="checkbox"/></td> <td>Juni..... <input type="checkbox"/></td> <td>Oktober <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Marz <input type="checkbox"/></td> <td>Juli..... <input type="checkbox"/></td> <td>November..... <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>April..... <input type="checkbox"/></td> <td>August... <input type="checkbox"/></td> <td>Dezember..... <input type="checkbox"/></td> </tr> </table>	Januar <input type="checkbox"/>	Mai..... <input type="checkbox"/>	September <input type="checkbox"/>	Februar..... <input type="checkbox"/>	Juni..... <input type="checkbox"/>	Oktober <input type="checkbox"/>	Marz <input type="checkbox"/>	Juli..... <input type="checkbox"/>	November..... <input type="checkbox"/>	April..... <input type="checkbox"/>	August... <input type="checkbox"/>	Dezember..... <input type="checkbox"/>
Januar <input type="checkbox"/>	Mai..... <input type="checkbox"/>	September <input type="checkbox"/>											
Februar..... <input type="checkbox"/>	Juni..... <input type="checkbox"/>	Oktober <input type="checkbox"/>											
März <input type="checkbox"/>	Juli..... <input type="checkbox"/>	November..... <input type="checkbox"/>											
April..... <input type="checkbox"/>	August... <input type="checkbox"/>	Dezember..... <input type="checkbox"/>											

26. Hatte Ihr Kind seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren Niesanfalle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war?

Ja.....

Nein..... ⇒ weiter mit Frage 27

27. Ist von einem Arzt bei Ihrem Kind schon einmal Heuschnupfen oder eine allergische Rhinitis bzw. Rhinokonjunktivitis festgestellt worden?

Ja

Nein.....

Es folgen Fragen zu Hauterkrankungen

28. Hatte Ihr Kind jemals eine Neurodermitis/atopische Dermatitis/ atopisches Ekzem

Ja

Falls Ja, wann ist dies zum ersten Mal aufgetreten: _____

Nein..... ⇒ weiter mit Frage 32

29. Hatte Ihr Kind seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren eine Neurodermitis/atopische Dermatitis/ atopisches Ekzem

Ja

Nein

30. War der Hautausschlag seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren an einer der folgenden Stellen?

	Ja	Nein
Gesicht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hals	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ellenbeugen / Kniekehlen.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hand- / Fußgelenke	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brust/Rücken.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

31. Haben Sie die Haut Ihres Kindes seit der letzten Befragung im Alter

von 6 Jahren mit einer cortisonhaltigen Creme / Salbe oder einer Tacrolimus- bzw. Pimecrolimus-haltigen Salbe (Protopic, Elidel) behandelt?

Ja

Nein

32. Wurde bei Ihrem Kind jemals die Diagnose einer Neurodermitis/ atopischen Dermatitis/ atopisches Ekzem von einem Arzt / einer Ärztin gestellt?

Ja

Nein

Es folgen Fragen zu Nahrungsunverträglichkeiten oder -allergien

33. Hat Ihr Kind eine Nahrungsmittelallergie?

Ja

Nein ⇒ weiter mit Frage 36

34. Wie äußert sich diese Nahrungsmittelallergie?

Ausschlag/rote Flecken um den Mund herum

Ausschlag/rote Flecken an anderen Körperstellen

Schwellung der Lippen

Juckreiz

Durchfall

Erbrechen

Verschlechterung der Neurodermitis

Pfeifende Atemgeräusche

Atemnot

Kreislaufreaktion/Blutdruckabfall

Sonstiges: _____

35. Auf welche Nahrungsmittel reagiert Ihr Kind?

	Ja	Nein
Milch und Milchprodukte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hühnereier	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Fisch.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Weizenmehl oder andere Getreideprodukte.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nüsse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Soja.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zitrusfrüchte.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderes Obst oder Gemüse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderer Nahrungsmittel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche? _____			

Es folgen Fragen zu anderen Erkrankungen		
36. Wurde bei Ihrem Kind jemals <u>von einem Arzt/einer Ärztin</u> eine spastische Bronchitis, obstruktive Bronchitis oder asthmatische Bronchitis diagnostiziert?		
Nein, nie.....	<input type="checkbox"/>	
Ja, einmal.....	<input type="checkbox"/>	
Ja, mehrmals.....	<input type="checkbox"/>	
37. Wurde bei Ihrem Kind <u>seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren</u> von einem Arzt/einer Ärztin eine spastische Bronchitis, obstruktive Bronchitis oder asthmatische Bronchitis diagnostiziert?		
Nein, nie.....	<input type="checkbox"/>	
Ja, einmal.....	<input type="checkbox"/>	
Ja, mehrmals.....	<input type="checkbox"/>	
38. Wurde bei Ihrem Kind in den letzten 12 Monaten <u>von einem Arzt/einer Ärztin</u> eine der folgenden Diagnosen gestellt?		
	Ja	Nein
Asthma.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Neurodermitis, atopische Dermatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Allergische Rhinitis/Heuschnupfen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

39. Hatte Ihr Kind seit der letzten Befragung im Alter von 6 Jahren eine der folgenden Erkrankungen?

	Ja	Nein
Mittelohrentzündung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lungenentzündung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bronchitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Keuchhusten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere Infektionen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche? _____		
Waren stationäre Aufenthalte im Krankenhaus notwendig? ..	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Warum? _____		

Angaben zur Wohnungs- und Lebenssituation

40. A) Wie viele jüngere Geschwister hat Ihr Kind?

Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben!

Schwestern..... Brüder.....

B) Wie viele ältere Geschwister hat Ihr Kind?

Bitte auch Stiefgeschwister mitzählen, die in Ihrer Familie leben!

Schwestern.....Brüder.....

41. Wird Ihr Kind regelmäßig zusammen mit anderen Kindern in einem Hort / Nachmittagsbetreuung betreut?

Ja

Mit wie vielen anderen Kindern? _____

Nein.....

42. Hat Ihr Kind in den letzten 4 Jahren Frischmilch direkt vom Bauernhof getrunken?

Ja

Nein

⇒ weiter mit Frage 45

43. Wie viele Gläser Frischmilch hat Ihr Kind durchschnittlich in den letzten 12 Monaten getrunken? (Ein Glas entspricht etwa 0,2 Liter)

Gläser pro Tag: _____

44. Kochen Sie Ihre Milch normalerweise vor dem Trinken ab?

- Ja, aber nur während der Sommermonate.....
- Ja, immer.....
- Nein.....

44a. Wie häufig trank Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Milch direkt vom Bauernhof, die weder abgekocht noch abgerahmt war?

- Nie
- Seltener als einmal pro Woche
- 1-6 Mal pro Woche.....
- Mindestens einmal pro Tag.....

44b. Wie häufig trank Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Milch direkt vom Bauernhof, die zwar abgekocht aber nicht abgerahmt war?

- Nie
- Seltener als einmal pro Woche
- 1-6 Mal pro Woche.....
- Mindestens einmal pro Tag.....

44c. Wie häufig trank Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Milch direkt vom Bauernhof, die zwar abgerahmt aber nicht abgekocht war?

- Nie
- Seltener als einmal pro Woche
- 1-6 Mal pro Woche.....
- Mindestens einmal pro Tag.....

44d. Wie häufig trank Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Milch direkt vom Bauernhof, die abgekocht und abgerahmt war?

- Nie
- Seltener als einmal pro Woche
- 1-6 Mal pro Woche.....
- Mindestens einmal pro Tag.....

45. Hat Ihre Familie in den letzten 4 Jahren auf einem Bauernhof gelebt auf dem Vieh gehalten wird?

Ja

Nein ⇒ weiter mit Frage 56

46. Bewirtschaftete Ihre Familie den Hof in den letzten 4 Jahren?

Ja

Nein ⇒ weiter mit Frage 56

47. Welche Nutztiere werden gehalten und in welcher Zahl?

Milchkühe _____(Anzahl)

Schweine _____(Anzahl)

Geflügel (Hühner, Puten, Enten, Gänse, etc.) _____(Anzahl)

Pferde (Ponys, Esel) _____(Anzahl)

Schafe/Ziegen _____(Anzahl)

Hasen/Kaninchen _____(Anzahl)

48. Welches Futter erhalten die Tiere?

	Ja	Nein
Heu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grassilage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Maissilage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere Silage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grascops	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderes Futter in pelletierter Form	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kraftfutter bzw. Milchleistungsfutter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstiges: _____		

49. Wie häufig war Ihr Kind in den letzten 12 Monaten im Stall? (Gemeint sind Ställe von Großvieh, d.h. Kühe, Schweine, Pferde, Schafe, Ziegen).

Gar nicht

Seltener als einmal pro Woche

Durchschnitt _____ Stunden pro Monat

Mindestens einmal pro Woche

Durchschnitt _____ Tage pro Monat

An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag

50. Wie häufig war Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> in der Scheune?	
Gar nicht	<input type="checkbox"/>
Seltener als einmal pro Woche	<input type="checkbox"/>
Durchschnitt _____ Stunden pro Monat	
Mindestens einmal pro Woche	<input type="checkbox"/>
Durchschnitt _____ Tage pro Monat	
An diesen Tagen durchschnittlich _____ Stunden pro Tag	
51. Wie häufig hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> Kontakt mit <u>Stroh</u>?	
Nie/fast nie	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Monat	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Woche	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Tag, bis zu 15 Minuten	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Tag, mehr als 15 Minuten	<input type="checkbox"/>
52. Wie häufig hatte Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> Kontakt mit <u>Heu</u>?	
Nie/fast nie	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Monat	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Woche	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Tag, bis zu 15 Minuten	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Tag, mehr als 15 Minuten	<input type="checkbox"/>
53. Wie häufig war Ihr Kind <u>in den letzten 12 Monaten</u> dabei, während die <u>Erwachsenen mit gelagertem Heu hantierten</u> (z.B. Umlagern, Verfüttern oder Ähnliches)?	
Nie/fast nie	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Monat	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Woche	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Tag, bis zu 15 Minuten	<input type="checkbox"/>
Etwa einmal pro Tag, mehr als 15 Minuten	<input type="checkbox"/>
54. Wird Ihr Kind regelmäßig mit zur Heuernte genommen?	
Ja	<input type="checkbox"/>
Nein	<input type="checkbox"/>

55. Wie häufig hatte Ihr Kind im Durchschnitt <u>in den letzten 12 Monaten</u> Kontakt zu folgenden Nutztieren?					
	Nie	etwa einmal pro Monat	etwa einmal pro Woche	etwa einmal pro Tag bis zu 15 Minuten	etwa einmal pro Tag mehr als 15 Minuten
Pferde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kühe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schweine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schafe/Ziegen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hasen/Kaninchen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Geflügel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

56. Welche der folgenden Haustiere haben/hatten Sie innerhalb der Wohnung? Mehrere Antworten sind möglich.

Keine

Hund

Katze

Sonstige Welche: _____

A) Darf oder durfte sich eine Katze im Zimmer, in dem Ihr Kind schläft aufhalten?

Ja

Nein

B) Darf oder durfte sich eine Katze im Bett Ihres Kindes aufhalten?

Ja

Nein

C) Darf oder durfte sich ein Hund im Zimmer, in dem Ihr Kind schläft aufhalten?

Ja

Nein

D) Darf oder durfte sich ein Hund im Bett Ihres Kindes aufhalten?

Ja

Nein

57. Hat Ihr Kind sonst regelmäßig (ca. 1x/Woche) Kontakt zu Tieren (z.B. in der Wohnung von Freunden/ Verwandten)? Mehrere Antworten sind möglich.

	Ja	Nein
Hund	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Katze	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonstige	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Welche: _____		

58. Gibt es in Ihrer Wohnung Feuchtigkeitsflecken bzw. Schimmelbefall an Wänden oder Decken?

Feuchtigkeitsflecken in Bad oder Küche sind dabei nicht gemeint, sondern nur in Räumen wie Wohnzimmer, Schlafzimmer oder Kinderzimmer.

	Ja	Nein
Feuchtigkeitsflecken, aber <u>ohne</u> Schimmelbefall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Ja	Nein
Feuchtigkeitsflecken <u>mit</u> Schimmelbefall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Es folgen Fragen zum Rauchverhalten

59. Rauchen Sie oder Ihre Familie in Ihrer Wohnung/Haus?

- Ja
 Nein

60. Haben Sie und Ihre Familie in den letzten 12 Monaten mit dem Rauchen in der Wohnung aufgehört bzw. das Rauchen innerhalb der Wohnräume eingeschränkt?

- Ja
 Nein
 Es wurde nie geraucht .

61. Wie viele Zigaretten werden durchschnittlich am Tag in Ihrer Wohnung (damit meinen wir auch die Küche) geraucht? Zigaretten, die auf dem Balkon oder der Terrasse geraucht werden, brauchen nicht mitgezählt zu werden. Wie viele davon von... (keine=0)

Mutter	_____	pro Tag
Partner	_____	pro Tag
Andere Personen	_____	pro Tag
Insgesamt	_____	pro Tag

Haben Sie noch weitere Kommentare zum Fragebogen oder allgemein?

Wir danken Ihnen herzlich für das Ausfüllen des Fragebogens!



Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

Studienleitung:

Prof. Dr. med. Bianca Schaub
 Dr. von Haunersches Kinderspital
 PAULCHEN Studienteam: Fr. Isolde Schleich
 Lindwurmstr. 4
 80337 München
 Tel: 089/ 4400-5-7781
 Isolde.schleich@med.uni-muenchen.de

8.6 Spezifisches IgE

Abkürzung	Allergen
D1	Dermatophagoides pteronyssinus
D2	Dermatophagoides 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 37: Getestete Allergene im Bluttest

8.7 Protokolle

8.7.1 Zellisolation und Zellstimulation

(Durchführung bereits vor Beginn dieser Dissertation durch Mitarbeiter der AG Schaub)

1.Tag

Verwendete Reagenzien: Crushed ice, 96- Loch- Plate für Proliferation, 6- Loch für RNA

RPMI, Human serum 10%, Lyse Puffer, PBS , Ficoll, AG´s (PHA, OVA, LpA, Ppg, Derp1)

PBS und Ficoll 30 min vor der Präp. aus dem Kühlraum nehmen, Sterilbank einschalten (am besten **vor** dem Gang in die Frauenklinik schon die Reagenzien erwärmen und die Sterilbank einschalten).

Das EDTA- Blut der Mutter und des Kindes wird in der entsprechenden Kiste eingefroren (-20°C), beschriftet mit P., Datum, Mutter/ Kind

Alle sonstigen Proben werden bei -80°C eingefroren und wie angegeben beschriftet.

Blut der Mutter:

1. Das braune (Serum-) Röhrchen in der Zentrifuge in der Zellkultur zentrifugieren (1200 rpm, 10 min). Überstand (etwa 3-4 ml) in 2 Tubes pipettieren (Gefäße mit orangem Schraubdeckel), mit Studiennummer und „MS“ für Mother serum markieren (NICHT SM!) Beispiel: P1 MS
2. Diese 2 Tubes in den entsprechenden Karton in den -20°C Freezer deponieren.

Blut aus der Nabelschnur:

1. Zuerst die Probe (und die Zettel) mit der fortlaufenden Patientennummer, Datum und Zeit markieren. Für die Dokumentation nicht vergessen, die Anzahl der Zellen und das Volumen, in der die Probe vorliegt, zu notieren. Im Buch sollte dann die Abholzeit und- datum, Patientennr., PAULINA Nr. (Beginn mit P1), und Verarbeitungszeit und- datum notiert werden (am besten schon vor Beginn der Präparation alles notieren)
2. Die Deckel der Liquemin- Röhrchen entfernen, ohne mit Blut zu spritzen (einfach kurz gegen den Deckel schnippen).
3. Das Blut in ein 50 ml- Röhrchen überführen, dabei das Gesamtvolumen des Blutes mit der Pipette ermitteln und notieren.
4. Die Hälfte des abgemessenen Blutvolumens an PBS zugeben.(z.B.: 10 ml Blut+ 5 ml PBS). Mit einer 10ml- Pipette vorsichtig mischen.
5. Das Gesamtvolumen im Kopf teilen, so daß man gleiche Volumina von etwa 9 ml erhält, es kann auch etwas weniger (nicht mehr!) sein, 9 ml wären ideal. Es sollte allerdings kein Blut übrig bleiben.
6. Die entsprechende Anzahl 15ml- Tubes vorbereiten, diese mit jeweils 3 ml Ficoll füllen und **vorsichtig und langsam** mit maximal 9 ml Blut überschichten, so dass sich 2 deutlich getrennte Phasen bilden. Das Verhältnis sollte 1:3 betragen, evtl. also weniger Ficoll verwenden. Während

des Pipettierens kann es vorkommen, dass sich die Erythrozyten schon durch das Ficoll absinken. Sollte es passieren, dass sich beim Überschichten die Phasen durch zu schnelles Pipettieren mischen, dann das ganze Röhrchen nochmals mischen und neu überschichten.

7. Die Tubes in der **großen** Zentrifuge im Keller (Geräteraum) bei 1400 rcf, 20°C, 30 min mit 2 decel (Wichtig: sehr schwache Bremse, die Zentrifuge läuft sehr langsam aus, damit die Phasen sich optimal trennen und nicht wieder vermischen) zentrifugieren. NIE mit Quick Stop stoppen, da dies nur mit Bremse abläuft.
8. In der Zwischenzeit (die Zentrifuge läuft etwa 45 min) die **Proliferationsplatte** (96- well) und die RNA- Platte präparieren. Auf die Proliferationsplatte die 1. Reihe von links nach rechts mit M (Media), PHA, Ova, LpA (Lipid A), Ppg (Peptidoglycan), D (Derp) und die 2. Reihe mit D+L (Derp+ Lipid) markieren. Jeweils 2 wells pro Antigen! Die **RNA-Platte** mit PHA; LpA, Ppg, Derp und Derp+L markieren (je 1 well). Dann **7 kleine Petrischalen** mit M, PHA, Ova, LpA, Ppg, D und D+L markieren.
9. In die 6 Petrischalen 300 µl Humanes Serum 10% pipettieren,
 - für **PHA**: 3µl H.S. abpipettieren, 3 µl PHA dazupipettieren
 - für **Ova**: 3µl H.S. abpipettieren, 3 µl Ova dazupipettieren
 - für **LpA**: 3µl H.S. abpipettieren, 3 µl LpA dazupipettieren
 - für **Ppg**: 6µl H.S. abpipettieren, 6 µl Ppg dazupipettieren
 - für **Derp1**: 18µl H.S. abpipettieren, 18 µl Derp1 dazupipettieren
 - für **Derp1+ LpA**: 21µl H.S. abpipettieren, 18 µl Derp1 und 3µl LpA dazupipettieren

Das Gesamtvolumen sollte 300 µl betragen (bzw. 500 µl bei 2 Proben), deshalb die entsprechende Menge Antigen, die man dazupipettiert, vom Human Serum abnehmen.

PHA: Stock: 1mg/ml, Einsatz 5µg/ml
OVA: Stock: 20 mg/ml (=20 µg/µl), Einsatz 100µg/ml
LpA: Stock: 1,5 mg/ml, Einsatz 0,1 µg/ml, Verdünnung im -20 °C- Freezer
Ppg: Stock: 1 mg/ml, Einsatz 10 µg/ml, Verdünnung im -20 °C- Freezer
Derp1 : Stock: 1 mg/ml, Einsatz 30 µg/ml
10. Mit einer Pipette 100 µl von den Petrischalen in die Proliferationsplatte pipettieren (je 2 wells, M in die M- wells usw.)
11. Die Röhrchen nun **SEHR** vorsichtig aus der Zentrifuge nehmen.
12. Nach der Zentrifugation findet man 4 Phasen:
 - gelb: Serum
 - weiß: WBC- Phase
 - klare Phase: Ficoll- Schicht
 - rote Phase: RBC
13. 4x 1,5 ml Tubes mit PAULINA, Patienten- Nr. und “ Serum” beschriften (am Deckel und auf der Seite)
14. Das **Serum** auf die 4 Tubes verteilen, etwa 1 ml pro Tube. Auf Eis stellen.

15. Die WBC Phase **vorsichtig** mit einer Pasteurpipette entnehmen und die WBCs in ein frisches 15 ml- Falcon pipettieren, bei entsprechend größerer Menge auf 2 oder auch 3 Falcons verteilen. Das Gesamtvolumen mit entsprechender Menge RPMI auf 14 ml bringen und mischen. Wenn sich die Phasen nicht gut getrennt haben, den Ficoll- Schritt nochmals wiederholen (ab 6.)
16. Die Tubes bei 1100 rcf, 10 min, decel 9 (=Bremse) zentrifugieren. Alternativ kann auch die Zentrifuge in der Zellkultur verwendet werden, 2400 rpm!
17. Den Überstand entnehmen und das Pellet in 10 ml RPMI resuspendieren.
18. 50 µl, möglichst nicht von ganz oben, aus dem Röhrchen entnehmen und mit 50 µl Lysepuffer versetzen. Anschließend **7,5 min** auf Eis inkubieren. Dann 50 µl 0,4% Trypan- Blau dazu pipettieren, gut mischen und 10 µl zum Zählen in die Neubauer- Zählkammer geben. Zellen zählen.
19. Inzwischen die restlichen Zellen erneut bei 1100 rcf 10 min zentrifugieren, decel 9 (oder eben auch Zellkulturzentrifuge)
20. Die Zellen in der ersten Spalte zählen, mittleres Quadrat (zweimal zählen und Mittelwert errechnen) , dann mit 4 multiplizieren, nochmals mit 3 multiplizieren (Verdünnungsfaktor), x10 (Originalvolumen 10 ml) x 10000 (Kammerfaktor). Gezählte Zellen also mit 1200000 multiplizieren. Beispiel: 50 Zellen gezählt, x 1200000= 60 x 10⁶ gesamt. Um nun die Konzentration auf 5x 10⁶ einzustellen, die entsprechende Menge Humanes Serum dazugeben. Dafür die Menge der Zellen durch 5 teilen. Beispiel: 60 x 10⁶ gesamt, Pellet in 12 ml lösen = 5x 10⁶ /ml. **Vorsicht:** Wenn das Pellet sehr rot war, könnten zu viele RBCs in der Probe sein, dann könnte die Zählung zu hoch ausfallen!
21. Jetzt den Überstand der nochmals zentrifugierten Zellen abpipettieren und in der entsprechenden Menge Humanem Serum (wie vorher errechnet) resuspendieren.
22. 100 µl dieser Zellsuspension in jedes well der Proliferationsplatte geben und in den Inkubator stellen.
23. Die RNA- Platte sollte mit mindestens 1, besser 2 ml (entspricht 5-10 x10⁶ Zellen/well) Zellsuspension bestückt werden. 2 ml Zellsuspension sollten im Röhrchen verbleiben für den Media- Wert!
24. Zur RNA- Platte dazu pipettieren:
 5µl **PHA** pro ml Zellsuspension
 5µl **LpA** pro ml Zellsuspension
 10µl **Ppg** pro ml Zellsuspension
 30µl **Derp1** pro ml Zellsuspension
 30µl **Derp1** und 5 µl **LpA** pro ml Zellsuspension
25. Bei 5% CO2 inkubieren (identisch wie die Proliferationsplatte). Die Platten inkubieren 60- 72 h.
26. Der Media- Wert wird nochmals zentrifugiert (1100 rcf, 10 min, decel 9)
27. Der Überstand wird in je 2 Tubes gegeben (mit „S M“ und Pat- Nr. markiert)
28. Das Zellpellet wird mit 4 ml PBS gewaschen, nochmalige Zentrifugation.

29. Überstand verwerfen, dem Röhrchen 1 ml Trizol zugeben und mit einer 2ml- Spritze und gelber Kanüle resuspendieren, bis das Pellet sehr gut resuspendiert ist. Zellen in ein Eppi geben, mit „C M“ und Pat- Nr. markieren und im -80 °C -Freezer lagern.

Nach 60- 72 h:

Proliferations- Test: Thymidin-Zugabe im Haunerschen Kinderspital, Immunologie-Labor, 1. Stock, Zimmer D 1.19

1. 25 µl 3H (1uCi/well), das sich schon fertig präpariert im Kühlschrank befindet, pro well in die Proliferationsplatte pipettieren (mit der Multichannel, liegt unter der Sterilbank).
2. 6-10 h im Inkubator inkubieren, dann aufs Papier absaugen
3. Wischtest machen, mit A..., Datum und Kürzel beschriften, in die entsprechende Schale stellen.

RNA- Gewinnung: (identisch wie beim Medium)

1. Die 6-wells scrapen und die abgeschrapten Zellen in entsprechend beschriftete 15 ml- Falcons geben.
2. Bei 1100 rcf, 10 min, 20°C zentrifugieren.
3. der Überstand wird in je 2 Tubes gegeben (mit „S PHA, S LpA, S Ppg und S D“ und Pat- Nr. markiert)
4. Das Zellpellet wird mit 4 ml PBS gewaschen, nochmalige Zentrifugation.
5. Überstand verwerfen, jedem Röhrchen 1 ml Trizol zugeben und mit einer 2ml- Spritze und gelber Kanüle resuspendieren, bis das Pellet sehr gut resuspendiert ist. Pellet in Eppis geben, mit „C PHA, C LpA“ usw. und Pat- Nr. markieren und im 80°C -Freezer lagern.

8.7.2 RNA-Extraktion

TRI REAGENT ® (TRIZOL)

1. Auftauen der homogenisierten Proben (1ml Trizol/ 5-10x10⁶ Zellen) auf Eis.
2. RNA-Extraktion:
Kühlzentrifuge anstellen und Deckel schließen (Dauer ca. 15 min, um auf 4° C zu kühlen)
Proben von 1. in neue Tubes pipettieren (Tubes sind RNase- und Endotoxin-frei und autoklaviert). Falls über 10x10⁶ Zellen in einer Probe sind, bitte teilen.
Zu jeder Probe 0,2 ml Chloroform (oder Bromchlorpropan) zugeben, per Hand 10-15 sec mischen und anschließend 10 min bei RT stehen lassen.
Danach bei 12.000 g , 4°C , für 15 min zentrifugieren.
3. RNA-Präzipitation:
Die wässrige Phase (oben) jeweils in ein neues Tube überführen (Achtung Trennschicht) und 0,5 ml 100% Isopropanol dazugeben. Evtl. pro Probe 1 µl Glycogen dazu (macht das RNA-Pellet sichtbar), vortexen. Alles für 10 min bei RT stehen lassen und danach wieder bei 12.000 g, 4° C, für 10 min zentrifugieren. Für Schritt 5 den Wärmeblock auf 42° C einstellen.

4. RNA-Waschen:
Überstand vorsichtig abpipettieren (Abfall in Hood). Zum Pellet (durchsichtig/gelartig) 1 ml 70-75% Ethanol geben, vortexen. Sofort bei 7.500 g, 4°C, für 5 min zentrifugieren.
5. Aufschwemmen:
Überstand wieder vorsichtig abpipettieren (Abfall in Hood). Proben offen in den Wärmeblock zum Trocknen stellen und mit Klinex abdecken (bei 42 °C, 10-30 min). Alle 10 min kontrollieren, ob die Proben schon trocken sind.
Die trockenen Proben mit je 20 µl Rnasefree Water auflösen (oder FORMAZol, 0,5% SDS) und nochmals 10 min bei 55-60 °C inkubieren.
6. Messung im Prä-PCR
7. Proben nach Messung im –80 °C Gefrierschrank lagern

8.7.3 Reverse Transkription

Protokoll QuantiTect®

cDNA Synthese mit Entfernung genomischer DNA mittels Qiagen-Kit

1. RNA Proben auf Eis stellen
QuantiTect Reagentien auf Raumtemperatur bringen. Nach dem Auftauen „schnippen“ (nicht vortexen) , leicht zentrifugieren und bis zum Gebrauch wieder auf Eis stellen
2. RNA 10pg – 1 µg
mit 2 µl Wipeout Buffer mischen und
mit RNase free water auf 14 µl auffüllen und auf Eis stellen
3. 2 min. bei 42 C in den Cyclor und danach sofort wieder auf Eis
4. während der 2 min den RT-Mastermix herstellen:

RT	1 µl	
QRT Buffer5x	4 µl	6 µl pro Probe, auf Eis stellen
RT Primer Mix	1 µl	
5. RT-Mastermix zum RNA-Mix geben und danach sofort in den Cyclor für 15 min bei 42 C und
3 min bei 95 C (zum Inaktivieren)
6. Am Ende möglichst sofort bei –20 C einfrieren

8.7.4 Quantitative real-time RT-PCR

Erstellen der verschiedenen Mixe (I-IV) und Pipettieren der Platte (V):

- I) cDNA-Mix: cDNA so verdünnen, dass 20 ng pro Reaktion (well) auf der Platte sind. Optimal ist 1µg RNA in 20 µl cDNA verdünnt (= 50 ng/µl cDNA).
Pro Reaktion (well) werden **3,6 µl cDNA-Mix** pipettiert.
für cDNA-Mix: eine 1:15 Verdünnung herstellen:
= [Anzahl der Reaktionen (wells) + 2 (Pipettierverlust)] x 3,6 µl cDNA-Mix
= (wells+2) x (0,24ul cDNA + 3,36ul DEPC).
- II) FITC (FITC Dilution 2 wird benötigt für Master-Mix und NTC-Mix):

- FITC Dilution 1 = 1ul FITC Stock + 49ul DEPC
(kann im 4°C Kühlschrank 1 Woche aufbewahrt werden)
→ FITC Dilution 2 = 1ul FITC Dil.1 + 34ul DEPC

III) Master-Mix (aus DEPC + FITC Dil.2 + SYBR-Green)
= (Anzahl der wells + 2) x (5,3 µl DEPC + 1ul FITC Dil.2 + 12,6 µl SYBR Green)

Pro Reaktion (well) werden ca. **18,9 µl Master-Mix** pipettiert.

IV) NTC-Mix (aus DEPC + FITC Dil.2 + SYBR-Green)
= (Anzahl der wells + 2) x (8,9 µl DEPC + 1ul FITC Dil.2 + 12,6 µl SYBR Green)

Pro Reaktion (well) werden ca. **22,5 µl NTC-Mix** pipettiert

V) Pipettieren der BioRad-Platte:

- ✓ Vorher beschriften mit AG Schaub, Name, Datum, Sample-Nummer
- ✓ cDNA-Mix: Pro well **3,6 µl** (1:15) von links nach rechts pipettieren (letzte Reihe = NTC-wells aussparen, also nicht pipettieren).
- ✓ Primer: jeweils **7,5 µl** des gewünschten Primers von oben nach unten pipettieren.
- ✓ Master-Mix: Pro well **18,9 µl** von links nach rechts pipettieren und nochmals gut mischen (letzte Reihe = NTC-wells aussparen, also nicht pipettieren).
- ✓ NTC-Mix: pro NTC-well **22,5 µl** pipettieren und nochmals gut mischen.
- ✓ Nach diesem Schritt hat jedes well der Platte ein **Gesamtvolumen von 30ul (das muss im iCycler Programm eingegeben werden!)**
→ **Reaktionswells = 3,6ul cDNA+ 7,5ul Primer + 18,9ul Master-Mix**
→ **NTC-wells = 7,5ul Primer + 22,5ul NTC-Mix**
- ✓ Überkleben der Platte mit BioRad Klebefolien (dabei möglichst wenig/nicht auf der Folie „herumpatschen“, da es den Lichtstrahl im iCycler irritiert). Trotzdem muss die Folie gut zwischen den wells befestigt werden.
- ✓ Anschließend für ca. 4min bei 2000 RPM und 20°C zentrifugieren. Falls die Zentrifuge über einen längeren Zeitraum belegt ist, Platte in den 4°C Kühlschrank stellen.

8.7.5 Gießen eines Agarose Gels

Benötigt werden:

- GelRed 9ul
- 0.5 fach Puffer (900 ml Aqua bidest + 100ml 5xTBE)
- Agarose

I. Kammer vorbereiten:

- große Kammer für 50 Proben pro Spur (4Spuren) (kleine für 20 pro Spur, 2 Spuren)
- große Kammer für großes Gel
- Kammer schließen
- austarieren (Mitte)
- Kämme x4 in Schlitze stecken, nach unten, mit gleichem Abstand

II. Gel 3%

- Kolben aus Schublade holen
- 200 ml Gel (groß) (100 ml klein)

- Auswiegen:

6g Agarose auf 200 ml Gel (= 3% Gel)

- leeren Kolben austarieren
- 6g Agarose abwiegen
- 200 ml Puffer dazugeben
- etwas mehr Volumen (da etwas verdampft)
- bei 360 Watt für ca. 6 Min (je nach Bedarf, Agarose muss gelöst sein) köcheln, immer wieder schwenken (mit Gelhandschuh!!), KEINE SCHLIEREN, zwi- schendurch anschauen, CAVE: läuft gern über!
- GelRed schnell dazu pipettieren: 9ul bei 200 ml
- Vorsichtig bewegen, mittelschnell in Gelkammer gießen, Luftblasen mit Pipet- tenspitze loswerden, Gel wird langsam fest
- Ca. 30 min Gel trocknen, dann Kämme lockern
- Aufräumen:
 - Kämme mit H₂O reinigen
 - Mit H₂O Kolben ausschwenken,
 - Falls Agarose dabei, in den gelben Abfall
 - Wenn Kolben dreckig, in grünen Eimer
 - Pipettenspitze in gelben Eimer

8.7.6 Gelelektrophorese

Verdünnung: 10ul ladder, 10ul Loading dye, 80ul TBE = 1:10

1. Im Labor mit der Multipette Probe mit 4ul loading dye versetzen (= ca. 1 %), zieht DNA in die Tasche)
2. Im Gelraum: Kammer aussuchen:
 - Gel zurechtschneiden, je nach Menge der Proben (3 mehr für ladder)
 - Gel soll im Puffer schwimmen
3. Mit 8-Kanalpipette Proben mischen, 9ul Probe aufs Gel in die Taschen pipettie- ren, am Anfang und Ende 5ul ladder in Kammer pipettieren
4. Kammer gut schließen, rote und schwarze Kabel anschließen: rot in rot, schwarz in schwarz)
5. Einstellen: 120 V (= 400mA), für ca. 30 min je nach Produkt
6. Start mit „Runner“
7. Kontrollieren ob Luftblasen am Gel aufsteigen
8. Nach ca. 10 min kontrollieren, ob Gel gut läuft!
9. Gel unter UV-Licht mit Schutzvisier anschauen
10. Wenn Gelbanden sich gut trennen, Fotodokumentation.

8.7.7 Zytokin-Messung

(Durchführung bereits vor Beginn dieser Dissertation durch Mitarbeiter der AG Schaub)

Cytokine Assay wash protocol (Fa. Biorad) (Takes approx 4-5 hours)

First of all:

- Test the pressure on pump (= Multiscreen Separations System) (with test-plate, no membrane)
- Enough Sheath Fluid !
- Thaw samples at start of day (needs ca. 30 min time)

Multiplex Assay:

Always use booklet from BIORAD!

Prepare:

1. Reconstitute the lyophilized standard in appropri. medium (p.10/11)
for supernatant: use human serum!!! As diluent
(Usually for concentration 1.95-32.000pg/ml)
put 30 min. on ice
2. Cytokine standard dilutions
3. Conjugated beads as directed (25x)
4. Detection ab (cave: 25x / 50x / 100 x)

Assay procedure

1. Bring all buffers and diluents to RT
2. Pre-wet with 100 ul Assay Buffer. Remove the buffer by vacuum filtration (depends on pressure tested, ca. 2-8mmHg, red-black ring). Dry the bottom of the plate with a clean paper towel
3. Vortex multiplex bead working solution for 15-20 sec (IMPORTANT) and pipet 50 ul into each well. Remove the buffer by vacuum filtration.
4. Add 100 ul wash buffer and remove it by vacuum filtration. Repeat this step. Blot the plate with a paper towel.
5. Vortex each tube of diluted standard or sample. Pipet 50 ul per well . Cover the plate with a sealing tape and aluminium foil and place it on a shaker. Shaker speed 1100 rpm f. 30 sec and 300 rpm f. 60 min (RT). (Work with a straight shaker/ no tipping movement). Put samples immediately back on ice, best in freezer!! Start Luminex: write template and calibrate
6. Remove the buffer by vacuum filtration
7. Wash 3x with 100 ul wash buffer. Remove buffer by vacuum filtration. Blot the bottom with a paper towel at the end.
8. Vortex detec.antibody working solution and add 25 ul to each well. Cover the plate with a sealing tape and aluminium foil and place it on a shaker. Shaker speed 1100 rpm f. 30 sec and 300 rpm f. 30 min (RT). Prepare the 1x streptavidin PE (prep.on page 16 / stable for up to 4 hr) Remove the buffer by vacuum filtration.
9. Wash 3x with 100 ul wash buffer. Remove buffer by vacuum filtration. Blot the bottom with a paper towel at the end.
10. Vortex the 1x streptavidin PE and add 50 ul to each well. Cover the plate with a sealing tape and aluminium foil and place it on a shaker. Shaker speed 1100 rpm f. 30 sec and 300 rpm for 10 min (RT). Remove buffer by vacuum filtration.
11. Wash 3x with 100 ul wash buffer. Remove buffer by vacuum filtration. Blot the bottom with a paper towel at the end.
12. Resuspend the beads in each well with 125 ul assay buffer. Place the plate on a shaker (only sealing tape/ no aluminium) and shake 1100 rpm f. 30 sec. Reading the plate on the Bio-Plex system

8.8 Detektionsrate der real-time RT-PCR

GATA3	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	72	0	100
PHA	69	0	100
LpA	69	0	100
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100
Tbet	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	72	0	100
PHA	69	0	100
LpA	69	0	100
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100
HLXI	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	72	0	100
PHA	69	0	100
LpA	69	0	100
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100
IRF1	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	71	1	99
PHA	68	1	99
LpA	67	2	97
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100
IL9	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	64	8	89
PHA	57	12	83
LpA	59	10	86
Ppg	52	15	78
Derp	27	3	90
DundP	22	3	88
STAT6	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	72	0	100
PHA	69	0	100
LpA	69	0	100
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100
STAT6d	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	72	0	100
PHA	69	0	100
LpA	69	0	100
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100
STAT6e	n (detektiert)	n (nicht-detektiert)	Detektionsrate (%)
M	72	0	100
PHA	69	0	100
LpA	69	0	100
Ppg	67	0	100
Derp	30	0	100
DundP	25	0	100

Tabelle 38: Detektionsrate der real-time RT-PCR

9 QUELLENVERZEICHNIS

9.1 Literaturverzeichnis

- ADAMSON, A. S., COLLINS, K., LAURENCE, A. & O'SHEA, J. J. 2009. The Current STATUS of lymphocyte signaling: new roles for old players. *Curr Opin Immunol*, 21, 161-6.
- ADKINS, S. & BURMEISTER, M. 1996. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem*, 240, 17-23.
- AKKAYA, B., OYA, Y., AKKAYA, M., AL SOUZ, J., HOLSTEIN, A. H., KAMENYEVA, O., KABAT, J., MATSUMURA, R., DORWARD, D. W., GLASS, D. D. & SHEVACH, E. M. 2019. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol*, 20, 218-231.
- ALFVEN, T., BRAUN-FAHRLANDER, C., BRUNEKREEF, B., VON MUTIUS, E., RIEDLER, J., SCHEYNIUS, A., VAN HAGE, M., WICKMAN, M., BENZ, M. R., BUDDE, J., MICHELS, K. B., SCHRAM, D., UBLAGGER, E., WASER, M. & PERSHAGEN, G. 2006. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. *Allergy*, 61, 414-21.
- AMIN, P., LEVIN, L., EPSTEIN, T., RYAN, P., LEMASTERS, G., KHURANA HERSHEY, G., REPONEN, T., VILLAREAL, M., LOCKEY, J. & BERNSTEIN, D. I. 2014. Optimum predictors of childhood asthma: persistent wheeze or the Asthma Predictive Index? *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2, 709-15.
- AVERBECK, M., GEBHARDT, C., EMMRICH, F., TREUDLER, R. & SIMON, J. C. 2007. Immunologic principles of allergic disease. *J Dtsch Dermatol Ges*, 5, 1015-28.
- BARUG, D., GOORDEN, S., HERRUER, M., MULLER, M., BROHET, R. & DE WINTER, P. 2014. Reference values for interleukin-6 and interleukin-8 in cord blood of healthy term neonates and their association with stress-related perinatal factors. *PLoS One*, 9, e114109.
- BAS, A., FORSBERG, G., HAMMARSTROM, S. & HAMMARSTROM, M. L. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 59, 566-73.
- BLOOMFIELD, S. F., STANWELL-SMITH, R., CREVEL, R. W. & PICKUP, J. 2006. Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene. *Clin Exp Allergy*, 36, 402-25.
- BRAND, P. L., BARALDI, E., BISGAARD, H., BONER, A. L., CASTRO-RODRIGUEZ, J. A., CUSTOVIC, A., DE BLIC, J., DE JONGSTE, J. C., EBER, E., EVERARD, M. L., FREY, U., GAPPA, M., GARCIA-MARCOS, L., GRIGG, J., LENNEY, W., LE SOUEF, P., MCKENZIE, S., MERKUS, P. J., MIDULLA, F., PATON, J. Y., PIACENTINI, G., POHUNEK, P., ROSSI, G. A., SEDDON, P., SILVERMAN, M., SLY, P. D., STICK, S., VALIULIS, A., VAN AALDEREN, W. M., WILDHABER, J. H., WENNERGREN, G., WILSON, N., ZIVKOVIC, Z. & BUSH, A. 2008. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. *Eur Respir J*, 32, 1096-110.

- BRAUN-FAHRLANDER, C., RIEDLER, J., HERZ, U., EDER, W., WASER, M., GRIZE, L., MAISCH, S., CARR, D., GERLACH, F., BUFE, A., LAUENER, R. P., SCHIERL, R., RENZ, H., NOWAK, D., VON MUTIUS, E., ALLERGY & ENDOTOXIN STUDY, T. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*, 347, 869-77.
- CAMPOS CARRASCOSA, L., KLEIN, M., KITAGAWA, Y., LUCKEL, C., MARINI, F., KONIG, A., GURALNIK, A., RAIFER, H., HAGNER-BENES, S., RADLER, D., BOCK, A., KANG, C., LOHOFF, M., GARN, H., SCHAUB, B., BERBERICH-SIEBELT, F., SAKAGUCHI, S., BOPP, T. & HUBER, M. 2017. Reciprocal regulation of the Il9 locus by counteracting activities of transcription factors IRF1 and IRF4. *Nat Commun*, 8, 15366.
- CASACA, V. I., ILLI, S., SUTTNER, K., SCHLEICH, I., BALLEMBERGER, N., KLUCKER, E., TURAN, E., VON MUTIUS, E., KABESCH, M. & SCHAUB, B. 2012. TBX21 and HLX1 polymorphisms influence cytokine secretion at birth. *PLoS One*, 7, e31069.
- CHANG, H. C., SEHRA, S., GOSWAMI, R., YAO, W., YU, Q., STRITESKY, G. L., JABEEN, R., MCKINLEY, C., AHYI, A. N., HAN, L., NGUYEN, E. T., ROBERTSON, M. J., PERUMAL, N. B., TEPPER, R. S., NUTT, S. L. & KAPLAN, M. H. 2010. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 11, 527-34.
- CROTTY, S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41, 529-42.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. & LAFAILLE, J. J. 2002. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*, 14, 771-8.
- DEPNER, M., FUCHS, O., GENUNEIT, J., KARVONEN, A. M., HYVARINEN, A., KAULEK, V., RODUIT, C., WEBER, J., SCHAUB, B., LAUENER, R., KABESCH, M., PFEFFERLE, P. I., FREY, U., PEKKANEN, J., DALPHIN, J. C., RIEDLER, J., BRAUN-FAHRLANDER, C., VON MUTIUS, E., EGE, M. J. & GROUP, P. S. 2014. Clinical and epidemiologic phenotypes of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 189, 129-38.
- DORNAN, D., ECKERT, M., WALLACE, M., SHIMIZU, H., RAMSAY, E., HUPP, T. R. & BALL, K. L. 2004. Interferon regulatory factor 1 binding to p300 stimulates DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol*, 24, 10083-98.
- DOUWES, J., CHENG, S., TRAVIER, N., COHET, C., NIESINK, A., MCKENZIE, J., CUNNINGHAM, C., LE GROS, G., VON MUTIUS, E. & PEARCE, N. 2008. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J*, 32, 603-11.
- DUETSCH, G., ILLIG, T., LOESGEN, S., ROHDE, K., KLOPP, N., HERBON, N., GOHLKE, H., ALTMUELLER, J. & WJST, M. 2002. STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum Mol Genet*, 11, 613-21.
- EDER, W. E., MJ; VON MUTIUS E. 2007. The Asthma Epidemic. *N Engl J Med*, 355(21):2226-35.
- EGE, M. J., BIELI, C., FREI, R., VAN STRIEN, R. T., RIEDLER, J., UBLAGGER, E., SCHRAM-BIJKERK, D., BRUNEKREEF, B., VAN HAGE, M., SCHEYNIUS, A., PERSHAGEN, G., BENZ, M. R., LAUENER, R., VON MUTIUS, E. & BRAUN-FAHRLANDER, C. 2006. 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*, 117, 817-23.
- EGE, M. J., HERZUM, I., BUCHELE, G., KRAUSS-ETSCHMANN, S., LAUENER, R. P., ROPONEN, M., HYVARINEN, A., VUITTON, D. A., RIEDLER, J.,

- BRUNEKREEF, B., DALPHIN, J. C., BRAUN-FAHRLANDER, C., PEKKANEN, J., RENZ, H., VON MUTIUS, E. & PROTECTION AGAINST ALLERGY STUDY IN RURAL ENVIRONMENTS STUDY, G. 2008. Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 407-12, 412 e1-4.
- EGE, M. J., MAYER, M., NORMAND, A. C., GENUNEIT, J., COOKSON, W. O., BRAUN-FAHRLANDER, C., HEEDERIK, D., PIARROUX, R. & VON MUTIUS, E. 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*, 364, 701-9.
- ELO, L. L., JARVENPAA, H., TUOMELA, S., RAGHAV, S., AHLFORS, H., LAURILA, K., GUPTA, B., LUND, R. J., TAHVANAINEN, J., HAWKINS, R. D., ORESIC, M., LAHDESMÄKI, H., RASOOL, O., RAO, K. V., AITTOKALLIO, T. & LAHESMAA, R. 2010. Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming. *Immunity*, 32, 852-62.
- ELYAMAN, W., BRADSHAW, E. M., UYTENHOVE, C., DARDALHON, V., AWASTHI, A., IMITOLA, J., BETTELLI, E., OUKKA, M., VAN SNICK, J., RENAULD, J. C., KUCHROO, V. K. & KHOURY, S. J. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12885-90.
- ENGEL, P., BOUMSELL, L., BALDERAS, R., BENSUSSAN, A., GATTEI, V., HOREJSI, V., JIN, B. Q., MALAVASI, F., MORTARI, F., SCHWARTZ-ALBIEZ, R., STOCKINGER, H., VAN ZELM, M. C., ZOLA, H. & CLARK, G. 2015. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*, 195, 4555-63.
- ENSEMBL.ORG. *GATA3* [Online]. Ensembl genome browser. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000107485;r=10:7708609-9199858 [Accessed 20.01. 2019].
- ENSEMBL.ORG. *HLX1* [Online]. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000136630;r=1:220879400-220885059 [Accessed 20.01. 2019].
- ENSEMBL.ORG. *IL9* [Online]. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000145839;r=5:135892246-135895827;t=ENST00000274520 [Accessed 20.01. 2019].
- ENSEMBL.ORG. *IRF1* [Online]. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000125347;r=5:132481609-132490798 [Accessed 20.01. 2019].
- ENSEMBL.ORG. *STAT6* [Online]. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000166888;r=12:57095408-57132139 [Accessed 20.01. 2019].
- ENSEMBL.ORG. *Tbet* [Online]. Available: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000073861;r=17:47733244-47746119 [Accessed 20.01. 2019].
- FARNE, H. A., WILSON, A., POWELL, C., BAX, L. & MILAN, S. J. 2017. Anti-IL5 therapies for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*, 9, CD010834.
- FINOTTO, S., NEURATH, M. F., GLICKMAN, J. N., QIN, S., LEHR, H. A., GREEN, F. H. Y., ACKERMAN, K., HALEY, K., GALLE, P. R., SZABO, S. J., DRAZEN, J. M., DE SANCTIS, G. T. & GLIMCHER, L. H. 2002. Development of Spontaneous Airway Changes Consistent with Human Asthma in Mice Lacking T-bet. *Science 11 Jan 2002: Vol. 295, Issue 5553, pp. 336-338, Vol 295, pp. 336-338.*

- FREY, U. & VON MUTIUS, E. 2009. The challenge of managing wheezing in infants. *N Engl J Med*, 360, 2130-3.
- GEMOLL, W. 2006. *Griechisch-deutsches Schulwörterbuch*. Oldenbourg Schulbuchverlag.
- GOSWAMI, R., JABEEN, R., YAGI, R., PHAM, D., ZHU, J., GOENKA, S. & KAPLAN, M. H. 2012. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol*, 188, 968-75.
- GRANELL, R., HENDERSON, A. J. & STERNE, J. A. 2016. Associations of wheezing phenotypes with late asthma outcomes in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children: A population-based birth cohort. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 1060-1070 e11.
- GRINDEBACKE, H., WING, K., ANDERSSON, A. C., SURI-PAYER, E., RAK, S. & RUDIN, A. 2004. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy*, 34, 1364-72.
- HALDAR, P., BRIGHTLING, C. E., HARGADON, B., GUPTA, S., MONTEIRO, W., SOUSA, A., MARSHALL, R. P., BRADDING, P., GREEN, R. H., WARDLAW, A. J. & PAVORD, I. D. 2009. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*, 360, 973-84.
- HASHIMOTO, M., FURU, M., YAMAMOTO, W., FUJIMURA, T., HARA, R., KATAYAMA, M., OHNISHI, A., AKASHI, K., YOSHIDA, S., NAGAI, K., SON, Y., AMURO, H., HIRANO, T., EBINA, K., UOZUMI, R., ITO, H., TANAKA, M., OHMURA, K., FUJII, T. & MIMORI, T. 2018. Factors associated with the achievement of biological disease-modifying antirheumatic drug-free remission in rheumatoid arthritis: the ANSWER cohort study. *Arthritis Res Ther*, 20, 165.
- HAUBER, H. P., BERGERON, C. & HAMID, Q. 2004. IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, 134, 79-87.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
- ILMARINEN, P., TUOMISTO, L. E., NIEMELA, O., DANIELSSON, J., HAANPAA, J., KANKAANRANTA, T. & KANKAANRANTA, H. 2016. Comorbidities and elevated IL-6 associate with negative outcome in adult-onset asthma. *Eur Respir J*, 48, 1052-1062.
- ISAAC. 2019. *International Study of Asthma and Allergies in childhood* [Online]. Available: <http://isaac.auckland.ac.nz/> [Accessed 25.02. 2019].
- JAGER, A., DARDALHON, V., SOBEL, R. A., BETTELLI, E. & KUCHROO, V. K. 2009. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*, 183, 7169-77.
- JUST, J., DESCHILDRE, A., LEJEUNE, S. & AMAT, F. 2019. New perspectives of childhood asthma treatment with biologics. *Pediatr Allergy Immunol*, 30, 159-171.
- KAARIO, H., HUTTUNEN, K., KARVONEN, A. M., SCHAUB, B., VON MUTIUS, E., PEKKANEN, J., HIRVONEN, M. R. & ROPONEN, M. 2016. Exposure to a farm environment is associated with T helper 1 and regulatory cytokines at age 4.5 years. *Clin Exp Allergy*, 46, 71-7.
- KAMRADT, T. & FERRARI-KUHNE, K. 2011. [Adaptive immunity]. *Dtsch Med Wochenschr*, 136, 1678-83.
- KANO, S., SATO, K., MORISHITA, Y., VOLLSTEDT, S., KIM, S., BISHOP, K., HONDA, K., KUBO, M. & TANIGUCHI, T. 2008. The contribution of

- transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 9, 34-41.
- KAPLAN, M. H., HUFFORD, M. M. & OLSON, M. R. 2015. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*, 15, 295-307.
- KAPLAN, M. H., WURSTER, A. L., SMILEY, S. T. & GRUSBY, M. J. 1999. Stat6-dependent and -independent pathways for IL-4 production. *J Immunol*, 163, 6536-40.
- KARLSSON, M. R., RUGTVEIT, J. & BRANDTZAEG, P. 2004. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med*, 199, 1679-88.
- KIPS, J. C., BRUSSELLE, G. J., JOOS, G. F., PELEMAN, R. A., TAVERNIER, J. H., DEVOS, R. R. & PAUWELS, R. A. 1996. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 153, 535-9.
- KISHIMOTO, T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*, 22, 347-52.
- LARCHE, M., AKDIS, C. A. & VALENTA, R. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6, 761-71.
- LAU, S., MATRICARDI, P. M., WAHN, U., LEE, Y. A. & KEIL, T. 2019. Allergy and atopy from infancy to adulthood: Messages from the German birth cohort MAS. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 122, 25-32.
- LEMANSKE, R. F., JR. & BUSSE, W. W. 2010. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S95-102.
- LERKVALEEKUL, B. & VILAIYUK, S. 2018. Early reduction of serum interleukin-6 levels as a predictor of clinical remission in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Asian Pac J Allergy Immunol*.
- LI, H. & ROSTAMI, A. 2010. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5, 198-209.
- LOSS, G., APPRICH, S., WASER, M., KNEIFEL, W., GENUNEIT, J., BUCHELE, G., WEBER, J., SOZANSKA, B., DANIELEWICZ, H., HORAK, E., VAN NEERVEN, R. J., HEEDERIK, D., LORENZEN, P. C., VON MUTIUS, E. & BRAUN-FAHRLANDER, C. 2011. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: The GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol*, 128, 766-773 e4.
- MACAUBAS, C., DE KLERK, N. H., HOLT, B. J., WEE, C., KENDALL, G., FIRTH, M., SLY, P. D. & HOLT, P. G. 2003. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *The Lancet*, 362, 1192-1197.
- MARSH, D. G., NEELY, J. D., BREAZEALE, D. R., GHOSH, B., FREIDHOFF, L. R., EHRLICH-KAUTZKY, E., SCHOU, C., KRISHNASWAMY, G. & BEATY, T. H. 1994. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*, 264, 1152-6.
- MARTINEZ, F. D., WRIGHT, A. L., TAUSSIG, L. M., HOLBERG, C. J., HALONEN, M. & MORGAN, W. J. 1995. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med*, 332, 133-8.
- MIKHALKEVICH, N., BECKNELL, B., CALIGIURI, M. A., BATES, M. D., HARVEY, R. & ZHENG, W. P. 2006. Responsiveness of naive CD4 T cells to polarizing cytokine determines the ratio of Th1 and Th2 cell differentiation. *J Immunol*, 176, 1553-60.

- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-73.
- MULLEN, A. C., HUTCHINS, A. S., HIGH, F. A., LEE, H. W., SYKES, K. J., CHODOSH, L. A. & REINER, S. L. 2002. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol*, 3, 652-8.
- MULLIS, K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, 48, 579-82.
- MURPHY, T., WALPORT ET AL. 2008. *Janeway's Immunobiology, Seventh Edition*. Taylor & Francis Ltd.
- NOLAN, T., HANDS, R. E. & BUSTIN, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1, 1559-82.
- NOWAK, E. C., WEAVER, C. T., TURNER, H., BEGUM-HAQUE, S., BECHER, B., SCHREINER, B., COYLE, A. J., KASPER, L. H. & NOELLE, R. J. 2009. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med*, 206, 1653-60.
- ONLINEBIOLOGYNOTES. *Schema PCR* [Online]. Available: <http://www.onlinebiologynotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-steps-types-application/> [Accessed 28.02.2019].
- PALM, N. W., ROSENSTEIN, R. K. & MEDZHITOV, R. 2012. Allergic host defences. *Nature*, 484, 465-72.
- PAREL, Y. & CHIZZOLINI, C. 2004. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev*, 3, 215-20.
- PATEL, B. K., KECK, C. L., O'LEARY, R. S., POPESCU, N. C. & LAROCHELLE, W. J. 1998a. Localization of the human stat6 gene to chromosome 12q13.3-q14.1, a region implicated in multiple solid tumors. *Genomics*, 52, 192-200.
- PATEL, B. K., PIERCE, J. H. & LAROCHELLE, W. J. 1998b. Regulation of interleukin 4-mediated signaling by naturally occurring dominant negative and attenuated forms of human Stat6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 172-7.
- PATEL, B. K., WANG, L. M., LEE, C. C., TAYLOR, W. G., PIERCE, J. H. & LAROCHELLE, W. J. 1996. Stat6 and Jak1 are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 271, 22175-82.
- PELAIA, C., CALABRESE, C., VATRELLA, A., BUSCETI, M. T., GAROFALO, E., LOMBARDO, N., TERRACCIANO, R. & PELAIA, G. 2018. Benralizumab: From the Basic Mechanism of Action to the Potential Use in the Biological Therapy of Severe Eosinophilic Asthma. *Biomed Res Int*, 2018, 4839230.
- PFEFFERLE, P. I., BUCHELE, G., BLUMER, N., ROPONEN, M., EGE, M. J., KRAUSS-ETSCHMANN, S., GENUNEIT, J., HYVARINEN, A., HIRVONEN, M. R., LAUENER, R., PEKKANEN, J., RIEDLER, J., DALPHIN, J. C., BRUNKEEF, B., BRAUN-FAHRLANDER, C., VON MUTIUS, E. & RENZ, H. 2010. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 108-15 e1-3.
- QUIAGEN. *PCR Protocols & Applications* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/molecular-biology-methods/pcr/#Guidelines%20for%20PCR> [Accessed 28.02.2019].
- QUIAGEN. 2009. *QuantiTect Reverse Transcription Handbook* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en> [Accessed 28.02.2019].
- RAEDLER, D. & SCHAUB, B. 2014. Immune mechanisms and development of childhood asthma. *Lancet Respir Med*, 2, 647-56.

- RENZ-POLSTER, K., BRAUN 2004. *Basislehrbuch Innere Medizin*. Elsevier, Urban & Fischer.
- RIEDLER, J., BRAUN-FAHRLÄNDER, C., EDER, W., SCHREUER, M., WASER, M., MAISCH, S., CARR, D., SCHIERL, R., NOWAK, D. & VON MUTIUS, E. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *The Lancet*, 358, 1129-1133.
- RINCON, M. & IRVIN, C. G. 2012. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci*, 8, 1281-90.
- RING, J. 1985. 1st description of an "atopic family anamnesis" in the Julio-Claudian imperial house: Augustus, Claudius, Britannicus. *Hautarzt*, 36, 470-1.
- ROBINSON, D. S. 2009. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy*, 39, 1314-23.
- SCHAUB, B., LAUENER, R. & VON MUTIUS, E. 2006. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 969-77; quiz 978.
- SCHAUB, B., LIU, J., HOPPLER, S., HAUG, S., SATTLER, C., LLUIS, A., ILLI, S. & VON MUTIUS, E. 2008. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 1491-9, 1499 e1-13.
- SCHAUB, B., LIU, J., HOPPLER, S., SCHLEICH, I., HUEHN, J., OLEK, S., WIECZOREK, G., ILLI, S. & VON MUTIUS, E. 2009. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 774-82 e5.
- SCHEDDEL, M., FREI, R., BIELI, C., CAMERON, L., ADAMSKI, J., LAUENER, R. & KABESCH, M. 2009. An IgE-associated polymorphism in STAT6 alters NF-kappaB binding, STAT6 promoter activity, and mRNA expression. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 583-9, 589 e1-6.
- SCHUIJS, M. J., WILLART, M. A., VERGOTE, K., GRAS, D., DESWARTE, K., EGE, M. J., MADEIRA, F. B., BEYAERT, R., VAN LOO, G., BRACHER, F., VON MUTIUS, E., CHANEZ, P., LAMBRECHT, B. N. & HAMMAD, H. 2015. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*, 349, 1106-10.
- SHI, X., CAO, S., MITSUHASHI, M., XIANG, Z. & MA, X. 2004. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *J Immunol*, 172, 4111-22.
- STRACHAN, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299, 1259-60.
- SUTTNER, K., ROSENSTIEL, P., DEPNER, M., SCHEDDEL, M., PINTO, L. A., RUETHER, A., ADAMSKI, J., KLOPP, N., ILLIG, T., VOGELBERG, C., SCHREIBER, S., VON MUTIUS, E. & KABESCH, M. 2009. TBX21 gene variants increase childhood asthma risk in combination with HLX1 variants. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1062-8, 1068 e1-8.
- SZABO, S. J., KIM, S. T., COSTA, G. L., ZHANG, X., FATHMAN, C. G. & GLIMCHER, L. H. 2015. Pillars article: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000. 100: 655-669. *J Immunol*, 194, 2961-75.
- THERMOSCIENTIFIC 2008. *NanoDrop 1000 users manual*.
- TILLIE-LEBLOND, I., PUGIN, J., MARQUETTE, C. H., LAMBLIN, C., SAULNIER, F., BRICHET, A., WALLAERT, B., TONNEL, A. B. & GOSSET, P. 1999. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, 487-94.
- TURK, J. L. 1987. Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. *J R Soc Med*, 80, 31-3.
- UNUTMAZ, D. & VILCEK, J. 2008. IRF1: a deus ex machina in TH1 differentiation. *Nat Immunol*, 9, 9-10.

- VAN DER POUW KRAAN, T. C., BOEIJE, L. C., DE GROOT, E. R., STAPEL, S. O., SNIJDERS, A., KAPSENBERG, M. L., VAN DER ZEE, J. S. & AARDEN, L. A. 1997. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol*, 158, 5560-5.
- VAN OOSTERHOUT, A. J. & MOTTA, A. C. 2005. Th1/Th2 paradigm: not seeing the forest for the trees? *Eur Respir J*, 25, 591-3.
- VAN WONDEREN, K. E., GESKUS, R. B., VAN AALDEREN, W. M., MOHRS, J., BINDELS, P. J., VAN DER MARK, L. B. & TER RIET, G. 2016. Stability and predictiveness of multiple trigger and episodic viral wheeze in preschoolers. *Clin Exp Allergy*, 46, 837-47.
- VELDHOEN, M., UYTENHOVE, C., VAN SNICK, J., HELMBY, H., WESTENDORF, A., BUER, J., MARTIN, B., WILHELM, C. & STOCKINGER, B. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9, 1341-6.
- VISSERS, J. L., VAN ESCH, B. C., HOFMAN, G. A., KAPSENBERG, M. L., WELLER, F. R. & VAN OOSTERHOUT, A. J. 2004. Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 1204-10.
- VON EHRENSTEIN, O. S., VON MUTIUS, E., ILLI, S., BAUMANN, L., BOHM, O. & VON KRIES, R. 2000. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*, 30, 187-93.
- VON MUTIUS, E. & SCHMID, S. 2006. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*, 61, 407-13.
- VON MUTIUS, E. & VERCELLI, D. 2010. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*, 10, 861-8.
- WAHN, U. 2005. *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.
- WU, A. Y., SUR, S., GRANT, J. A. & TRIPPLE, J. W. 2019. Interleukin-4/interleukin-13 versus interleukin-5: a comparison of molecular targets in biologic therapy for the treatment of severe asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 19, 30-37.
- YOKOYAMA, A., KOHNO, N., FUJINO, S., HAMADA, H., INOUE, Y., FUJIOKA, S., ISHIDA, S. & HIWADA, K. 1995. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 151, 1354-8.
- YOSHIMOTO, T., OKAMURA, H., TAGAWA, Y. I., IWAKURA, Y. & NAKANISHI, K. 1997. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3948-53.
- YU, J., LIU, X., LI, Y., MENG, S., WU, F., YAN, B., XUE, Y., MA, T., YANG, J. & LIU, J. 2018. Maternal exposure to farming environment protects offspring against allergic diseases by modulating the neonatal TLR-Tregs-Th axis. *Clin Transl Allergy*, 8, 34.
- ZHENG, W. & FLAVELL, R. A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89, 587-96.
- ZHOU, M. & OUYANG, W. 2003. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res*, 28, 25-37.
- ZHU, J., YAMANE, H., COTE-SIERRA, J., GUO, L. & PAUL, W. E. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 16, 3-10.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Clemens Freiherr von Pirquet	1
Abbildung 2: Überblick Immunsystem	2
Abbildung 3: T-Zell-Reihen mit Fokus auf die Untergruppen der T-Helferzellen	5
Abbildung 4: Ablauf einer allergischen Reaktion	7
Abbildung 5: Asthma-Prävalenz bei Kindern	8
Abbildung 6: Schema reverse Transkription	16
Abbildung 7: Durchführung reverse Transkription	17
Abbildung 8: Schema zum Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion	18
Abbildung 9: Übersicht Primer-Auswahl	18
Abbildung 10: Schmelzkurve 18S rRNA	20
Abbildung 11: Position Tbet auf Chromosom 17.....	20
Abbildung 12: Schmelzkurve Tbet.....	21
Abbildung 13: Position HLX1 auf Chromosom 1.....	21
Abbildung 14: Schmelzkurve HLX1	22
Abbildung 15: Position IRF-1 auf Chromosom 5	22
Abbildung 16: Schmelzkurve IRF1	23
Abbildung 17: Position GATA3 auf Chromosom 10.....	23
Abbildung 18: Schmelzkurve GATA3	24
Abbildung 19: Position STAT6 auf Chromosom 12.....	24
Abbildung 20: Schmelzkurve STAT6	25
Abbildung 21: Schmelzkurve STAT6d	26
Abbildung 22: Schmelzkurve STAT6e	26
Abbildung 23: Einfluss von IL-9.....	27
Abbildung 24: Position IL-9 auf Chromosom 5.....	27
Abbildung 25: Schmelzkurve IL-9	28
Abbildung 26: Pipettierschema real-time RT-PCR, Platte 1 und 2.....	29
Abbildung 27: Versuchsaufbau real-time RT-PCR Vorbereitung (Foto: E. Klucker) ...	30
Abbildung 28: PCR-Platte (Foto: E. Klucker).....	31
Abbildung 29: Versuchsaufbau iCycler (Foto: E. Klucker)	31
Abbildung 30: Versuchsaufbau Gießen eines Gels (Foto: E. Klucker).....	32
Abbildung 31: Versuchsaufbau Gel-Elektrophorese (Foto: E. Klucker)	33
Abbildung 32: Resultat Gelelektrophorese (Foto: E. Klucker)	34
Abbildung 33: Beispiel für eine ideale exponentielle Amplifikationskurve (Tbet)	35
Abbildung 34: Beispiel für eine ideale Schmelzkurve (Tbet)	36
Abbildung 35: Überblick der untersuchten Gene	42
Abbildung 36: Genexpression Tbet.....	43
Abbildung 37: Genexpression HLX1.....	43
Abbildung 38: Genexpression IRF1.....	44
Abbildung 39: Genexpression GATA3.....	44
Abbildung 40: Genexpression STAT6.....	45
Abbildung 41: Genexpression STAT6d.....	45
Abbildung 42: Genexpression STAT6e.....	46
Abbildung 43: Genexpression IL-9.....	46
Abbildung 44: Gen-Gen-Korrelationen der real-time RT-PCR Population.....	49

Abbildung 45: Gen-Gen-Korrelation der Nicht-Bauernkinder	51
Abbildung 46: Gen-Gen-Korrelation der Bauernkinder.....	53

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	13
Tabelle 2: Pipetten und Zubehör	13
Tabelle 3: Gefäße.....	13
Tabelle 4: Weitere Materialien	14
Tabelle 5: Reagenzien	14
Tabelle 6: Software.....	15
Tabelle 7: Stimuli – Charakteristika und Konzentration (Schaub et al., 2009).....	16
Tabelle 8: Eigenschaften 18S	19
Tabelle 9: Eigenschaften des Primers Tbet	20
Tabelle 10: Eigenschaften HLX1	21
Tabelle 11: Eigenschaften IRF1	22
Tabelle 12: Eigenschaften des Primers GATA3.....	23
Tabelle 13: Eigenschaften STAT6	25
Tabelle 14: Eigenschaften STAT6d	25
Tabelle 15: Eigenschaften STAT6e.....	26
Tabelle 16: Eigenschaften IL-9	28
Tabelle 17: Protokoll real-time RT-PCR „Paulina 62,5 long2.tmo“	32
Tabelle 18: Beispiel einer Auswertung der real-time RT-PCR Daten (Tbet)	36
Tabelle 19: Charakteristika der PAULCHEN-Studienpopulation.....	40
Tabelle 20: Charakteristika der PAULCHEN-Studienpopulation, real-time RT-PCR Untergruppe.....	41
Tabelle 21: Anzahl der untersuchten Proben pro Gen und Stimulus	42
Tabelle 22: Zusammenfassung Hauptergebnisse real-time RT-PCR.....	47
Tabelle 23: Adjustierung für Geschlecht des Kindes	47
Tabelle 24: Adjustierung für mütterliche Faktoren: Asthma und Atopie.....	48
Tabelle 25: Adjustierung für mütterliche Faktoren: Rauchen und Bildung	48
Tabelle 26: Th1-Th2 Ratio	48
Tabelle 27: Korrelation Th1- und Th2- assoziierter Gene in der real-time RT-PCR Population.....	50
Tabelle 28: Korrelation Th1- und Th2- assoziierter Gene in der Subpopulation der Nicht-Bauernkinder	52
Tabelle 29: Korrelation Th1- und Th2- assoziierter Gene in der Subpopulation der Bauernkinder	54
Tabelle 30: Zytokin-Sekretion.....	55
Tabelle 31: PAULCHEN-Studienpopulation: Bauernhof-Exposition.	56
Tabelle 32: Real-time RT-PCR Untergruppe: Bauernhof-Exposition.	56
Tabelle 33: PAULCHEN-Studienpopulation: Familienanamnese.....	57
Tabelle 34: Real-time RT-PCR Untergruppe: Familienanamnese.	57

Tabelle 35: PAULCHEN-Studienpopulation: Entwicklung pfeifender Atemgeräusche. Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung.	58
Tabelle 36: Real-time RT-PCR Untergruppe: Entwicklung pfeifender Atemgeräusche. Vergleich Kinder mit allergischer Sensibilisierung versus Kinder ohne allergische Sensibilisierung.	59
Tabelle 37: Getestete Allergene im Bluttest.....	131
Tabelle 38: Detektionsrate der real-time RT-PCR	140

10 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. D. Reinhardt, dem ehemaligen Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, und seinem Nachfolger Prof. Dr. Dr. C. Klein sowie dem ehemaligen Leiter des Forschungskubus, Prof. Dr. A. Roscher, für die Möglichkeit, meine Promotion im Forschungskubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals durchführen zu können.

Großer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Bianca Schaub für die Chance, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Durch ihre persönliche Unterstützung, die engagierte Begleitung sowie zahlreiche spannende Diskussionen und die eigene Begeisterung für das Projekt wurde diese Arbeit erst möglich.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der AG Schaub für die stete Bereitschaft zur fachlichen Unterstützung und die harmonische Atmosphäre in der AG, die die Arbeit dort so angenehm macht. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Andreas Böck für die Unterstützung bei den statistischen Analysen.

Außerdem danke ich allen Familien, ohne deren zuverlässige Teilnahme an der PAULCHEN-Studie diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Meinem Bruder herzlichen Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die Unterstützung bei sämtlichen Layout-Fragen.

Meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, danke ich von Herzen für ihre liebevolle Unterstützung und Motivation an sämtlichen Stationen meines Lebens. Ohne euch wären mein Medizinstudium, diese Promotion und unendlich viele meiner Träume nicht möglich gewesen!

11 LEBENSLAUF

Eidesstattliche Versicherung

Klucker, Elisabeth Sabine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Einfluss der Th1- und Th2-Zellen in der frühen Immunmaturation
auf allergische Erkrankungen im Kindesalter:
Schutz vor allergischer Sensibilisierung bei Bauernhofexposition**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 01.03.2019

Ort, Datum

Elisabeth Sabine Klucker

Unterschrift Doktorandin