

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie/ Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die spätere allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in der jungen Maus**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctores medicinae (Dr. med.)  
Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anzhela Avagyan

aus Jerewan, Armenien

Gutachter:      1. Prof. Dr. med. Eckard Hamelmann  
                         2. Prof. Dr. med. M. Maurer  
                         3. PD Dr. med. Christian Taube

Datum der Promotion:      18.09.2009

# Inhaltsverzeichnis

	Seite	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Atopische Erkrankungen</b>	<b>7</b>
1.1.1	Epidemiologie atopischer Erkrankungen	7
1.1.2	Mögliche Ursachen der Zunahme atopischer Erkrankungen	7
1.1.3	Pathophysiologie atopischer Erkrankungen am Beispiel des Asthma bronchiale	8
<b>1.2</b>	<b>Das spezifische adaptive Immunsystem</b>	<b>9</b>
1.2.1	Entwicklung der Th1- und Th2-Effektorzellen	10
1.2.2	Th2-Zellen	10
1.2.3	Th1-Zellen	11
1.2.4	Regulatorische T-Zellen	11
<b>1.3</b>	<b>Primäre Prävention atopischer Erkrankungen</b>	<b>12</b>
1.3.1	Die „Hygiene-Hypothese“	12
1.3.1	Der „Farm-Effekt“	12
<b>1.4</b>	<b>Hypothese</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Protokolle zur Tierbehandlung</b>	<b>16</b>
2.1.1	Tierhaltung und Züchtung	16
2.1.2	Allergen-induzierte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung	16
2.1.3	Exposition mit Lipopolysacchariden	17
2.1.3.1	<i>Pränatale Exposition mit Lipopolysacchariden</i>	17
2.1.3.2	<i>Postnatale Exposition mit Lipopolysacchariden</i>	18
2.1.4	Präparation der Tiere	19
2.1.4.1	<i>Präparation am Tag 1 des Protokolls</i>	19
2.1.4.2	<i>Präparation am Tag 28 und 60 des Protokolls</i>	19
<b>2.2</b>	<b>Nachweis der allergischen Sensibilisierung</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Nachweis der allergen-induzierten Atemwegsentzündung</b>	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Messung der Atemwegsreaktivität <i>in vivo</i></b>	<b>23</b>

<b>2.5</b>	<b>Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach pränataler Exposition mit Lipopolysacchariden und postnataler Allergensensibilisierung</b>	<b>24</b>
2.5.1	Systemische allergenspezifische Immunantwort	24
2.5.1.1	<i>Isolierung der mononukleären Zellen der Milz</i>	24
2.5.1.2	<i>Antigenspezifische proliferative Antwort der Milzzellen in vitro</i>	25
2.5.1.3	<i>Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz</i>	25
2.5.1.4	<i>Differenzierung der T-Zellen aus der Milz</i>	26
2.5.2	Analyse der lokalen T-Zell-Antwort auf Ebene der Transkriptionsfaktoren in der Lunge	29
<b>2.6</b>	<b>Expression der Lipopolysaccharidrezeptoren in den Jungtieren nach pränataler Lipopolysaccharidexposition</b>	<b>30</b>
2.6.1	Analyse der löslichen Lipopolysaccharidrezeptoren	30
2.6.2	Expression der membranständigen Lipopolysaccharidrezeptoren im Lungengewebe	30
<b>2.7</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>31</b>
<b>2.8</b>	<b>Materialliste</b>	<b>31</b>
2.8.1	Tiere	31
2.8.2	Chemikalien	31
2.8.3	Verbrauchsmaterialien	34
2.8.4	Geräte	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf das Immunsystem nicht-sensibilisierter Jungtiere</b>	<b>36</b>
3.1.1	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die zelluläre Immunantwort am Tag der Geburt	36
3.1.2	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach der Neonatalzeit	36
3.1.2.1	<i>Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die Atemwege der nicht-sensibilisierten Jungtiere</i>	37
3.1.2.2	<i>Humorale und zelluläre Immunantwort in nicht-sensibilisierten Jungtieren nach pränataler Exposition mit Lipopolysacchariden</i>	37
3.1.2.3	<i>Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz in vitro in nicht-sensibilisierten Jungtieren nach pränataler Exposition mit Lipopolysacchariden</i>	39

<b>3.2</b>	<b>Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die allergen-bedingte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in den Jungtieren</b>	<b>40</b>
3.2.1	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die Immunglobulinproduktion nach systemischer Sensibilisierung	41
3.2.2	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die allergen-induzierte Atemwegsentzündung	42
3.2.3	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die allergen-induzierte Atemwegsentzündung	42
<b>3.3</b>	<b>Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die allergen-vermittelte zelluläre Immunantwort</b>	<b>44</b>
3.3.1	Allergen-spezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition	44
3.3.2	Allergen-spezifische Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach pränataler LPS-Exposition	44
3.3.3	Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die T-Zell-Differenzierung nach allergischer Sensibilisierung	45
3.3.4	Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die Expression der Transkriptionsfaktoren für die T-Zell-Differenzierung in OVA-sensibilisierten Tieren	46
<b>3.4</b>	<b>Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die angeborene Immunantwort</b>	<b>47</b>
3.4.1	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die löslichen Lipopolysaccharid-Rezeptoren Lipopolysaccharid-bindendes Protein und CD14	47
3.4.2	Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die Expression der Membran gebundenen Pattern-Recognition-Rezeptoren im Lungengewebe	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
	<b>Anhang</b>	<b>65</b>
<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>65</b>

<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>Danksagung</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>Publikationen</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung an Eides Statt</b>	<b>77</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Atopische Erkrankungen

### 1.1.1 Epidemiologie atopischer Erkrankungen

Atopische Erkrankungen, wie die atopische Dermatitis, die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale, stellen ein zunehmendes Gesundheitsproblem in den westlichen Industrienationen dar. Vor nur 100 Jahren zählten Allergien in Deutschland und anderen europäischen Ländern zu den seltenen Erkrankungen; der dramatische Anstieg ihrer Inzidenz und Prävalenz in den letzten 30 Jahren hat sie heute zur „Epidemie des 21. Jahrhunderts“ (Isolauri 2004) werden lassen: Schätzungsweise 15 bis 30% der allgemeinen und 20 bis 25% der deutschen Bevölkerung leiden an einer allergischen Erkrankung, im Kindesalter stellen Allergien die häufigsten aller chronischen Erkrankungen dar. Daten aus der multizentrischen Allergiestudie „MAS“ zeigen, dass in Deutschland etwa 10% aller Säuglinge von einer atopischen Dermatitis und 8% aller Schulkinder von einem allergischen Asthma bronchiale betroffen sind (Nickel 2002); 25% aller Erwachsenen leiden an einer allergischen Rhinokonjunktivitis. Allgemein anerkannt ist, dass es sich bei der Zunahme der Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen um eine wahre Zunahme der Allergiehäufigkeit handelt, die sich nicht allein auf eine erhöhte Aufmerksamkeit gegenüber diesen Erkrankungen oder bessere diagnostische Möglichkeiten begründet (Burney 1990, Gergen 1992).

### 1.1.2 Mögliche Ursachen der Zunahme atopischer Erkrankungen

Voraussetzung für die Entwicklung einer allergischen Entzündung ist die Exposition eines suszeptiblen Organismus mit einem Allergen; ein nicht suszeptibler, „gesunder“ Organismus dagegen entwickelt keine Entzündungsreaktion auf ein harmloses Umweltantigen, er zeigt die physiologische Reaktion des Immunsystems, die spezifische Toleranz gegenüber diesem Allergen.

Bisher bekannt ist, dass die Suszeptibilität eines Organismus auf einer genetischen Prädisposition basiert, der so genannten Atopie, die für die Dysregulation und die dadurch initiierte Imbalance der zellulären Immunantwort gegenüber Allergenen verantwortlich ist (Kabesch 2006). Allergien sind jedoch keine monogenen Erkrankungen; sie gehören zu jenen komplexen Erkrankungen, die auf der Interaktion einer zurzeit nicht

bekannten Anzahl von Genen basieren. Jedes der Gene trägt wahrscheinlich nicht mehr als 3 bis 4% zum Phänotyp der Erkrankung bei.

Da sich der genetische Hintergrund in einer Population in einer Periode von weniger als 100 Jahren nicht wesentlich verändert haben kann, werden für den erheblichen Anstieg der Inzidenz allergischer Erkrankungen vor allem veränderte Umweltfaktoren verantwortlich gemacht. Als maßgeblich werden hier Faktoren des „westlichen Lebensstils“ wie Luftschadstoffe, verstärkte Allergenexpositionen infolge des Klimawandels mit der zunehmenden Erderwärmung und der dadurch verlängerten Pollensaison, gegenwärtige Ernährungsgewohnheiten, Impfprogramme sowie die verbesserten Hygienebedingungen und damit die Abnahme von Infektionskrankheiten diskutiert (Liu 2006). Diese verschiedensten Umweltfaktoren können möglicherweise Expressionsmuster beteiligter Gene beeinflussen. Die Suszeptibilität eines Organismus gegenüber allergischen Erkrankungen basiert dementsprechend auf einem regulatorischen Netzwerk von Gen-Gen-, Umwelt-Gen- und Umwelt-Umwelt-Interaktionen, die das Immunsystem schon während seiner Entwicklung prägen.

### 1.1.3 Pathophysiologie atopischer Erkrankungen am Beispiel des Asthma bronchiale

Die allergische Reaktion vom Typ 1 nach Coombs und Gell (1963) stellt eine Fehlregulation des adaptiven zellulären Immunsystems dar, charakterisiert durch eine überschießende Reaktion auf ein normalerweise harmloses Umweltantigen, dem Allergen. Zu den Erkrankungen, die mit einer Allergie vom Typ 1 einhergehen, gehört das allergische Asthma bronchiale, eine rezidivierend auftretende, Obstruktion der Atemwege, die durch eine eosinophile Entzündung und vermehrte Mucusproduktion der Bronchialschleimhaut sowie eine Hyperreaktivität der glatten Atemwegsmuskulatur nach Kontakt mit einem entsprechenden Allergen hervorgerufen wird.

Ein erster Allergenkontakt führt zunächst zur allergischen Sensibilisierung, die allergische Entzündung entwickelt sich nach einem folgenden Allergenkontakt.

Bei einem ersten Kontakt wird das Allergen direkt über die Haut, inhalativ über die Schleimhäute der Atemwege oder oral über die des Gastrointestinaltraktes von ortständigen Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) phagozytiert. Die anschließende Antigenpräsentation an naive T-Zellen induziert die Entwicklung allergenspezifischer T- und B-Zellen. Eine überschießende sogenannte T-Helfer-2- (Th2-) Immunantwort führt

zur Produktion der Schlüsselzytokine Interleukin (IL-)4 und -13, die in B-Zellen einen Immunglobulin- (Ig-)Klassenwechsel und damit eine erhöhte IgE-Produktion induzieren. Allergenspezifische IgE-Moleküle binden an Mastzellen und basophile Granulozyten und sensibilisieren so diese Zellen. Bei einem nachfolgenden Allergenkontakt führt die durch Allergenbindung induzierte Kreuzvernetzung mindestens zweier IgE-Moleküle auf den sensibilisierten Zellen zu deren Aktivierung. Mastzellen und basophile Granulozyten setzen daraufhin Mediatoren wie Histamin frei und führen so im Rahmen der allergischen Sofortreaktion zur Kontraktion der Bronchialmuskulatur und zum Ödem der Bronchialschleimhaut; Mediatoren wie Leukotriene tragen durch Chemotaxis allergenspezifischer T-Zellen zur Spätreaktion, der eosinophilen Atemwegsentzündung, bei. Das nun von Th2-Zellen lokal überschießend produzierte Zytokin IL-5 induziert maßgeblich die nachfolgende Akkumulation eosinophiler Granulozyten und die vermehrte Schleimproduktion in den Atemwegen (kürzlich zusammengefasst in (Coffmann 2006)).

## **1.2 Das spezifische adaptive Immunsystem**

Allergien sind als „Th2-dominierte Erkrankungen“ Erkrankungen des adaptiven zellulären Immunsystems. Das adaptive Immunsystem soll den Organismus spezifisch vor körperfremden Molekülen, vor Infektionen oder entdifferenzierten körpereigenen Zellen schützen. Die Strukturen, die die zellulären sowie humoralen Abwehrmechanismen des Organismus aktivieren, werden Antigene genannt. Da es keinen grundsätzlichen Unterschied im Aufbau körperfremder und -eigener bzw. gefährlicher und ungefährlicher Antigene gibt, ist das Immunsystem von komplexen Regulationsmechanismen abhängig, die darüber entscheiden, welche Form der Immunantwort induziert wird.

T-Zellen sind die maßgeblichen Zellen des adaptiven Immunsystems höher entwickelter Organismen. Sie entwickeln sich im Thymus und exprimieren zur Antigenerkennung den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf ihrer Oberfläche. Zytotoxische T-Zellen exprimieren cluster of differentiation (CD)8-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die als Ko-Rezeptoren major histocompatibility complex (MHC)-Klasse I-Moleküle körpereigener Zellen erkennen. Sie sind unter anderem für die Erkennung und Vernichtung virusinfizierter Zellen zuständig. T-Helfer-(Th-)Zellen exprimieren CD4-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die als Ko-Rezeptoren MHC-Klasse II-Moleküle körpereigener Zellen erkennen. Es werden nach ihrem Zytokinsekretionsprofil zunächst zwei Th-Zelltypen unterschieden: Th1-Zellen produzieren die Zytokine IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-)β und Interferon

(IFN- $\gamma$ , und sind für die Abwehr intrazellulärer Erreger wie Viren oder Mykobakterien entscheidend. Th2-Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13, stimulieren B-Zellen zur IgE-Produktion und vermitteln so die Abwehr gegen Parasiten einerseits und allergische Reaktionen andererseits. Übergangsformen zwischen diesen beiden T-Zell-Typen existieren insbesondere im humanen Immunsystem (Umetsu 1997; Dumoutier 2000).

### 1.2.1 Entwicklung der Th1- und Th2-Effektorzellen

Den Thymus verlassen naive CD4<sup>+</sup> Th-Zellen, deren weitere Differenzierung in der Peripherie erfolgt. Prinzipiell ist die Antigenpräsentation durch DCs oder andere antigenpräsentierende Zellen (APCs) maßgeblicher Schritt in der Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> Zellen in Th1- oder Th2-Effektorzellen und damit grundlegend für die Polarisierung der adaptiven zellulären Immunantwort. Nach Phagozytose eines Fremdartigen migrieren unreife, phagozytierende DCs der Haut und Schleimhäute über Blut und Lymphe in die sekundär lymphatischen Organe und differenzieren dabei zu reifen APCs. In den sekundär lymphatischen Organen bilden sie eine immunologische Synapse mit naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen: Sie präsentieren das am Ort des Antigeneintritts phagozytierte, anschließend prozessierte und an MHC-Moleküle gebundene Antigen dem entsprechenden TCR, sezernieren Zytokine, die an die jeweiligen Zytokinrezeptoren der T-Zellen binden, und exprimieren kostimulatorische Signale, die mit den entsprechenden Ko-Rezeptoren auf den T-Zellen interagieren.

### 1.2.2 Th2-Zellen

In Gegenwart unter anderem des Th2-Zytokins IL-4 selbst führt die allergeninduzierte Aktivierung reifer CD8a<sup>-</sup> myeloider DCs der Lunge zur Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th2-Zellen. IL-4 aktiviert dabei über den IL-4-Rezeptor eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren signal transducer and activator of transcription (STAT)6 und nachfolgend zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA3 führt. Beide Transkriptionsfaktoren veranlassen spezifisch die Transkription der Th2-Zytokine IL-4, -5 und -13 (Hoshino 2004; Weidinger 2004). Die die Th2-Immunantwort charakterisierenden Zytokine IL-4 und IL-13 induzieren den Isotypenwechsel in B-Zellen hin zur IgE-Produktion, IL-4 aktiviert zusätzlich Mastzellen, und IL-5 vermittelt die Amplifikation und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten als Schlüsselzellen der allergischen Entzündung (Umetsu 1997).

### 1.2.3 Th1-Zellen

Phagozytierende Zellen wie Makrophagen und DCs sind die wesentlichen Zellen der angeborenen unspezifischen Abwehr. Insbesondere plasmazytoide (p)DCs exprimieren pattern recognition receptors (PPRs) wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs) für so genannte microorganism associated molecular patterns (MAMPs), invariante und konsistente molekulare Strukturen von Mikroorganismen, vor allem Bakterien. Die Aktivierung der PPRs führt MAMP-abhängig zur Signaltransduktion und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12 und die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40 und CD80/CD86 veranlasst (kürzlich zusammengefasst von (Kaisho 2006)). Nach Aktivierung durch intrazelluläre Pathogene produzieren reife CD8a<sup>+</sup> pDCs unter anderem IL-12, IL-23 und IFN- $\alpha$ . IL-12 aktiviert über die  $\beta$ 2-Untereinheit des IL-12-Rezeptors der CD4<sup>+</sup> Th-Zelle Jak2 und damit nachgeschaltet STAT4, das wahrscheinlich über eine direkte Wirkung auf den IFN- $\gamma$ -Promotor die IFN- $\gamma$ -Produktion induziert. IL-12 kann STAT4 zusätzlich über die Aktivierung der MAPK p38 aktivieren und verstärkt so die Th1-Immunantwort. Das autokrin von T-Zellen sezernierte IFN- $\gamma$  aktiviert über den IFN- $\gamma$ -Rezeptor der T-Zelle JAK1, die die Transkriptionsfaktoren STAT1 und diesem nachgeschaltet T-box expressed in T-cells (T-bet) aktiviert. T-bet dient als „master controller“ der Th1-Immunantwort vor allem ihrer Aufrechterhaltung und wirkt wahrscheinlich indirekt durch Suppression von GATA3 (Usui 2006). Das die Th1-Immunantwort charakterisierende Zytokin IFN- $\gamma$  aktiviert im Rahmen der Abwehr gegen Bakterien, Pilze und Viren Makrophagen und stimuliert B-Zellen zur IgG-Produktion (Umetsu 1997).

### 1.2.4 Regulatorische T-Zellen

Physiologischerweise reagiert das Immunsystem nicht auf körpereigene Moleküle (Autoantigene) oder harmlose Umweltantigene. Nach dem heutigen Wissensstand wird dieses Phänomen der (antigenspezifischen) Toleranz durch so genannte regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Tregs) vermittelt. T-Zellen, die körpereigene Moleküle erkennen, werden während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Prozess der sogenannten „negativen Selektion“ beseitigt. Natürlicherweise vorkommende Tregs (nTregs) entwickeln sich durch positive Selektion im Thymus, unterscheiden Fremd- von Selbstantigenen und wirken antigenunabhängig immunsuppressiv. Ihre Bedeutung liegt vor allem in der Verhinderung der Autoimmunität. Als Marker exprimieren sie konstitutiv CD25, die IL-2-

Rezeptor- $\alpha$ -Kette, und den Transkriptionsfaktor forkhead box protein (Foxp)3. Neben den nTregs entwickeln sich in der Peripherie nach Kontakt mit einem Fremdantigen aus bisher nicht eindeutig bekannten (CD25<sup>-</sup>) Vorläuferzellen eine heterogene Gruppe adaptiver, antigenspezifischer Tregs (aTregs). Ihre Identifikation ist schwierig, da sie CD25 und Foxp3 erst im Laufe ihrer Entwicklung und nur zum Teil exprimieren (Li 2006). Einige aTregs exprimieren GATA3, den „master controller“ der Th2-Immunantwort, und Foxp3 und produzieren IL-10 (Akbari 2002), andere exprimieren Foxp3 und produzieren TGF- $\beta$  (Ostroukhova 2004); eine weitere Gruppe der aTregs exprimieren T-bet als „master controller“ der Th1-Immunantwort und Foxp3 und produzieren IL-10 und IFN- $\gamma$  (Stock 2004). Atregs vermitteln antigenspezifisch Toleranz gegenüber harmlosen Fremdantigenen, wie den Allergenen.

### **1.3 Primäre Prävention atopischer Erkrankungen**

#### 1.3.1 Die „Hygiene-Hypothese“

Die von Strachan 1998 geprägte „Hygiene-Hypothese“ ist aktuell die populärste Erklärung für die hohe Prävalenz allergischer Erkrankungen in Ländern mit einem westlichen Lebensstil: Der hohe westliche Lebensstandard ist verbunden mit einem Leben in kleinen Familien, mit einer geringeren Häufigkeit von Infekten und einem frühen Einsatz antibiotischer Therapien, so dass das sich entwickelnde Immunsystem eine nur geringe Stimulation durch mikrobielle Antigene erfährt. Folge ist die Imbalance des Immunsystems mit einem Übergewicht der Th2-gerichteten Immunantwort (Strachan 1998, Liu 2006). Der „Hygiene-Hypothese“ folgend, wurde die Stimulation des Immunsystems durch die Exposition mit bestimmten Bakterien (Herz 1998, Grüber 2006), Würmern (Dittrich 2008) oder Viren (Illi 2001) in tierexperimentellen und epidemiologischen Studien als potentiell protektiv gegenüber der Entwicklung allergischer Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale beschrieben.

#### 1.3.2 Der „Farm-Effekt“

Der so genannte „Farm-Effekt“, der auf eine in frühester Kindheit beginnende, intensive Exposition mit organischen Stäuben und damit auch einer Vielzahl mikrobieller Antigene wie sie vor allem in Ställen auf Bauernhöfen vorkommen, zurückgeht, gehört zu den am besten beschriebenen Umweltfaktoren, die mit einem verminderten Atopierisiko assoziiert sind (Schaub 2006). In der Maus konnte gerade kürzlich belegt werden, dass organische Stäube von Bauernhöfen eine allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung

dung verhindern (Peters 2006). Zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien haben insbesondere den allergiepräventiven Effekt von Lipopolysacchariden (LPSs), Wandbestandteile gramnegativer Bakterien, als potentiell immunmodulatorisch wirksame Einzelkomponente organischer Stäube untersucht.

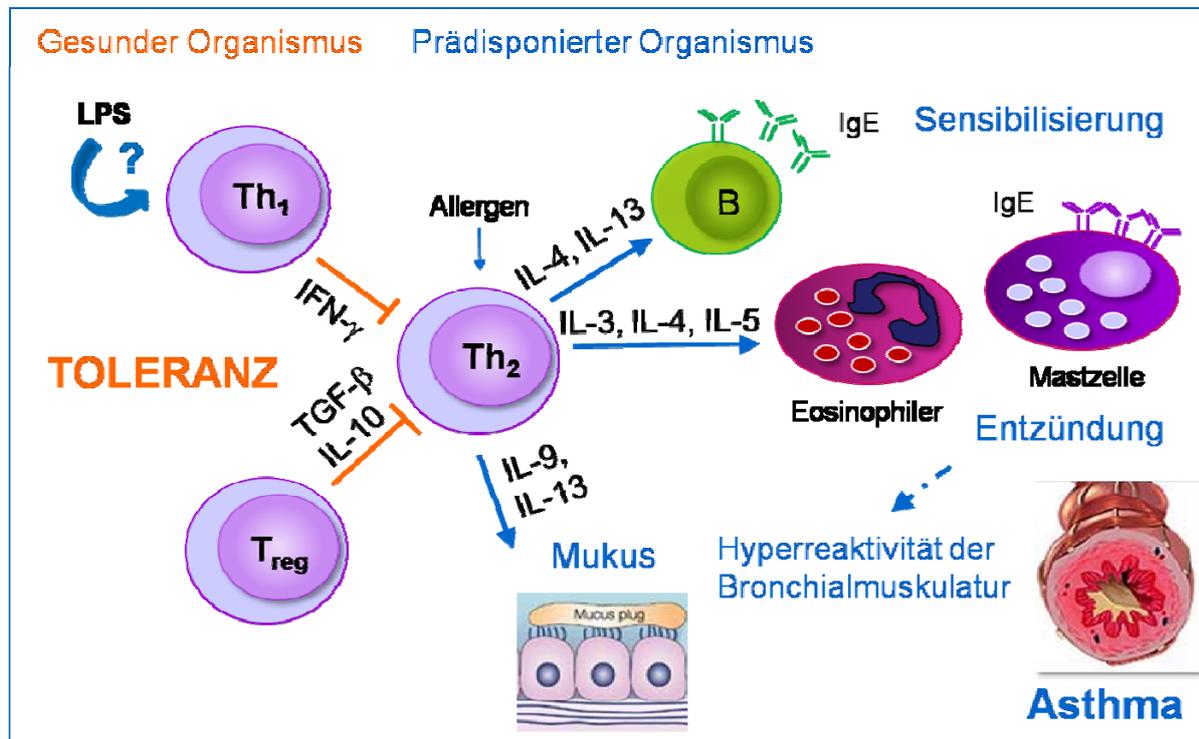
LPSs binden im Serum an ihre löslichen Rezeptoren LPS-bindendes Protein (LBP) und CD14 und aktivieren im Komplex mit ihren Trägermolekülen, die katalytisch wirken, TLR-4. Die intrazelluläre Domäne des TLR-4 wird von dem Adaptermolekül MyD88 getragen, das unter anderem mit der zytoplasmatischen Proteinkinase IL-1 receptor associated kinase (IRAK)4 assoziiert ist. Die Aktivierung von TLR-4 führt über MyD88 zur Aktivierung von IRAK4 und weiteren Proteinkinasen (TRAF6, TAK1, IKK $\beta$ ), die nach Phosphorylierung von I $\kappa$ B zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen (Kaisho 2006). Humane Studien liefern Hinweise dafür, dass eine verminderte Ansprechbarkeit von DCs auf LPSs infolge von Polymorphismen für CD14 und TLR-4 mit einem erhöhten Atopierisiko assoziiert ist (zusammengefasst in (Yang 2006)). In unseren vorausgegangenen Arbeiten führte eine lokale und systemische LPS-Exposition in der adulten Maus IL-12-abhängig zur Suppression einer nachfolgenden allergischen Sensibilisierung und Atemwegsentzündung (Gerhold 2002). In der neonatalen Maus verhinderte die alleinige repetitive Exposition mit LPS über die Atemwege zwar nicht eine spätere allergische Sensibilisierung, in Kombination mit einer Allergen spezifischen Toleranzinduktion führte sie jedoch zur Induktion einer unspezifischen Th1-Immunantwort, die die Suszeptibilität eines Organismus gegen eine Vielzahl von Allergenen vermindern könnte (Gerhold 2003). Wang et al. zeigten darüber hinaus in einem ähnlichen Modell die Entwicklung regulatorischer, Toleranz induzierender T-Zellen nach repetitiver Gabe von LPS und Ovalbumin (OVA) in der Neonatalzeit und späterer Sensibilisierung (Wang 2006).

#### **1.4 Hypothese**

Der genaue Zeitpunkt der allergischen Sensibilisierung ist derzeit strittig und wird in zahlreichen epidemiologischen, klinischen und tierexperimentellen Studien intensiv untersucht. Bereits 1992 konnte gezeigt werden, dass eine mütterliche Atopie das Risiko für ein Kind, eine atopische Dermatitis zu entwickeln, stärker erhöht als eine väterliche Atopie (Ruiz 1992). Sowohl genetische Faktoren als auch das mütterliche Milieu während der Schwangerschaft könnten diesen Effekt erklären. Kürzlich erhobene Daten zeigen, dass allergen-spezifisches IgE im Nabelschnurblut am ehesten Folge eines

Transfers dieser Antikörper von atopischer Mutter zum Kind ist und nicht eine intrauterine Sensibilisierung reflektiert (Bonnelykke 2008). In einem Mausmodell konnte andererseits gezeigt werden, dass Nachkommen nach Transfer allergenspezifischer T-Zellen in naive trächtige Muttertiere eine verstärkte allergenspezifische Atemwegsentzündung und Th2-Immunantwort entwickeln (Hubeau 2006). Die Hypothese, dass das mütterliche Milieu entscheidend zur Entwicklung einer atopischen Erkrankung beim Kind beiträgt, unterstützen auch Daten zu IgG-Antikörpern, die über die Placenta übertragen werden und wahrscheinlich als blockierende Antikörper eine antiallergische Wirkung vermitteln. Die Höhe der IgG-Antikörpertiter im Nabelschnurblut korrelierte hierbei entgegengesetzt zur Höhe der IgE-Serumtiter und der Häufigkeit atopischer Symptome bei Kindern im Alter von 8 Jahren (Jenmalm 2000). Die Schwangerschaft stellt diesen Daten zufolge also ein mögliches zeitliches „Fenster“ zur primären Prävention atopischer Erkrankungen durch Immunmodulation dar. Nach unseren Daten zur protektiven Wirkung der Exposition mit LPS in der Neonatalzeit auf die Entwicklung einer späteren allergenbedingten Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in der Maus lautete unsere Arbeitshypothese zu dem vorliegenden Projekt, dass eine pränatale Exposition mit LPS durch Induktion einer fetalen Th1-Immunantwort eine spätere allergenbedingte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in den Jungtieren verhindern kann (Abbildung 1). Zur Prüfung dieser Hypothese wurde der Einfluss einer pränatalen Exposition mit LPS auf eine mögliche Hemmung der Entwicklung einer (1) Th2-Immunantwort, (2) allergischen Atemwegsentzündung und (3) Atemwegshyperreaktivität sowie die mögliche Induktion einer Th1-Immunantwort in den Nachkommen in unserem Mausmodell für die allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung untersucht. Das Mausmodell ist für die Untersuchung dieser Fragestellung besonders geeignet, da einerseits eine Vielzahl immunologischer Werkzeuge und Antikörper zur Analyse zur Verfügung stehen, andererseits die zelluläre Immunreaktion des murinen Immunsystems in eine Th1- und Th2-Immunantwort differenziert werden kann (Mosmann et al., 1989; Taube et al., 2004). In unserem Modell wurden BALB/c-Mäuse als genetisch determinierte IgE-„high-responder“ eingesetzt, da sie nach einer allergischen Sensibilisierung größere Mengen an OVA-spezifischen IgE produzieren und eine stärkere eosinophile Atemwegsentzündung als andere Mäusestämme zeigen (Holt, 1981). Die Ergebnisse der Studie können dazu beitragen, Interaktionen zwischen Umwelteinflüssen und dem adaptiven Immunsystem insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Allergien zu klären, um so

neue Konzepte zur primären Prävention atopischer Erkrankungen, der „Epidemie des 20. Jahrhunderts“ (Isolauri 2004), zu entwickeln.



**Abbildung 1: Hypothese.** In einem prädisponierten Organismus führt die Exposition mit einem Allergen zur Entwicklung von Th<sub>2</sub>-Zellen, die die Zytokine IL-4 und IL-13 produzieren und dadurch den Switch zur IgE-Produktion in B- bzw. Plasmazellen und die allergische Sensibilisierung induzieren. Die Zytokine IL-3, IL-4 und IL-5 sorgen für die Akkumulation eosinophiler Granulozyten ins Gewebe und sind damit für die allergische Entzündung verantwortlich. Die Zytokine IL-13 auch IL-9 induzieren eine vermehrte Schleimproduktion. Im Bereich der Atemwege resultiert infolge der entzündlich veränderten Schleimhaut, der vermehrten Schleimproduktion und einer verstärkten Muskelkontraktion eine bronchiale Obstruktion, die zu dem klinischen Bild des Asthma bronchiale führt. Im gesunden Organismus verhindern dagegen die natürlichen Antagonisten der Th<sub>2</sub>-Immunantwort, Th<sub>1</sub>- und regulatorische T-Zellen, ein Übergewicht der Th<sub>2</sub>-Zellen. Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass eine pränatal beginnende Exposition mit LPS Th<sub>1</sub>-Zellen in den Jungtieren induziert und so eine spätere allergenvermittelte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung verhindert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Protokolle zur Tierbehandlung

#### 2.1.1 Tierhaltung und Züchtung

BALB/c-Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) zu je 6 bis 8 Tieren unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF-Haltung) in klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 61 % gehalten. Durch eine automatische Beleuchtungsanlage wurde ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden vorgegeben. Die Tiere erhielten OVA-freies Futter und Wasser ad libitum. Sie wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen den Versuchsprotokollen gemäß behandelt. Die Behandlung und Tötung der Tiere war beim Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und technische Sicherheit, Berlin, angezeigt und genehmigt worden.

Die Zuchttiere wurden von der Firma Harlan Winkelmann bezogen. Zur Verpaarung wurden jeweils eine männliche Maus und zwei weibliche Mäuse in einen Käfig gesetzt. Wurde anschließend ein Schleimpfropf am Vaginausgang des Weibchens festgestellt, so hat die Paarung stattgefunden und die folgenden 24 Stunden galten als Tag 0 der Trächtigkeit, entsprechend Tag -21 des Protokolls. Für die Stillperiode wurden die Jungtiere bei der Mutter belassen, danach wurden sie nach Männchen und Weibchen separiert.

#### 2.1.2 Allergen-induzierte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung

*Prinzip:* Systemische repetitive Allergenapplikation und anschließende repetitive Allergenprovokation über die Atemwege

Die allergen-induzierte Sensibilisierung der BALB/c-Maus erfolgte systemisch mit dem Modelallergen OVA nach einem in unserem Labor etablierten Protokoll (Gerhold 2002). Eine allergen-vermittelte Atemwegsentzündung wurde mittels repetitiver Allergenprovokationen über die Atemwege induziert.

*Durchführung:*

Die systemische Sensibilisierung der Jungtiere wurde am 28. Lebenstag, Tag 28 des Protokolls, begonnen. Es erfolgten sechs intraperitoneale (i.p.) Injektionen von jeweils  $10\ \mu\text{g}$  OVA (Grad VI) in einem Volumen von  $100\ \mu\text{l}$  pro Tier in regelmäßigen Abständen

innerhalb von 14 Tagen. Kontrollen für die allergen-vermittelte Sensibilisierung erhielten einen isotonen Phosphatpuffer (phosphate buffer saline, PBS, 100 µl/Maus, i.p. Abbildung 2).

Inhalative Allergenprovokationen wurden an den Tagen 56, 57 und 58, also 14 Tage nach der letzten intraperitonealen Injektion beginnend, durchgeführt. Die Tiere aller Studiengruppen wurden in einer Acrylnebelkammer mit OVA 1 % (Grad V, 100 mg/ 10 ml PBS), das über einen Jet-Nebulizer in eine lungengängige Tröpfengröße von 1 – 2 µm aerosolisiert und über einen Kompressor in die Kammer geführt wurde, über 20 Minuten exponiert (Abbildung 2).

### 2.1.3 Exposition mit Lipopolysacchariden

*Prinzip:* Repetitive Exposition mit Lipopolysacchariden über die Atemwege

Der Effekt einer repetitiven pränatalen und postnatal fortgeführten Exposition mit aerosolisiertem LPS wurde auf eine spätere allergen-induzierte Sensibilisierung und Atemwegsentszündung in den Jungtieren untersucht.

*Durchführung:*

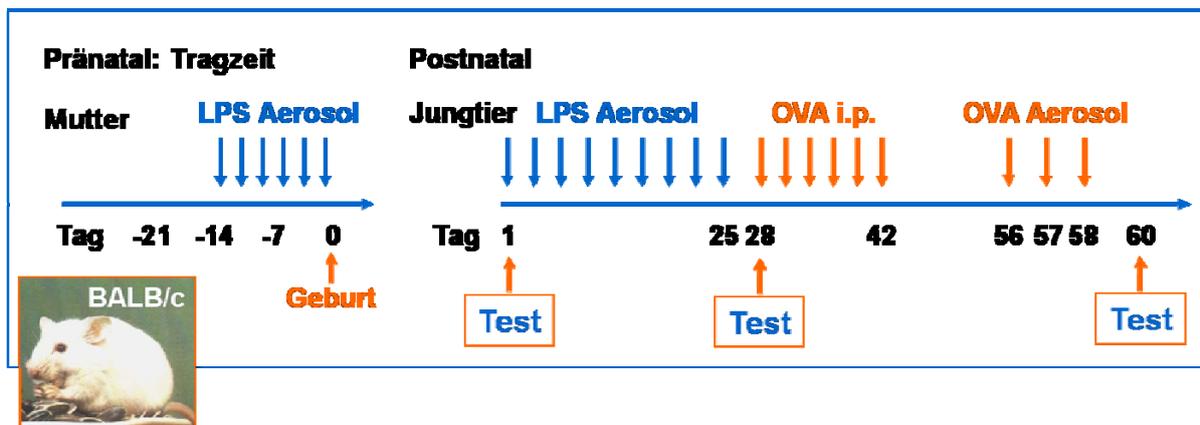
BALB/c-Mäuse wurden in eine Acrylnebelkammer gesetzt, an die wiederum der Jet-Nebulizer angeschlossen wurde. Hierüber wurde aerosolisiertes LPS mit einer lungengängigen Tröpfchengröße von 1 – 2 µm in einer Konzentration von 0,1 µg/ ml in einem Volumen von 10 ml über 10 min. in die Kammer geleitet. Kontrolltiere wurden jeweils in einer extra für die Placebo-Expositionen reservierten Nebelkammer mit aerosolisiertem LPS-freiem PBS (10 ml) über 10 min. placebo-exponiert.

#### 2.1.3.1 Pränatale Exposition mit Lipopolysacchariden

Zur pränatalen Exposition wurden trächtige BALB/c-Mäuse vom 7. Tag der Tragzeit, Tag -14 des Protokolls, an in regelmäßigen Abständen dreimal wöchentlich mit LPS exponiert, so dass die trächtigen Tiere bei einer Tragzeit von 21 Tagen sechsmal exponiert wurden. Trächtige Kontrolltiere wurden zu den gleichen Zeitpunkten mit PBS placebo-exponiert (Abbildung 2). Einige Jungtiere wurden direkt am Tag der Geburt analysiert (Tag 1 des Protokolls).

### 2.1.3.2 Postnatale Exposition mit Lipopolysacchariden

Einige Jungtiere wurden vom Tag der Geburt an, Tag 1 des Protokolls, bis zum Tag 25 in regelmäßigen Abständen dreimal wöchentlich, insgesamt neunmal, mit LPS exponiert (Abbildung 2). Junge Kontrolltiere wurden zu den gleichen Zeitpunkten mit PBS placebo-exponiert. Da wir in vorausgegangenen Versuchen zeigen konnten, dass die alleinige postnatale LPS-Exposition keinen supprimierenden Effekt auf eine spätere allergenvermittelte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung zeigt (Gerhold, 2003), wurde diese Gruppe in der aktuellen Arbeit nicht mit berücksichtigt.



**Abbildung 2: Pränatal beginnende und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS vor allergischer Sensibilisierung der Jungtiere.** Trächtige BALB/c-Mäuse wurden vom Tag 7 der Tragzeit (Tag -14 des Protokolls) bis zur Entbindung mit aerosolisiertem LPS (1 µg/ 10 ml, Escherichia coli 0111:B4) dreimal wöchentlich exponiert. Bei einigen der Nachkommen wurde diese LPS-Exposition postnatal vom Tag 1 (Tag der Geburt) bis zum Tag 25 dreimal wöchentlich fortgeführt. Zwischen Tag 28 und Tag 42 wurden die Jungtiere systemisch mit OVA sensibilisiert (10µg/ 100µl/ Maus/ Dosis, 6 x, i.p.). Zur Induktion einer allergenbedingten Atemwegsentzündung erfolgten bei allen Tieren an den Tagen 56, 57 und 58 Provokationen mit OVA (100 mg/ 10 ml, 20 min./ Tag) über die Atemwege. Die Analyse der Tiere fand am Tag 60 statt. Einige Jungtiere wurden vor der Sensibilisierungsphase an den Tagen 1 und 28 des Protokolls analysiert.

#### 2.1.4 Präparation der Tiere

Die Analysen der Jungtiere fanden an den Tagen 1 und 28 des Protokolls vor systemischer Sensibilisierung mit Ovalbumin sowie am Tag 60 nach systemischer Sensibilisierung und Allergenprovokationen über die Atemwege statt.

##### 2.1.4.1 Präparation am Tag 1 des Protokolls

Die Jungtiere am Tag 1 nach Geburt wurden durch Dekapitation getötet. Das Blut wurde aus den Halsgefäßen gewonnen. Nach Zentrifugation des Vollblutes (1200 g, 10 min.) wurde das Serum abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung in 1-ml-Reaktionsgefäße eingefroren. Durch Kanülierung des Magens wurde die erste Muttermilch gewonnen, die ebenfalls bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung in 1-ml-Reaktionsgefäße eingefroren wurde. Nach Hautdesinfektion mit Propanol und Eröffnung des Abdomens wurde die Milz entnommen.

##### 2.1.4.2 Präparation am Tag 28 und 60 des Protokolls

Zur Gewinnung von Serum wurde den Tieren am Tag 28 und 60 des Protokolls 500 µl Blut aus den Schwanzvenen entnommen. Nach Zentrifugation des Vollblutes bei 1200 g über 10 Minuten wurde das Serum abgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung in 1-ml-Reaktionsgefäße eingefroren. Zur weiteren Analyse wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach Hautdesinfektion mit Propanol erfolgten unter sterilen Bedingungen die bronchoalveoläre Lavage, die Entnahme der Lunge nach Thorakotomie sowie die Entnahme der Milz nach Eröffnung des Abdomens.

## 2.2 Nachweis der allergischen Sensibilisierung

*Prinzip:* Quantifizierung der Immunglobuline aus dem Serum

Die Produktion des Immunglobulins (Ig) E wird in der Maus durch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 induziert, die Produktion des IgG2a durch das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$ . Das allergenspezifische IgE stellt dementsprechend ein Maß für die allergen-vermittelte Sensibilisierung dar. Gesamt- und allergenspezifische Immunglobuline wurden aus dem Serum der sensibilisierten und placebo-sensibilisierten Tiere mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) quantifiziert.

Beim ELISA wird eine Mikrotiterplatte mit einem primären Antikörper, der gegen das zu bestimmende Immunglobulin gerichtet ist, beschichtet; danach wird die Serumprobe

aufgetragen. Anschließend bindet der sekundäre biotinierte Antikörper an das am primären Antikörper gebundene Immunglobulin in den Proben. Das Enzym Streptavidinperoxidase bindet an den biotinierten Anteil des sekundären Antikörpers. In einer Redoxreaktion setzt dieses Enzym das Substrat, der Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in ein Cyanin um. Als Oxidationsmittel fungiert Wasserstoffperoxid. Das entstandene Cyanin führt zu einem Farbumschlag nach blau. In einem definierten Zeitrahmen wird durch die Zugabe von Schwefelsäure eine pH-Senkung herbeigeführt. Dadurch kann das Enzym nicht mehr arbeiten und die Reaktion wird gestoppt. Dies verursacht einen Farbumschlag von blau nach gelb. Mittels eines Photometers wird die Extinktion (Testfilter 450 nm, Referenzfilter 490 nm) gemessen. Die Konzentrationen des zu bestimmenden Immunglobulins werden durch Vergleich mit einer bekannten Standardkonzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

#### *Durchführung:*

Eine 96-well-Rundbodenplatte wurde mit dem primären Antikörper gegen das jeweilige Gesamtimmunglobuline (2 µg/ml in PBS, pH7, 50 µl/well) und direkt mit OVA (20 µg/ml, in PBS, pH7, 50 µl/well) für die OVA-spezifischen Immunglobuline beschichtet und bei +4°C über Nacht inkubiert. Nach Eliminierung des überschüssigen Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit einem Waschpuffer wurden unspezifische Bindungen mit einem Blockpuffer gesättigt (150 µl/well, 120 min., Schüttler, Raumtemperatur (RT)). Nach zweimaligen Waschen wurden die zu messenden Proben, die definierten Standards, die laborintern mittels Seren OVA-sensibilisierter Tiere generiert worden waren, eine Negativkontrolle (PBS, pH7, in Dreifachbestimmung) und eine ebenfalls laborintern generierte Positivkontrolle in jeweils einem Volumen von 50 µl/well aufgetragen. Die Inkubation erfolgte wiederum bei +4°C über Nacht. Durch viermaliges Waschen wurden die nicht gebundenen Proben entfernt und anschließend der sekundäre biotinierte Antikörper auf die Platte gegeben (2.5 µg/ml, 50 µl/well, 60 min., RT, Schüttler). Die Platten wurden achtmal gewaschen und das Enzym Streptavidinperoxidase in einer Verdünnung von 1:10.000 aufgetragen (50 µl/well, 30 min., RT, im Dunkeln). Nach einer Inkubationszeit von 30 min. wurden die Platten nochmals achtmal gewaschen und das Substrat TMB, 1:100 in Galatti-Puffer verdünnt, auf die Platte gegeben (150 µl/well, RT, im Dunkeln). Die einsetzende Redox-Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure nach ca. 15-30 Minuten beendet (50 µl/well).

Die Seren der sensibilisierten Tiere wurden in Abhängigkeit von dem zu bestimmenden Immunglobulin wie folgt mit PBS, pH 7, verdünnt:

- Gesamt-IgE 1:100
- Gesamt-IgG2a 1:10 000
- OVA-spezifisches IgE 1 : 2
- OVA-spezifisches IgG2a 1 : 100

Die Seren der placebo-sensibilisierten Tiere wurden folgendermaßen verdünnt:

- Gesamt-IgE 1:10
- Gesamt-IgG2a 1:10 000
- OVA-spezifisches IgE 1 : 2
- OVA-spezifisches IgG2a 1 : 5

Die laborinternen Standards wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt (Detektionslimits):

- Gesamt-IgE 10 ng/ml
- Gesamt-IgG2a 20 ng/ml
- OVA-spezifisches IgE 30 LU/ml
- OVA-spezifisches IgG2a 30 LU/ml

Eingesetzte Pufferlösungen:

*PBS 10-fach, pH 7, Angaben pro Liter:*

- Natriumchlorid (140 mM) 80 g
- Dinatriumhydrogenphosphat (8.17 mM) 11,6 g
- Kaliumdihydrogenphosphat (2 mM) 2 g
- Kaliumchlorid (3 mM) 2 g

*Waschpuffer:*

- PBS 1-fach, pH 7
- Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20, 0.1%) 1 ml/l

*Blockpuffer:*

- PBS 1-fach, pH 7

- Bovines Serumalbumin 3 % 3 g/l

*Gallatipuffer, pH 3.95*

- Zitronensäure-Monohydrat (200mM) 42,5 g in 800 ml Aqua destillata
- Kaliumhydroxidlösung (4M) zur pH-Einstellung, anschließend Auffüllen mit Aqua destillata auf 1 l
- Wasserstoffperoxid 3,4 µl, direkt vor Gebrauch

### **2.3 Nachweis der allergen-induzierten Atemwegsentzündung**

*Prinzip:* Quantifizierung und Differenzierung der Zellen und Messung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Nach systemischer Sensibilisierung induziert eine repetitive inhalative Provokation mit dem gleichen Allergen eine allergische Atemwegsentzündung. Die zellulären Infiltrate liegen insbesondere peribronchial und perivaskulär. Mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) lassen sich Zellen gewinnen, deren Zahl mit dem Grad der Atemwegsentzündung korreliert und deren Typ die Atemwegsentzündung charakterisiert. Die Zytokine, die sich mittels ELISA aus der BAL-Flüssigkeit direkt bestimmen lassen, reflektieren das lokale Zytokinmilieu der Atemwege.

*Durchführung:*

Nach Tötung der Maus wurde die Trachea freigelegt und unterhalb des Schildknorpels mit einem Bindfaden abgebunden. Eine 70° gebogene Kanüle wurde in die Trachea eingelegt, über die die zweimalige Spülung mit 0,8 ml kaltem PBS erfolgte. Durch Zusatz eines Proteinase-Inhibitors wurde der Zytokinabbau verhindert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen beider Aliquots isoliert (1600 g, 10 min., 4 °C). Die dabei entstandenen zellfreien Überstände des ersten Aliquots wurden in ein 1ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Messung der Zytokine eingefroren.

Die Zellen beider Aliquots wurden zusammengeführt, und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Zur Zelldifferenzierung erfolgte eine Zytozentrifugation (320 g, 10 min., ohne Bremse), die zur Anreicherung und Fixierung der Zellen auf Objektträgern führte. Nach anschließender Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) wurden jeweils 200 Zellen gezählt und unter dem Lichtmikroskop nach morphologischen Kriterien differenziert. Die Auswertung erfolgte dabei geblindet.

In den jeweils ersten Aliquots der BAL-Flüssigkeit wurde das Zytokin IL-5 mittels ELISA gemessen. Verwendet wurde hierzu das jeweilige Pharmingen-OptEIA-Kit.

## **2.4 Messung der Atemwegsreaktivität *in vivo***

### *Prinzip:*

Die Atemwegsreaktivität *in vivo* wurde mit Hilfe der barometrischen Ganzkörperplethysmographie nach Provokation mit Metacholin in ansteigenden Konzentrationen gemessen (Hamelmann et al., 1997). Mit Hilfe des Ganzkörperplethysmographen wird die Druckdifferenz zwischen der Hauptkammer, in der die Maus platziert wird, und der Referenzkammer mit konstantem Druck gemessen. Das dadurch entstehende Kammer-Druck-Signal ist durch Volumen- und daraus resultierenden Druckänderungen durch die Thoraxbewegungen der Maus während des Atemzyklus bedingt. Über einen Druck-Transduktor wird die Druckdifferenz zwischen beiden Kammern in ein elektrisches Signal umgewandelt und so zu einem Analysegerät weitergeleitet. Es kommt bei der Provokation mit Metacholin in ansteigenden Konzentrationen zu einer Verlängerung der Expiration und einer Erhöhung des maximalen expiratorischen Drucks. Diese Veränderung der Wellenform der Atemkurve kann durch den Vergleich des mittleren Kammerdruckes während der frühen und der späten Expiration quantifiziert werden, die als „verlängerte Pause“ (enhanced pause, penh) gemessen wird. Die penh korreliert direkt mit dem invasiv gemessenen Atemwegswiderstand. Ein Pneumotachograph mit definiertem Widerstand in der Wand der Hauptkammer fungiert als Filter und ermöglicht die thermische Kompensation. Zusätzlich existiert eine Zuleitung und Ableitung für die zu vernebelnden Substanzen.

### *Durchführung:*

Die Atemwegsreaktivität wurde mit einem Ganzkörperplethysmographen *in vivo* gemessen. Bevor mit den Messungen begonnen wurde, wurde das System durch eine schnelle Injektion von 0,5 ml Luft in die leere Hauptkammer kalibriert. Ohne Provokation wurde zunächst die basale Penh als Durchschnittswert über 3 Minuten berechnet, bei der sich die Maus in der Hauptkammer befand. Die dabei erhaltenen Werte wurden als Basis für die darauffolgende inhalative Provokation mit PBS und Mch in ansteigenden Konzentrationen (6,25 mg/ml; 12,5 mg/ml; 25 mg/ml; 50 mg/ml) benutzt. Mit Hilfe eines Jet-Nebulizers wurden PBS und Mch aerosolisiert und für jeweils drei Minuten in die Hauptkammer geleitet. Nach jeder Provokation wurden die penh-Werte berechnet und der

penh-Mittelwert über 3 Minuten abgelesen. Die Werte für PBS und jede Konzentration von Metacholin wurden zu den basalen penh-Werten in Relation gesetzt. Die Konzentration des Metacholins, die einen 200-fachen Anstieg der korrespondierenden basalen Penh-Werte ( $Mch-PC_{200Penh}$ ) induzierte, wurde für jedes Tier errechnet.

## **2.5 Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach pränataler Exposition mit Lipopolysacchariden und postnataler Allergensensibilisierung**

### 2.5.1 Systemische allergenspezifische Immunantwort

*Prinzip:* Evaluation der systemischen Immunantwort nach Sensibilisierung mittels allergenspezifischer Stimulation der Milzzellen *in vitro*

Die Milzzellen werden hinsichtlich ihrer allergenspezifischen Immunantwort *in vitro* untersucht. Die Milz als sekundäres lymphatisches Organ setzt sich nach intraperitonealer Applikation des Allergens mit diesem auseinander und zeigt damit die systemische Immunantwort an.

#### 2.5.1.1 Isolierung der mononukleären Zellen der Milz

*Prinzip:* Dichtegradientenzentrifugation und allergenspezifische Re-Stimulation der mononukleären Zellen der Milz

Nach Homogenisierung der Milz und Eliminierung des Bindegewebes lassen sich durch Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen, Lymphozyten und Monozyten, von den übrigen Milzzellen trennen. Die Re-Stimulation dieser Zellen mit dem Allergen *in vitro* führt nach Sensibilisierung der Tiere zur Proliferation der Zellen und zur Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13.

*Durchführung:*

Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz jeweils eines Tieres mit Hilfe eines feinmaschigen Siebes homogenisiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in 4 ml Zellmedium mehrfach mit einer Transferpipette resuspendiert und vorsichtig über das Trennmedium Lympholyte (3 ml) geschichtet. Die Separation der Milzzellen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation (1300 g, 20 min., RT, ohne Bremse). Die isolierten mononukleären Zellen der Milz wurden zweimal mit Medium gewaschen (800 g, 10 min., RT, mit Bremse). Für die Kultivierung der Zellen wurde das Zellmedium mit fetalem Kälberserum (10 %), Penicillin-Streptomycin, Amphotericin B und L-Glutamin angereichert. Das Zellpellet

jeweils einer Milz wurde nach dem letzten Waschschrift in 1 ml Kulturmedium re-suspendiert und die Zellen maschinell gezählt.

#### 2.5.1.2 Antigen-spezifische proliferative Antwort der Milzzellen *in vitro*

*Prinzip:* Proliferationsassay mit  $^3\text{[H]}$ -Thymidin

Der Proliferationsassay mit  $^3\text{[H]}$ -Thymidin weist die Immunisierung eines Organismus gegen ein bestimmtes Antigen nach, da nach einer Re-Stimulation mit diesem Antigen eine klonale Expansion antigen-spezifischer Lymphozyten erfolgt. Als Positivkontrolle fungiert die unspezifische Stimulation der Lymphozyten mit dem T-Zell-Mitogen Concanavalin A (ConA); als Negativkontrolle eine Lymphozytenkultur ohne Stimulans (Mediumkontrolle). Nach der Stimulation werden die Zellen mit dem  $\beta$ -Strahler  $^3\text{[H]}$ -Thymidin markiert. Das  $^3\text{[H]}$ -Thymidin wird während der Zellteilung als Nukleosidanalogen in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Seine Inkorporation kann mit Hilfe eines Szintillationsmessgerätes gemessen werden. Die Inkorporationsrate des  $^3\text{[H]}$ -Thymidins wird als Stimulationsindex (SI) angegeben, der sich aus folgendem Quotienten berechnet:

$$\text{SI} = \frac{\text{Aktivität der Zellen nach Stimulation [cpm]}}{\text{Aktivität der Zellen ohne Stimulation [cpm]}}$$

*Durchführung:*

Für den Proliferationsassay wurden 96-well-Rundbodenplatten verwendet. Pro 96-well-Mikrotiterplatte wurden  $2,5 \times 10^5$  Milzzellen in Dreifachbestimmung mit einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit ConA (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ), mit LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ) oder mit OVA (Grad VI, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) über 96 Stunden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Während der letzten 24 h erfolgte die Inkubation mit  $^3\text{[H]}$ -Thymidin (25  $\mu\text{l/well}$ , 18,5 kBq/well in PBS). Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellharvester geerntet, indem der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Zellen jeweils einer Bodenvertiefung auf ein Filterpapierplättchen überführt wurden. Diese Plättchen wurden in je einem Szintillationsröhrchen mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit aufgelöst und die Radioaktivität hierin mit einem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät bestimmt.

#### 2.5.1.3 Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz

*Prinzip:* Quantifizierung der Zytokine aus dem Zellkulturüberstand nach Re-Stimulation der Milzzellen *in vitro* mit dem Allergen

Die Re-Stimulation antigenspezifischer Lymphozyten mit dem Antigen, das von dendritischen Zellen und Makrophagen präsentiert wird, führt zur Produktion der Zytokine, die *in vivo* zur Eliminierung des Antigens beitragen. Diese Zytokine können aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA oder mit dem Bioplex Suspension Array System, bei dem fluorochrom-markierte Antikörper gegen ein jeweiliges Zytokin gerichtet sind, durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

*Durchführung:*

Für die Gewinnung der Zellkulturüberstände wurden  $2 \times 10^6$  Milzzellen pro Bodenvertiefung auf einer 96-well-Rundbodenplatte in Kulturmedium antigenspezifisch mit OVA (50 µg/ml), LPS (5 µg/ml) und unspezifisch mit ConA (2.5µg/ml) kultiviert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Das Endvolumen betrug 200 µl/well. Nach 48 (INF-γ) und 96 Stunden (IL-4, -5, -10, TGF-β) wurden die Zellüberstände abgenommen, in ein 1ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Messung der Zytokine eingefroren.

Die Zytokine IL-4, IL-5 und IFN-γ wurden nach unspezifischer Stimulation der Zellen aus den Zellkulturüberständen mittels der entsprechenden Pharmigen OptEIA-Kits, nach spezifischer Stimulation durchflusszytometrisch mit dem Bioplex Suspension Array System gemäß der jeweiligen Gebrauchsanweisung quantifiziert. IL-10 wurde nur mittels Pharmigen OptEIA-Kit, IL-13 mit dem R&D-Kit, jeweils der Anleitung folgend, gemessen.

Untere Nachweisgrenzen:

- IL-4            16 pg/ml
- IL-5            7,8 pg/ml
- IFN-γ          3,9 pg/ml
- IL-10          3,9 pg/ml
- IL-13          39 pg/ml

*2.5.1.4 Differenzierung der T-Zellen aus der Milz*

*Prinzip:* Differenzierung der T-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene und ihrer Zytokinproduktion mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)

Die FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*) bietet die Möglichkeit, Zellen über ihre Oberflächenantigene und ihre individuelle Zytokinproduktion zu charakterisie-

ren und zu quantifizieren. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern gegen Oberflächen- oder intrazelluläre Strukturen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl (Argonlaser = 488 nm oder He-Ne-Laser = 633 nm) geleitet. Zelleigenschaften wie Form, Größe, intrazelluläre Granula und Membranbeschaffenheit induzieren eine Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angeordneten Linse (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch erfasst wird. Das Vorwärtsstreulicht wird durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die Granularität bestimmt. Die zu analysierende Zellpopulation kann anhand der morphologischen Eigenschaften näher eingegrenzt und auf spezifische Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Der Laserstrahl regt den an den Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff zur Emission von Lichtquanten definierter Wellenlängen an, die durch eine Linse gesammelt werden. Das gesammelte Licht wird durch Filter nach Wellenlängenbereichen getrennt und zu unterschiedlichen Detektoren gelenkt. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff wird ein spezifisches Signal erzeugt, und so können die Signale verschiedener Fluorochrome bei der Mehrfarbenanalyse getrennt akquiriert und quantitativ ausgewertet werden. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl pro Zelle gebundener Antikörper und damit zur Anzahl untersuchter Oberflächen- oder intrazellulärer Strukturen.

#### *Durchführung:*

Die Milz jeweils einer Maus wurde homogenisiert. Die Erythrozyten der Milzzellsuspension wurden mit einem Lysepuffer lysiert (10 ml, 15 min., RT, Rotator). Nach anschließender Zentrifugation (550 g, 10 min., RT, mit Bremse) wurden die Überstände abgenommen, und die Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in einem Volumen von 100  $\mu$ l PBS-azid auf eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Zentrifugation (550 g, 4 °C, 5 min., mit Bremse) und rasches Dekantieren des Zellüberstands erfolgte die Blockade der Fc-Rezeptoren durch Inkubation der Zellen mit einem Blockpuffer (50  $\mu$ l /  $2 \times 10^5$  Zellen, Zentrifugation mit 550 g, 4 °C, 5 min., mit Bremse). Zur Markierung der Oberflächenantigene wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen, aufgenommen in 50  $\mu$ l PBS-azid, mit Cyanin (Cy)5-markiertem anti-Maus-CD3, Phycoerythrin (PE)-markiertem anti-Maus-CD4 und entweder Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-markiertem anti-Maus-CD25 oder anti-Maus-CD62L (L-selectin) (jeweils 4  $\mu$ l) unter Lichtschutz über 20 min. auf Eis inkubiert. Als Kontrollen für die spezifischen monoklonalen Antikörper erfolgten

die Färbungen mit den entsprechenden Isotypkontrollen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-azid (150 µl/well bzw. 200 µl/well, Zentrifugation mit 550 g, 4 °C, 5 min., mit Bremse) und Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl PBS-azid resuspendiert. Die toten Zellen wurden mit Propidium-Jodid (1 µg/ml) markiert. Die Zellen wurden nun im Durchflusszytometer nach ihren Oberflächenantigenen differenziert.

Für die intrazelluläre Messung der Zytokine auf Einzelzellebene wurden die Milzzellen nach Lyse der Erythrozyten in Zellkulturmedium aufgenommen ( $2 \times 10^6$  Zellen/100µl) und jeweils mit den T-Zell-Mitogenen phorbol myristate acetate (PMA, 20 µg/ml) und Ionomycin (250 µg/ml) über 6 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert. Während der letzten drei Stunden wurden die Zellen zusätzlich mit Brefeldin A in einer Konzentration von 5 µg/ml inkubiert, das mit dem intrazellulären Transport der Zytokine interferiert und deren Ausschleusung aus der Zelle verhindert. Die Zellen wurden anschließend, wie oben dargestellt, mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3 (FITC-markiert) und CD8 (Cy5-markiert) gefärbt. Sie wurden dann einmal mit PBS 100 µl/ well gewaschen (Zentrifugation mit 550 g, 4 °C, 5 min., mit Bremse) und mit Formaldehyd fixiert (2 %, 100 µl/ well, 20 min., RT). Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen nach einem weiteren Waschschrift in Saponin-Puffer (50 µl/well) resuspendiert- Saponin führt zur Durchlässigkeit der Zellen für die gegen die Zytokine gerichteten Antikörper- und mit den monoklonalen, PE-markierten Antikörpern gegen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder IL-4 unter Lichtschutz über 20 min. bei RT inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit jeweils 150 µl Saponin-Puffer (Zentrifugation mit 350 g, 4 °C, 5 min., mit Bremse) wurden die Zellen zur Analyse im Durchflusszytometer in 200 µl PBS-azid resuspendiert.

Die Datenaufnahme und Weiterverarbeitung erfolgte mit Hilfe des „CellQuest“-Programms.

Eingesetzte Pufferlösungen:

*Lyse-Puffer:*

- Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) 185 mM
- Tris-Chlorid 17mM

*PBS-azid:*

- Fetales Kälberserum 12,5 ml
- Natriumazid 20 % 2,5 ml

- PBS ad 500 ml

*Fc-Block:*

- Rat igG 2,5µg
- anti-Maus CD16/32 5µg
- PBS-azid 50µl

*Saponin-Puffer (5 %, 10 fach konzentriert):*

- Saponin 2,5 g
- PBS-azid 50 ml

Die Gebrauchslösung wird in PBS-azid 1:10 verdünnt.

## 2.5.2 Analyse der lokalen T-Zell-Antwort auf Ebene der Transkriptionsfaktoren in der Lunge

*Prinzip:* Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, die jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus ermöglicht. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

*Durchführung:*

Die Lungen wurden nach Durchführung der BAL am Tag 60 entnommen. Die RNA wurde mit Hilfe des kommerziellen Quiagen-Kits gemäß der Gebrauchsanweisung extrahiert. Die Genexpression der Gene für T-bet, GATA3 und Foxp3 wurden mittels Real-time-PCR mittels TaqMan in dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System analysiert. Die Genexpressionswerte wurden gegenüber der Kontrolle 18s rRNA normalisiert. Um die Kontrolle 18 srRNA, zu detektieren, wurden die Primer mit folgenden Sequenzen verwendet: 59-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-39 (200 nM), und 59-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-39, 59-CGCCCGTCGCTACTACCGATTGG-39. Die Analyse der Genexpressionen von T-bet (Mm00450960\_m1), GATA3 (Mm00484683\_m1) und Foxp3 (Mm00475156\_m1) erfolgte mit kommerziellen Assays der Firma Applied Biosystems. Diese Analysen wurden in dem Labor von Roger Laener, Universitäts-Kinderklinik, Zürich, Schweiz, durchgeführt.

## 2.6 Expression der Lipopolysaccharidrezeptoren in den Jungtieren nach pränataler Lipopolysaccharidexposition

*Prinzip:* Analyse der löslichen und Membran gebundenen LPS-Rezeptoren

Die pränatale Exposition mit LPS beeinflusst möglicherweise die Expression der LPS-Rezeptoren und dadurch die Suszeptibilität der Jungtiere gegenüber LPS. Eine erhöhte Suszeptibilität der Jungtiere gegenüber LPS könnte einen protektiven Effekt des LPS auf die spätere allergische Sensibilisierung der Tiere durch Induktion einer Th1-Immunantwort vermitteln. Daher wurden in den Jungtieren die löslichen LPS-Rezeptoren LBP und CD14 aus dem Serum mittels ELISA quantifiziert und die Expression der zellulären Pattern-Recognition-Rezeptoren (PPRs) TLR-2, -4 und -9 auf RNA-Ebene in der Lunge mittels quantitativer PCR analysiert.

### 2.6.1 Analyse der löslichen Lipopolysaccharidrezeptoren

*Durchführung:*

Die löslichen LPS-Rezeptoren LBP und CD14 wurden aus dem Serum der Jungtiere mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits gemäß der jeweiligen Gebrauchsanleitung quantifiziert.

### 2.6.2 Expression der membranständigen Lipopolysaccharidrezeptoren im Lungengewebe

*Durchführung:*

Die Lungen wurden nach Durchführung der BAL am Tag 60 entnommen. Die RNA wurde mit Hilfe des kommerziellen Quiagen-Kits gemäß der Gebrauchsanweisung extrahiert. Die Genexpression der Gene für TLR-2, -4 und -9 wurden mittels Real-time-PCR mit dem TaqMan in dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System analysiert. Die Genexpressionswerte wurden gegenüber der Kontrolle 18s rRNA normalisiert. Um die Kontrolle, 18 srRNA, zu detektieren, wurden die Primer mit folgenden Sequenzen verwendet: 59-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-39 (200 nM), und 59-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-39, 59-CGCCCGTCGCTACTACCGATTGG-39. Die Analyse der Genexpressionen von TLR2 (Mm00442346\_m1), TLR4 (Mm00445274\_m1) und TLR9 (Mm00446193\_m1) erfolgte mit kommerziellen Assays der Firma Applied Biosystems. Diese Analysen wurden in dem Labor von Roger Laeuner, Universitäts-Kinderklinik, Zürich, Schweiz, durchgeführt.

## 2.7 Statistische Analyse

Die Daten der in derselben Weise behandelten Tiere aus vier unabhängigen Versuchen wurden zusammengeführt. Drei bis acht Tiere wurden in jeden Versuch eingeschlossen. Die MNCs dreier Milzen von Tieren, die in derselben Weise behandelt und am Tag 1 analysiert worden waren, wurden zur Messung der Zytokine auf Einzelzellebene mittels FACS-Analyse zusammengeführt, um genügend Zellen zu erhalten. Die Ergebnisse sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean) dargestellt. Die Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes verglichen; die statistische Signifikanz wurde auf ein p-Wert von 0,05 festgesetzt.

## 2.8 Materialliste

### 2.8.1 Tiere

- Balb/c-Mäuse, Harlan Winkelmann, Borchon, D

### 2.8.2 Chemikalien

- Aceton, Merck, Darmstadt, D
- Acetyl-Metacholin, Sigma, St. Louis, MO, USA
- Amphotericin B, GIBCO, Eggstein, D
- Ammoniumchlorid, Merck, Darmstadt, D
- Anti-Maus-IgG2a, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Anti-Maus-IgE, The Binding Site GmbH, Schwetzingen, D
- Bioplex suspension array system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA
- Biotin-anti-Maus-IgE, und -IgG2a, Pharmingen, Hamburg, D
- Bovines Serumalbumin, Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- Brefeldin A, Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- CD14-ELISA-Kit, Biometec, Greifswald, D
- Concanavalin A, Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- Cyanin 5-markiertes anti-Maus-CD3, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. A. Kroczeck, Robert-Koch-Institut, Berlin, D
- Cyanin 5-markiertes anti-Maus-CD8, Pharmingen, San Diego, Ca, USA

- Cyanin 5-markierte Isotypkontrolle anti-rat-IgG2a, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt, D
- Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, D
- Ethanol, Merck, Darmstadt, D
- Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin, D
- Fluorescein-isothiocyanate-markiertes anti-Maus-CD25, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. A. Kroczeck, Robert-Koch-Institut, Berlin, D
- Fluorescein-isothiocyanate-markiertes anti-Maus-CD3, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Fluorescein-isothiocyanate-markiertes anti-Maus-CD62L, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. A. Kroczeck, Robert-Koch-Institut, Berlin, D
- Fluorescein-isothiocyanate-markierte Isotypkontrolle anti-rat-IgG2a, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Formaldehyd, Merck, Darmstadt, D
- Hämatoxylin-Eosin, DiffQuick, Dade Behring AG, Düdingen, CH
- <sup>3</sup>[H]-Thymidin, Amersham Buchler, Braunschweig, D
- IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  Pharmingen OptEIA-Kits, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- IL-13 R&D System, R&D Systems, Minneapolis, USA
- Ionomycin, Sigma, St. Louis, MO, USA
- Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, D
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, D
- Kaliumhydroxidlösung, Merck, Darmstadt, D
- LBP-ELISA-Kit, HyCult Biotechnology, Uden, NL
- L-Glutamin, Seromed, Biochrom, Berlin, D
- LPS E. coli 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, USA
- Lympholyte®-M, Cedarline Laboratories, Hornby, Canada
- Natriumazid, Merck, Darmstadt, D
- Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, D

- Natriumbicarbonat, Serva, Heidelberg, D
- Ovalbumin, Grad VI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
- Ovalbumin, Grad V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
- PBS-Dulbecco (1 x), PAA Laboratories GmbH, Linz, A
- Penicillin-Streptomycin, Seromed, Biochrom, Berlin, D
- Phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
- Phycoerythrin-markiertes anti-Maus-CD4, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. A. Kroczeck, Robert-Koch-Institut, Berlin, D
- Phycoerythrin-markiertes anti-Maus-IFN- $\gamma$ , Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Phycoerythrin-markiertes anti-Maus-IL-4, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Phycoerythrin-markiertes anti-Maus-TNF- $\alpha$ , Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Phycoerythrin-markierte Isotypkontrolle anti-rat-IgG2a, Pharmingen, San Diego, Ca, USA
- Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate Tween 20, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, D
- 2-Propanol 70%, Merck, Darmstadt, D
- Propidium-Jodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
- Proteinase-Inhibitor, Complete TM Mini, Boehringer Mannheim, D
- Quiagen-Kit, Quiagen, Hombrechtikon, CH
- RT-PCR-Kit, Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA
- Saponin, Sigma, Deisenhofen, D
- Schwefelsäure, Merck, Darmstadt, D
- Stickstoff, flüssig, Linde, Berlin, D
- Streptavidinperoxidase, Calbiochem, Bad Soden, D
- Szintillationsflüssigkeit , Beckmann Instruments, Fullerton, USA
- Tissue Tek, Bayer Diagnostics, Hampshire, UK
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Fluka Chemie, Buchs, CH
- Tris-chlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

- Wasserstoffperoxid, Merck, Darmstadt, D
- Zellmedium RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH, Linz, A
- Zitronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt, D

### 2.8.3 Verbrauchsmaterialien

- FACS-Röhrchen, Becton Dickinson Labware, F
- Filterkarton 26 x 45 mm, Schleicher & Schuell, Dassel, D
- Filterplättchen, Filter Dunn Labortechnics, Asbach, D
- Kanülen 0,55 x 25 mm, Terumo Europe N.V., Leuven, B
- Kanülen 0,4 x 20 mm, Terumo Europe N.V., Leuven, B
- Objektträger 76 x 26 mm, Menzel-Gläser, D
- Pinzetten, J. Schmid Laborbedarf, Berlin, D
- Pipettenspitzen, Becton Dickinson, Heidelberg, D
- 1ml-Reaktionsgefäß, Nunc, Wiesbaden-Biebrich, D
- Rundfilter, Schleicher & Schuell, Dassel, D
- Scheren, J. Schmid Laborbedarf, Berlin, D
- Siebe, Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Skalpell, Terumo Europe N.V., Leuven, B
- 1ml-Spritzen, Omnifix®-F1ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
- Szintillationsröhrchen (5ml), Packard Instruments, Groningen, D
- 96-well-Rundbodenplatten, Greiner, Nürtingen, D
- Zellkulturröhrchen, Becton Dickinson, Heidelberg, D

### 2.8.4 Geräte

- Acryl-Nebelkammer Typ „UKRV“, (220L x 230T x 140H mm ), spezielle Forschungs- und Labortechnik, Berlin, D
- Brutschrank Heraeus, Kendro Laboratory Products, Berlin, D
- Cell Quest Research software, Macintosh Quadra, Becton Dickinson, Hamburg, D
- Dynatech MR 7000-Photometer, Dynatech, Denkendorf, D

- Fluorescence Activated Cell Scanner, FACScan, Becton Dickinson, Hamburg, D
- Ganzkörperplethysmograph, EMKA Technologies, Paris, F
- Liquidszintillationsmeßgerät Wallac1409, Wallac, Turku, F
- IKA -Schüttler MTS 4, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
- Pipetten, Becton Dickinson, Heidelberg, D
- Rotator RM 5, Hecht Assistent, Sondheim, D
- Sterile Werkbank, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Berlin, D
- Ultraschallvernebler SYSTAM 2901, Le Ledat-Villeneuve, F
- Zählautomat Cell-Dyn@3500 R, AbbottGmbH, Wiesbaden-Delkenheim, D
- Zellharvester, Tomtek, Orange, CT, USA
- Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R, Kendro Laboratory Products, Berlin, D
- Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico, Kendro Laboratory Products, Berlin, D

### **3 Ergebnisse**

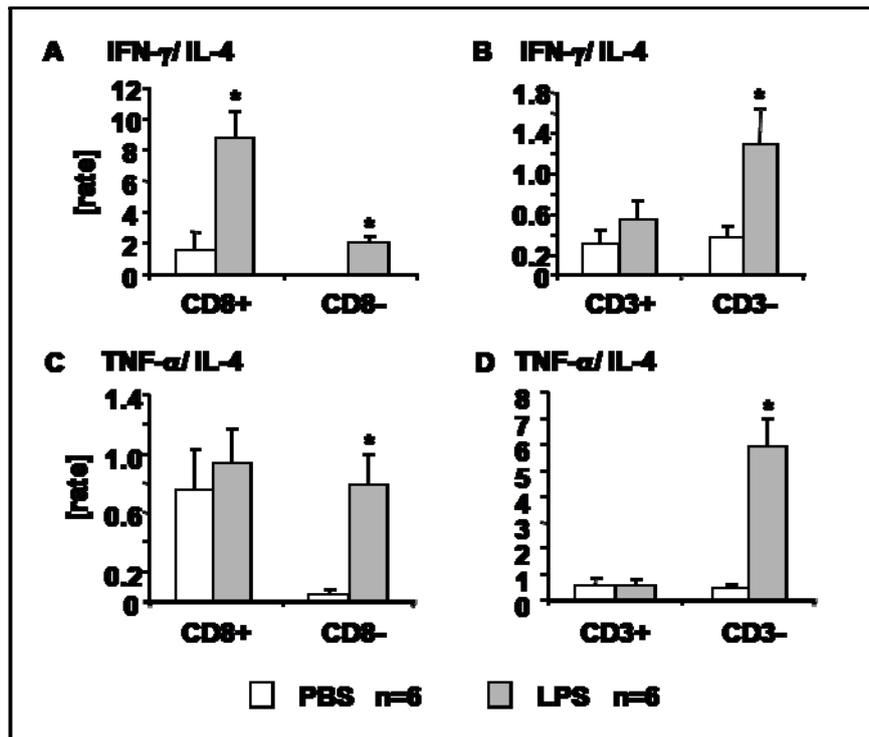
#### **3.1 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf das Immunsystem nicht-sensibilisierter Jungtiere**

##### **3.1.1 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die zelluläre Immunantwort am Tag der Geburt**

Im Rahmen der ersten Experimente wurde untersucht, ob die repetitiven Expositionen mit LPS über die Atemwege des Muttertieres während der Tragzeit die zelluläre Immunantwort der Nachkommen zum Zeitpunkt der Geburt beeinflussen. Die Produktion des charakteristischen proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ , das durch LPS induziert wird, und der klassischen Zytokine der Th2- und Th1-Immunantwort, IL-4 und IFN- $\gamma$ , durch mononukleäre Zellen der Milz wurden daher am Tag der Geburt, Tag 1 des Protokolls, in den Jungtiere mittels FACS-Analyse gemessen. Die IFN- $\gamma$ /IL-4- und TNF- $\alpha$ /IL-4-Ratio waren in den CD8<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup> (= CD4<sup>+</sup>) Zellen sowie in den CD3<sup>-</sup> Milzzellen nach pränataler LPS-Exposition signifikant höher als nach pränataler Placebo-Exposition. Damit induzierte die pränatale Exposition mit LPS in den Jungtieren systemisch ein überwiegendes Th1-Zytokinmilieu (Abbildung 3).

##### **3.1.2 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach der Neonatalzeit**

Im nächsten experimentellen Ansatz wurde die immunologische Reaktion auf die pränatale Exposition mit LPS in den Jungtieren nach Ablauf der Neonatalzeit an den Tagen 28 und 60 untersucht.



**Abbildung 3: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die zelluläre Immunantwort der Jungtiere am Tag der Geburt.** Nach pränataler Exposition mit LPS wurde die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene mittels intrazellulärem Zytokinnachweis in der FACS-Analyse in CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup> (= CD4<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup> Zellen der Milz am Tag der Geburt in den Jungtieren gemessen. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$ /IL-4-Ratio (Abbildung 3 A und B) und die TNF- $\alpha$ /IL-4-Ratio (Abbildung 3 C und D) nach pränataler LPS-Exposition (LPS, graue Säulen) im Vergleich zur Placebo-Exposition (PBS, weiße Säulen, \*p  $\leq$  0,05 versus PBS).

### 3.1.2.1 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die Atemwege der nicht-sensibilisierten Jungtiere

Weder am Tag 28 (Daten nicht gezeigt) noch am Tag 60 (Tabelle 1) zeigte sich nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS eine LPS-induzierte neutrophile Atemwegsentzündung oder eine unspezifisch erhöhte Atemwegsreaktivität (Tabelle 1) in den nicht-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu der pränatalen oder pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Placebo-Exposition.

**Tabelle 1: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die Atemwege nicht sensibilisierter Jungtiere am Tag 60.** Am Tag 60 des Protokolls wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht-sensibilisierten Tieren das Ausmaß einer neutrophilen Atemwegsentzündung in der BAL und die Atemwegsreaktivität untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen mit placebo-exponierten nicht sensibilisierten Tieren (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, nicht-sensibilisierte Tiere).

Exposition		Tierzahl	BAL		Atemwegsreaktivität
Pränatal	Postnatal		Leukozyten [/ $\mu$ l]	Neutrophile [/ $\mu$ l]	Mch-PC <sub>200</sub> Penh [mg/ml]
PBS	PBS	11	55 $\pm$ 7	2 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2,6
LPS	PBS	2	69 $\pm$ 16	0 $\pm$ 0	13,7 $\pm$ 4,3
LPS	LPS	6	48 $\pm$ 9	0 $\pm$ 0	15,7 $\pm$ 2,7

### 3.1.2.2 Humorale und zelluläre Immunantwort in nicht-sensibilisierten Jungtieren nach pränataler Exposition mit Lipopolysacchariden

Weder am Tag 28 (Daten nicht gezeigt) noch am Tag 60 (Tabelle 2) zeigte sich nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS eine Veränderung der Serumtiter der Gesamtimmungoglobuline (in Tabelle 2 dargestellt das Gesamt-IgG2a) in den nicht-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu der pränatalen oder pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Placebo-Exposition. Die antigenspezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit LPS *in vitro* war dagegen nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht-sensibilisierten Tieren am Tag 60 höher als nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Placebo-Exposition (Tabelle 2). Damit führte die repetitive LPS-Exposition nicht zu einer möglicherweise zu erwartenden sogenannten LPS-Toleranz, einer transient verminderten Reaktivität TLR-4-tragender Zellen auf LPS (Biswas 2007).

**Tabelle 2: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die humorale und zelluläre Immunantwort in nicht-sensibilisierten Jungtieren am Tag 28.** Am Tag 28 des Protokolls wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht sensibilisierten Tieren die Serumtitere des Gesamt-IgG2a mittels ELISA und die LPS-spezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz *in vitro* mittels <sup>3</sup>[H]-Thymidininkorporation untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen mit placebo-exponierten, nicht-sensibilisierten Tieren (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, nicht-sensibilisierte Tiere).

Exposition		Tierzahl	Serum Gesamt-IgG2a [µg/ml]	Mononukleäre Zellen der Milz LPS-spezifische Proliferation [cpm]
Pränatal	Postnatal			
PBS	PBS	11	59 ± 0,7	932 ± 243
LPS	PBS	2	72 ± 4,7	32484 ± 0 *
LPS	LPS	6	42 ± 3,2	8068 ± 2418*

### 3.1.2.3 Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz *in vitro* in nicht sensibilisierten Jungtieren nach pränataler Exposition mit Lipopolysacchariden

Am Tag 28 führte die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS in nicht sensibilisierten Jungtieren zu einer leicht verminderten Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 und einer erhöhten Produktion des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  nach unspezifischer Stimulation mononukleärer Zellen der Milz *in vitro* mit ConA, verglichen mit entsprechend placebo-exponierten Tieren (Tabelle 3). Im Gegensatz dazu war die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- $\gamma$  nach unspezifischer Stimulation mononukleärer Zellen der Milz mit ConA oder spezifischer Stimulation dieser Zellen mit LPS *in vitro* am Tag 60 in LPS- und placebo-exponierten Tieren ähnlich (Daten nicht gezeigt). Sowohl am Tag 28 als auch am Tag 60 war die Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 nach spezifischer Stimulation mononukleärer Zellen der Milz mit LPS *in vitro* in nicht sensibilisierten Jungtieren nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS im Vergleich zur Placebo-Exposition erhöht (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die Zytokinproduktion in nicht-sensibilisierten Jungtieren.** Die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit ConA oder LPS wurde nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht sensibilisierten Tieren an den Tagen 28 und 60 mittels ELISA gemessen (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, nicht-sensibilisierte Tiere). Am Tag 28 wurden die Milzzellen von jeweils drei Tieren einer Gruppe zusammengeführt; ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.

		Tag 28				Tag 60		
		Stimulation <i>in vitro</i>				Stimulation <i>in vitro</i>		
		Con A			LPS	LPS		
Exposition		Tier-zahl	IL-4	IL-5	IFN- $\gamma$	IL-10	Tier-zahl	IL-10
Präna-tal	Postna-tal		[pg/ml]	[pg/ml]	[ng/ml]	[ng/ml]		[ng/ml]
PBS	PBS	3	135 $\pm$ 0	190 $\pm$ 0	2,4 $\pm$ 0	24 $\pm$ 0	11	1,0 $\pm$ 0,2
LPS	PBS	3	140 $\pm$ 21	228 $\pm$ 26	3,1 $\pm$ 0	40 $\pm$ 22	2	2,4 $\pm$ 0*
LPS	LPS	3	106 $\pm$ 9	139 $\pm$ 10	7,1 $\pm$ 2,9	67 $\pm$ 7	6	1,6 $\pm$ 0,1*

### 3.2 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die allergen-bedingte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in den Jungtieren

Der Effekt der pränatalen oder pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Exposition mit LPS auf die allergen-bedingte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in den Jungtieren wurde am Tag 60 des Protokolls nach systemischer Sensibilisierung und nach den repetitiven Allergenprovokationen über die Atemwege untersucht.

### 3.2.1 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die Immunglobulinproduktion nach systemischer Sensibilisierung

Die systemische Sensibilisierung mit OVA induzierte im Vergleich zur Placebo-Sensibilisierung eine deutlich erhöhte Produktion des Gesamt- und OVA-spezifischen IgE (Tabelle 4). Sowohl die pränatale als auch die pränatal begonnene und postnatale fortgeführte Exposition mit LPS beeinflussten nicht die Produktion des Gesamt-IgE, führten jedoch, verglichen mit der Placebo-Exposition, zu einer signifikanten Verminderung des allergen-spezifischen IgE in OVA-sensibilisierten Tieren (Tabelle 4). Im Vergleich zu placebo-sensibilisierten Tieren war das Gesamt-IgG2a im Serum in OVA-sensibilisierten Tieren signifikant vermindert, das OVA-spezifische IgG2a erhöht (Tabelle 4). Nur die pränatale, nicht jedoch die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS induzierte eine leichte Erhöhung des Gesamt-IgG2a im Serum OVA-sensibilisierter Tiere, verglichen mit den entsprechenden placebo-exponierten, OVA-sensibilisierten Tieren (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Effekt der pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Exposition mit LPS auf die Immunglobulinproduktion nach systemischer Sensibilisierung.** Die Serumtitert der Gesamt- und OVA-spezifischen Immunglobuline wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in OVA-sensibilisierten Tieren am Tag 60 mittels ELISA quantifiziert (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, †p < 0,05 versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere).

Behandlung			Tierzahl	IgE		IgG2a	
				Gesamt- [µg/ml]	OVA-spezifisch [U/ml]	Gesamt- [µg/ml]	OVA-spezifisch [U/ml]
Pränatal	Postnatal	OVA					
PBS	PBS	-	11	0,1 ± 0,02	18 ± 5	83 ± 19	2 ± 0
PBS	PBS	+	16	0,9 ± 0,2*	3261 ± 724*	39 ± 4*	36 ± 12*
LPS	PBS	+	9	1,8 ± 0,5*	1146 ± 307†	76 ± 15†	45 ± 8
LPS	LPS	+	18	1,7 ± 0,6	908 ± 234†	36 ± 5	31 ± 7

### 3.2.2 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die allergen-induzierte Atemwegsentzündung

Die Allergenprovokation über die Atemwege induzierte in den placebo-exponierten OVA-sensibilisierten Tieren eine stabile Atemwegsentzündung mit einer signifikant erhöht nachweisbaren Anzahl von Leukozyten und eosinophilen Granulozyten in der BAL (Abbildung 4A) sowie mit einem deutlich erhöhten IL-5 in der BAL-Flüssigkeit (Abbildung 4B), verglichen mit den placebo-exponierten, placebo-sensibilisierten Tieren. Die alleinige pränatale Exposition mit LPS vor OVA-Sensibilisierung zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Atemwegsentzündung (Abbildung 4A und 4B). Im Gegensatz zur alleinigen pränatalen Exposition mit LPS suppressierte die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS die Entwicklung der allergen-bedingten Atemwegsentzündung in den OVA-sensibilisierten Jungtieren: Die Gesamtleukozyten und die eosinophilen Granulozyten (Abbildung 4A) waren ebenso wie das IL-5 (Abbildung 4B) in der BAL dieser Tiere im Vergleich zur BAL der placebo-exponierten OVA-sensibilisierten Tieren deutlich vermindert.

### 3.2.3 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die allergen-induzierte Atemwegsentzündung

Die placebo-exponierten OVA-sensibilisierten Tiere entwickelten im Vergleich zu den placebo-exponierten placebo-sensibilisierten Tieren eine erhöhte Atemwegsreaktivität *in vivo* nach inhalativer Provokation mit Methacholin (Abbildung 4C). Die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS, nicht jedoch die alleinige pränatale Exposition mit LPS, suppressierte die Entwicklung einer erhöhten Atemwegsreaktivität *in vivo* in den OVA-sensibilisierten Tieren, verglichen mit der entsprechenden Placebo-Exposition (Abbildung 4C): Die Methacholin-Konzentrationen, die zu einer Verdopplung der basalen penh-Werte führten, waren in den OVA-sensibilisierten Tieren nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition signifikant höher als nach Placebo-Exposition.

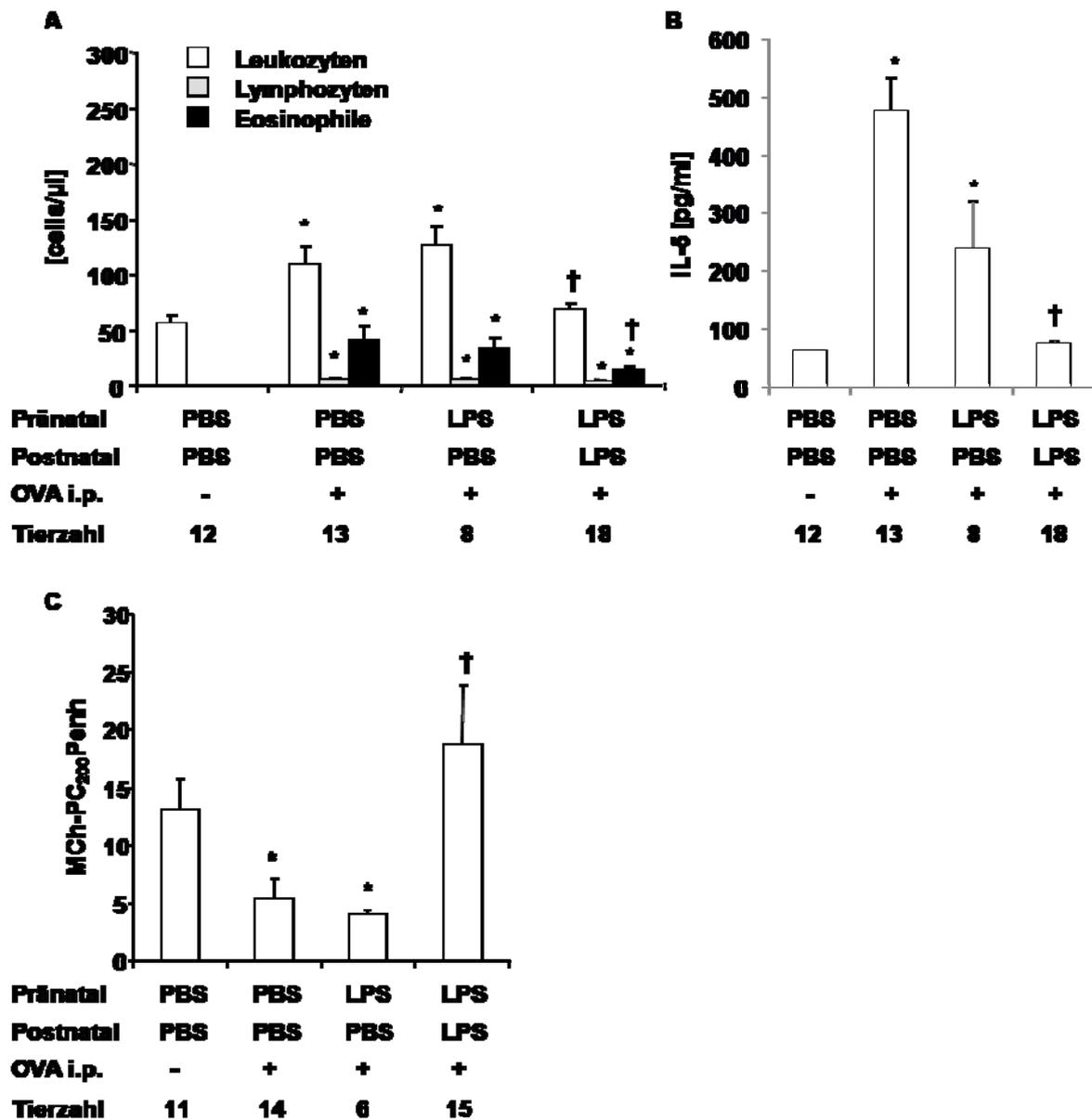


Abbildung 4: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die allergen-induzierte Atemwegsentzündung. Nach pränataler oder pränataler und postnatal fortgeführter LPS-Exposition wurde in den mit OVA sensibilisierten und über die Atemwege provozierten Tieren das Ausmaß der allergen-bedingten Atemwegsentzündung mittels Differenzierung der Leukozyten in der BAL (Abbildung 4A), das IL-5 (Abbildung 4B) in der BAL-Flüssigkeit mittels ELISA und die Atemwegsreaktivität *in vivo* (Abbildung 4C) nach inhalativer Provokation mit Methacholin mittels Ganzkörperplethysmographie am Tag 60 gemessen (\* $p < 0,05$  versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, † $p < 0,05$  versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere).

### **3.3 Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die allergen-vermittelte zelluläre Immunantwort**

Der Effekt der pränatalen oder pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Exposition mit LPS auf die allergen-vermittelte zelluläre Immunantwort in den Jungtieren wurde am Tag 60 des Protokolls nach systemischer Sensibilisierung und nach den repetitiven Allergenprovokationen über die Atemwege untersucht.

#### **3.3.1 Allergen-spezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition**

In placebo-exponierten OVA-sensibilisierten Tieren war die Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit OVA *in vitro* signifikant höher als in placebo-exponierten placebo-sensibilisierten Tieren (Tabelle 5). Nach pränataler und vor allem nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS war diese Proliferation in den OVA-sensibilisierten nochmals höher als nach Placebo-Exposition (Tabelle 5).

#### **3.3.2 Allergen-spezifische Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach pränataler LPS-Exposition**

Die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach unspezifischer Stimulation mit ConA *in vitro* war in allen Gruppen sehr ähnlich (Tabelle 5); lediglich nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS war in den OVA-sensibilisierten Tieren die Produktion von IFN- $\gamma$  signifikant höher als nach Placebo-Exposition (Tabelle 5). Verglichen mit den mononukleären Zellen der Milz placebo-exponierter, placebo-sensibilisierter Tiere, produzierten die mononukleären Zellen der Milz placebo-exponierter, OVA-sensibilisierter Tiere nach Stimulation mit OVA *in vitro* deutlich mehr IL-5, IL-13 und IL-10 und nur eine gering erhöhte Menge an IFN- $\gamma$  (Tabelle 5). Im Vergleich zur Placebo-Exposition beeinflusste die pränatale Exposition mit LPS in OVA-sensibilisierten Tieren die IL-5- und IFN- $\gamma$ -Produktion nicht signifikant, führte jedoch zu einer deutlich erhöhten IL-10-Produktion nach Stimulation der mononukleären Zellen der Milz mit OVA *in vitro* (Tabelle 5). Die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS führte dagegen in den OVA-sensibilisierten Tieren zu einer Suppression der nach OVA-Sensibilisierung erhöhten IL-5- und IL-13-Produktion und

zu einer Induktion der IFN- $\gamma$ - and IL-10-Produktion durch mit OVA *in vitro* stimulierte mononukleäre Zellen der Milz (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die allergen-vermittelte Proliferation und Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz *in vitro*.** Am Tag 60 wurde die Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit OVA *in vitro* mittels  $^3$ [H]-Thymidininkorporation und die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit ConA oder OVA *in vitro* mittels ELISA nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS und anschließender Sensibilisierung der Jungtiere mit OVA quantifiziert (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, †p < 0,05 versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere, DL = Detektionslimit).

Behandlung			Mononukleäre Zellen der Milz						
Pränatal	Postnatal	OVA	Tierzahl	OVA <i>in vitro</i>					ConA
				Proliferation	IL-5	IL-13	IL-10	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
				[cpm]	[ng/ml]	[pg/ml]	[ng/ml]	[pg/ml]	[ng/ml]
PBS	PBS	-	6	379±144	< DL	87±36	< DL	< DL	13±2,6
PBS	PBS	+	6	1545±406*	2,6±0,65*	3543±494*	0,77±0,17*	43±6*	5,4±1,7*
LPS	PBS	+	10	4013±1410*	2,74±0,75	1978±183*†	1,39±0,23*†	50±13	3,9±0,4
LPS	LPS	+	14	4836±944*†	0,23±0,11†	1213±156*†	1,73±0,3*†	401±106†	18,7±5,1†

### 3.3.3 Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die T-Zell-Differenzierung nach allergischer Sensibilisierung

CD62L (L-Selectin) als Marker naiver T-Zellen, der für die Lymphozytenrezirkulation zwischen peripheren Lymphknoten und entzündetem Gewebe erforderlich ist (Gerberick 1997), und CD25 als Marker unterschiedlicher Typen natürlicher und adaptiver regulatorischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Suppressorfunktionen (Fontenot 2003) wurden in allen Versuchsgruppen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz analysiert. In placebo-exponierten OVA-sensibilisierten Tieren war die Frequenz CD62L<sup>+</sup> T-Zellen deutlich geringer, während die Frequenz CD25<sup>+</sup> T-Zellen deutlich höher war als in placebo-exponierten, placebo-sensibilisierten Tieren (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu war die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS im Vergleich zur Placebo-Exposition vor OVA-Sensibilisierung mit einer erhöhten Frequenz CD62L<sup>+</sup> T-Zellen und einer verminderten Frequenz CD25<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert (Tabelle 6).

### 3.3.4 Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die Expression der Transkriptionsfaktoren für die T-Zell-Differenzierung in OVA-sensibilisierten Tieren

Die T-Zell-Differenzierung wird durch den Transkriptionsfaktor GATA3 in Richtung einer Th2-Immunantwort, durch den Transkriptionsfaktor T-bet in Richtung einer Th1-Immunantwort und durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 in Richtung einer Toleranz reguliert (Agnello 2003). Im Folgenden wurde die RNA-Expression dieser Transkriptionsfaktoren im Lungengewebe placebo-exponierter, OVA-sensibilisierter Tiere und prä- und postnatal LPS-exponierter, OVA-sensibilisierter Tiere analysiert. Zwischen diesen beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3 und Foxp3 (Tabelle 7). Im Gegensatz dazu war die Expression des Th1-regulierenden Transkriptionsfaktors T-bet im Lungengewebe der prä- und postnatal LPS-exponierten, OVA-sensibilisierten Tieren deutlich höher als im Lungengewebe der placebo-exponierten, OVA-sensibilisierten Tiere (Tabelle 7).

**Tabelle 6: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die T-Zell-Differenzierung nach allergischer Sensibilisierung.** Die Aktivierungsmarker CD62L und CD25 wurde auf CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition und anschließender OVA-Sensibilisierung am Tag 60 mittels FACS-Analyse untersucht (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, †p < 0,05 versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere).

Behandlung			Tierzahl	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen der Milz	
Pränatal	Postnatal	OVA		CD62 <sup>+</sup>	CD25 <sup>+</sup>
				[%]	
PBS	PBS	-	8	67 ± 4	5 ± 0
PBS	PBS	+	9	30 ± 9*	20 ± 2*
LPS	PBS	+	3	69 ± 2†	4 ± 1†
LPS	LPS	+	9	63 ± 6†	5 ± 1†

**Tabelle 7: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die Expression der T-Zelldifferenzierung regulierenden Transkriptionsfaktoren.** Die RNA-Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3, T-bet und Foxp3 wurden nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition und anschließender OVA-Sensibilisierung am Tag 60 mittels quantitativer Real-time-PCR im Lungengewebe untersucht.

Behandlung				Transkriptionsfaktoren im Lungengewebe		
				GATA3	T-bet	FoxP3
Pränatal	Postnatal	OVA	Tierzahl	[/18S rRNA]		
PBS	PBS	+	9	0,759 ± 0,194	0,405 ± 0,120	10,994 ± 3,758
LPS	LPS	+	9	0,741 ± 0,220	0,611 ± 0,258	10,480 ± 3,469

### 3.4 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die angeborene Immunantwort

Die Suszeptibilität eines Organismus gegenüber einer Stimulation mit LPS könnte Unterschiede in der Immunantwort auf eine wiederholte Exposition mit LPS erklären. Daher wurde in der folgenden Versuchsreihe untersucht, inwieweit die pränatale Exposition mit LPS die Expression löslicher und Membran gebundener LPS-Rezeptoren in den Jungtieren als möglichen Mechanismus des protektiven LPS-Effektes auf die allergische Sensibilisierung beeinflusst. Die Untersuchungen fanden am Tag 60 des Versuchsprotokolls statt.

#### 3.4.1 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die löslichen Lipopolysaccharid-Rezeptoren Lipopolysaccharid-bindendes Protein und CD14

Im Vergleich zur Placebo-Exposition führten die alleinige pränatale Exposition mit LPS sowie die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS zu leicht erhöhten Serumtitern des LBP. Nur in den prä- und postnatal mit LPS exponierten Tieren, nicht dagegen in den nur pränatal mit LPS exponierten Tieren, waren die Serumtitern an löslichem CD14 (sCD14) signifikant höher als in den placebo-exponierten Tieren (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die löslichen LPS-Rezeptoren LBP und CD14.** Die Seruntiter der löslichen LPS-Rezeptoren LBP und CD14 wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS am Tag 60 mittels ELISA gemessen. Da sich die Daten für placebo- und OVA-sensibilisierte Tiere nicht unterschieden, wurden sie in den jeweiligen LPS-Gruppen zusammengeführt (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte Tiere).

Exposition		Tierzahl	Serumtiter	
Pränatal	Postnatal		LBP	sCD14
			[µg/ml]	[ng/ml]
<b>PBS</b>	<b>PBS</b>	10	9 ± 1	306 ± 13
<b>LPS</b>	<b>PBS</b>	10	15 ± 3	395 ± 45*
<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	16	13 ± 3	416 ± 57*

### 3.4.2 Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die Expression der Membran gebundenen Pattern-Recognition-Rezeptoren im Lungengewebe

Die RNA-Expression der Membran gebundenen PPRs TLR-2, -4 und -9 wurden im Lungengewebe placebo-exponierter, OVA-sensibilisierter Tiere und prä- und postnatal LPS-exponierter, OVA-sensibilisierter Tiere analysiert. Die RNA-Expression der Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 im Lungengewebe der prä- und postnatal LPS-exponierten Tiere war im Vergleich zur RNA-Expression dieser Rezeptoren im Lungengewebe placebo-exponierter Tiere deutlich erhöht (Tabelle 9), während die TLR-9-RNA in beiden Gruppen ähnlich exprimiert war (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die Expression der Membran gebundenen PPRs im Lungengewebe.** Die RNA-Expression der PPRs TLR-2, -4 und -9 wurden nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS am Tag 60 mittels quantitativer Real-time-PCR gemessen.

Exposition			RNA-Expression		
Pränatal	Postnatal	Tierzahl	TLR-2	TLR-4	TLR-9
			[/18sRNA]		
PBS	PBS	5	0,24 ± 0,09	0,30 ± 0,12	0,42 ± 0,12
LPS	LPS	8	0,54 ± 0,26	0,62 ± 0,28	0,59 ± 0,04

## 4 Diskussion

Die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS verhinderte in der jungen Maus nach systemischer Allergensensibilisierung die Charakteristika des allergischen Asthma bronchiale, die allergen-spezifische IgE-Produktion, die eosinophile Atemwegsentzündung und die erhöhte Atemwegsreaktivität. Die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS war dabei assoziiert mit einem Wechsel von einer allergen-bedingt überwiegenden Th2- hin zu einer überwiegenden Th1-Immunantwort und mit einer erhöhten Expression löslicher und zellgebundener LPS-Rezeptoren.

LPSs gehören zu den bakteriellen Endotoxinen, die dosisabhängig für das Bild der Sepsis bei bakteriellen Infektionen verantwortlich sind und letztlich zum septischen Schock führen können. Die Exposition mit LPS über die Atemwege der trächtigen Tiere sowie der jungen Mäuse führte jedoch in dem vorliegenden Modell, wie auch in einem Modell der LPS-Exposition bei neonatalen Mäusen (Gerhold 2003), nicht zu offensichtlichen, direkt toxischen Effekten: Nach pränataler Exposition mit LPS erschienen die jungen Mäuse normal entwickelt, und sowohl nach pränatal begonnener als auch nach postnatal fortgeführter Exposition mit LPS entwickelten die Jungtiere keine möglicherweise zu erwartende neutrophile Atemwegsentzündung oder unspezifisch erhöhte Atemwegsreaktivität. Eine repetitive Exposition mit LPS in bestimmter Dosis kann zur sogenannten LPS-Toleranz führen, einer transienten Nicht-Reaktivität TLR-4-tragender Zellen auf LPS durch Internalisierung der LPS-Rezeptoren (Biswas 2007). Die LPS-Toleranz wurde als möglicher Mechanismus des protektiven Effektes von LPS in organischen Stäuben gegen die Entwicklung allergischer Erkrankungen bei Kindern, die auf Bauernhöfen aufwuchsen, postuliert (Braun-Fahrländer 2002). In dem vorliegenden Modell führte jedoch die repetitive Exposition mit LPS nicht zu einer verminderten Proliferation oder Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach Re-Stimulation der Zellen mit LPS *in vitro*.

Für die potentielle Immunmodulation mit LPS scheinen der Zeitpunkt der Exposition, die Dosis, Dauer und Frequenz der Exposition eine entscheidende Rolle zu spielen, wie kontroverse und bisher nicht vollständig erklärte Daten aus verschiedenen Tiermodellen zeigen (Tulic 2000, Silva 2000). Hohe Expositionsdosen induzierten eine Th1-Immunantwort und neutrophile Inflammation, geringe Dosen lösten dagegen eine Th2-

Immunantwort aus und verstärkten eine allergische Entzündung. Die Dosisangaben sind dabei relativ und Schwellendosen für die jeweilige Immunantwort bisher nicht quantifiziert (Liu 2002). In der vorliegenden Arbeit könnte der protektive LPS-Effekt zumindest teilweise auf eine LPS-induzierte mukosale Toleranz zurückzuführen sein. Die mukosale Toleranz wird durch adaptive Tregs vermittelt (McGuirk 2002, Unger 2003). Vor kurzem war gezeigt worden, dass eine Subgruppe Foxp3-exprimierender CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Tregs neben dem regulatorischen Zytokin IL-10 auch das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  in hoher Menge produzieren (Stock 2004). Auch in dem vorliegenden Modell führte die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS zur erhöhten Frequenz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen und zu einer erhöhten allergen-spezifischen Produktion der Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  *in vitro*. Die Exposition mit LPS führte in den Jungtieren jedoch nicht zur erhöhten Expression von Foxp3 als klassischen Marker regulatorischer T-Zellen im Lungengewebe oder zur verminderten Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach Re-Stimulation mit dem Allergen *in vitro*, wie es für die mukosale Toleranz charakteristischerweise zu erwarten gewesen wäre.

Der mögliche protektive LPS-Effekt auf allergische Erkrankungen geht wahrscheinlich auf eine kontinuierliche Exposition mit einer relativ hohen Dosis, beginnend in einem frühen Lebensalter, also noch vor Beginn der ersten allergischen Sensibilisierung und Manifestation einer allergischen Erkrankung, zurück.

IL-10 ist als natürlicher Suppressor antigenspezifischer T- und B-Zell-vermittelter Immun- und Entzündungsreaktionen bekannt (Stassen 2004) und könnte eine Hauptrolle als regulatorischer Faktor in der Entwicklung allergischer Erkrankungen spielen. So konnte gezeigt werden, dass die IL-10-Produktion dendritischer Zellen bei atopischen Kindern im Vergleich zu Kindern ohne Atopie vermindert ist (Gentile 2004). Die Stimulation dendritischer Zellen mit LPS *in vitro* induziert sehr schnell die Produktion von IL-10 (bisher unveröffentlichte eigene Daten), und die LPS-Exposition *in vivo* führt ebenfalls zur erhöhten IL-10-Produktion in verschiedenen Tiermodellen (Gao 1999; Tulic 2001). Das in dem vorliegenden Modell vermehrt produzierte IL-10 nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS könnte also eine wichtige immunmodulatorische Funktion unabhängig von einer möglichen Toleranzinduktion einnehmen.

In den Jungtieren zeigten mononukleäre Zellen der Milz nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS neben der erhöhten IL-10- auch eine erhöhte

allergen-spezifische IFN- $\gamma$ -Produktion *in vitro*. Nach der erstmals von Mosmann beschriebenen antigenabhängigen Dichotomie der adaptiven zellulären Immunantwort (Mosmann 1989) ist die Th1-Immunantwort der natürliche Antagonist der Th2-Immunantwort. Die natürliche Exposition mit mikrobiellen Antigenen als TLR-Liganden über den Darm, die Haut und die Atemwege haben ebenso wie die Auseinandersetzung des Organismus mit bestimmten Infektionskrankheiten wahrscheinlich wesentlichen Anteil an der normalen Entwicklung des Immunsystems und damit auch an der Balance der adaptiven Th1-/ Th2-Immunantwort. Die Suppression der allergenbedingten Sensibilisierung und Atemwegsentzündung gelang in der Maus indirekt über die Gabe rekombinanter Zytokine, wie IL-12 und IL-18 als Th1-Induktoren und IFN- $\gamma$  als Th1-Zytokin (Kips 1996, Lack 1996). Der direkte Einsatz von Th1-Zytokinen (IFN- $\gamma$ , IL-12) zur Suppression Th2-vermittelter allergischer Erkrankungen in klinischen Studien scheiterte dagegen an ihrer geringen Effektivität oder hohen Nebenwirkungsraten (O'Byrne 2006). Eine Reihe von Präventionskonzepten verfolgt nun die Suppression der Th2-Immunantwort durch Induktion von Th1-Effektorzellen mittels mikrobieller Antigene. So verhinderte die Induktion einer Th1-Immunantwort durch das Mycobacterium Bacillus Calmette Guérin die Entwicklung einer allergeninduzierten Atemwegsentzündung und -hyperreaktivität in der Maus (Erb 1998, Herz 1998). Ein ähnlicher Effekt wurde durch CpG-Motive beschrieben: Als Bestandteile mykobakterieller DNA lösten sie im murinen Organismus eine Th1-Immunantwort aus, die die allergische Sensibilisierung und Atemwegshyperreaktivität supprimierte (Sur 1999). Die systemische Exposition mit LPS vor systemischer Sensibilisierung mit OVA verhinderte IL-12-abhängig die allergenbedingte IgE-Produktion und Atemwegsentzündung in adulten Mäusen (Gerhold 2002). Die alleinige Exposition neonataler Mäuse mit LPS über die Atemwege induzierte dagegen keine Th1-Immunantwort und verhinderte nicht die Entwicklung einer allergenbedingten Sensibilisierung und Atemwegsentzündung (Gerhold 2003). In der vorliegenden Arbeit war nur die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition, nicht jedoch die alleinige postnatale Exposition mit LPS mit einer starken Th1-Immunantwort und der Suppression der allergen-induzierten Sensibilisierung und Atemwegsentzündung assoziiert. Diese Daten erscheinen gegenüber den Daten von Blumer kontrovers, die einen protektiven LPS-Effekt auf die allergische Atemwegsentzündung bereits infolge einer alleinigen pränatalen Exposition mit LPS zeigen (Blumer 2005). Diese kontroversen Daten basieren am ehesten auf signifikante Unterschiede im Studiendesign: In

der Arbeit von Blumer erfolgte die Exposition der Muttertiere mit LPS wiederholt intraperitoneal und bereits vor Konzeption, die Exposition während der Tragzeit mittels intranasaler Applikationen in einer Dosis von je 10 µg, so dass die kumulative LPS-Dosis um ein Vielfaches höher war als in dem vorliegenden Modell der repetitiven inhalativen LPS-Exposition mit einer Konzentration von 1 ng/ml. Das Protokoll von Blumer führte dementsprechend zu einer stärkeren, aber eher unnatürlichen Stimulation des Immunsystems verglichen mit dem vorliegenden Protokoll.

Um den immunologischen Mechanismus der Th2-Suppression infolge der pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Exposition mit LPS näher aufzudecken, wurden die T-Zellen näher charakterisiert. Die LPS-Exposition war assoziiert mit einer erhöhten Frequenz CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Milzzellen. Es ist bekannt, dass die Antigenpräsentation an naive CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T-Zellen zur Herunterregulierung von L-Selectin (CD62L) auf sich nachfolgend entwickelnden Gedächtnis-T-Zellen führt (Kennedy 1995) und CD62L auf Th1-, nicht jedoch auf Th2-Zellen exprimiert bleibt (Savage 2002). Dementsprechend und im Hinblick auf die erhöhte Expression des Th1-induzierenden Transkriptionsfaktors T-bet im Lungengewebe der LPS-exponierten Tiere kann in dem vorliegenden Modell die LPS-vermittelte Suppression der allergen-induzierten Immun- und Entzündungsreaktion vor allem durch den Wechsel von einer überwiegenden Th2- hin zu einer überwiegenden Th1-immunantwort erklärt werden.

Der Zeitpunkt des ersten Allergenkontakts und damit der erstmögliche Zeitpunkt einer allergischen Sensibilisierung sind nicht bekannt, der Zeitpunkt, an dem eine Immunmodulation eingeleitet wird, erscheint jedoch maßgeblich für ihre protektive Wirksamkeit. Wie bekannte Daten zeigen, kann eine Th1-Induktion nach bereits erfolgter Sensibilisierung diese nicht mehr rückgängig machen (Gerhold 2002). Die lokale Exposition mit LPS nach Sensibilisierung, aber vor inhalativer Allergenprovokation in einem vorausgegangenen LPS-Modell führte IL-12-abhängig zur Suppression der Atemwegsentzündung, jedoch nicht zur Inhibition der Atemwegshyperreaktivität, und lokal, nicht jedoch systemisch zu einer Th1-Immunantwort. Es ist nun lange bekannt, dass Th1-Zellen eine Th2-bedingte Atemwegshyperreaktivität verstärken können (Hansen 1999, Randolph 1999). Die Exposition mit LPS bei einem bestehenden Asthma bronchiale führt ebenfalls bekanntermaßen bei Mensch und Tier durch Induktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und durch die konsekutiv ausgelöste neutrophile Entzündungsreaktion zur deutlichen Exazerbation der Erkrankung (Michel 1996). Damit erscheint die Indukti-

on einer Th1-Immunantwort nach bereits erfolgter Sensibilisierung trotz des partiell therapeutischen LPS-Effektes nur sehr eingeschränkt anwendbar.

Angenommen wird, dass die allergische Sensibilisierung für einige Allergene, wie den Nahrungsmittelallergenen bereits in sehr früher Kindheit, möglicherweise auch schon pränatal, stattfindet. Ein pränatal möglicher Allergentransfer als Voraussetzung für die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung wurde bereits nachgewiesen (Loibichler 2002). Dementsprechend könnte auch der optimale Zeitpunkt einer präventiven Immunmodulation bereits pränatal liegen. Der mögliche spezifische Effekt einer pränatalen Immunmodulation könnte durch die Plastizität des Immunsystems und durch Interaktionen zwischen dem angeborenen, unspezifischen und adaptiven, spezifischen Immunsystem in der sensiblen, frühen Entwicklungsphase des Immunsystems während der Fetalzeit und der frühen Neonatalzeit begründet sein.

Die Plazentabarriere ist während der Gestationszeit zur Vermeidung einer akuten Abstoßung des Feten, der immunologisch als Allograft fungiert, durch ein Th2-gerichtetes Zytokinmilieu charakterisiert (Chaouat 2004). In der ersten postnatalen Lebensperiode ist das adaptive Immunsystem ebenfalls vornehmlich Th2-gerichtet, so dass allergische Immunantworten begünstigt werden (Adkins 1998, Adkins 2001). Eine bereits pränatal beginnende Exposition mit Th1-induzierenden mikrobiellen Antigenen könnte dagegen in einer sehr sensiblen Phase, in der das sich entwickelnde adaptive Immunsystem durch Wechselwirkungen mit dem angeborenem Immunsystem wesentlich geprägt werden kann, wirken. Dadurch könnte eine immunologische Balance erreicht und die Entwicklung Th1-gerichteter Zellen sowie vor allem regulatorischer T-Zellen induziert werden, die ein dauerhaftes Übergewicht einer Th2-Immunantwort verhindern (Zuany-Amorim 2002). Das in den vorliegenden Arbeiten zur Immunmodulation eingesetzte LPS ist unter anderen mikrobiellen Komponenten ein Kandidat für diese frühe Immunstimulation, da es über die Aktivierung von TLR-4 NF- $\kappa$ B aktiviert und so proinflammatorische Zytokine wie IL-12 als Gegenspieler zur Th2-Immunantwort induziert (Takeuchi 2001). Die sich entwickelnde TLR-4-Expression während der Fetalzeit und die dadurch bedingte zunehmende Suszeptibilität der Plazentabarriere und des Fetus für LPSs prädisponieren für eine effektive Induktion des Th1-gerichteten Zytokinmilieus im Fetus (Gayle 2004). Entsprechend induzierte die pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS erhöhte Serumspiegel der löslichen LPS-Rezeptoren LBP und sCD14 und eine erhöhte Expression der zellgebundenen LPS-Rezeptoren TLR-2 und -4

im Lungengewebe der Jungtiere. Erhöhte LBP-Serumspiegel, so konnte vor Kurzem gezeigt werden, verhindern die Entwicklung einer LPS-induzierten Atemwegsentzündung (Knapp 2006). Epidemiologische Daten hatten zusätzlich gezeigt, dass bei Kindern, die auf Bauernhöfen aufwuchsen, im Vergleich zu Kindern, die zwar auf dem Land, jedoch nicht auf Bauernhöfen aufwuchsen, die RNA-Expression von CD14 und TLR-2 deutlich erhöht war, so dass angenommen wird, dass der protektive „Farm-Effekt“ auf die Stimulation des angeborenen Immunsystems zurückzuführen ist. Die vorliegenden Daten zur TLR-RNA-Expression zeigten einen starken Trend, waren jedoch nicht statistisch signifikant, am ehesten infolge der Analyse der RNA-Expression im gesamten Lungengewebe mit einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und infolge des langen Intervalls zwischen der LPS-Exposition und der Analyse. Die gleichzeitige Entwicklung und mögliche Induktion der Rezeptoren für Bakterienwandbestandteile durch diese Bakterienwandbestandteile selbst, wie hier anhand der induzierten LPS-Rezeptoren durch die pränatale LPS-Exposition in der Maus gezeigt, könnte also zusätzlich für eine zunehmende Ansprechbarkeit der Nachkommen gegenüber den entsprechenden mikrobiellen Antigenen einerseits und möglicherweise für eine verminderte Suszeptibilität gegenüber einer allergischen Sensibilisierung andererseits sorgen.

Es ist zusätzlich bekannt, dass inhaliertes LPS die Reifung dendritischer Zellen in der Lunge gesunder Probanden induzieren kann (Alexis 2005). Die induzierte DC-Reifung zusammen mit der erhöhten LPS-Suszeptibilität nach pränataler LPS-Exposition könnte also in einer erhöhten TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Produktion mononukleärer Zellen der Milz und so zu dem dominierenden Th1-Zytokinmilieu in den neugeborenen Tieren direkt nach der Geburt geführt haben. Dieser Wechsel von dem postnatal normalerweise dominierenden unspezifischen Th2- hin zu einem (unspezifischen) Th1-Zytokinmilieu in der sich entwickelnden Maus könnte zu einer verminderten Suszeptibilität der Jungtiere gegenüber einer späteren allergischen Sensibilisierung geführt haben, wie es in einem vorausgegangenem Modell für die LPS-Exposition in der neonatalen Maus gezeigt worden war (Gerhold 2003).

Die Induktion einer Th1-Immunantwort zur Prävention allergischer Erkrankungen könnte die Entwicklung Th1-vermittelter Autoimmunerkrankungen, zu denen der Typ-I-Diabetes, die Autoimmunthyreoiditis oder Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis gehören, begünstigen. Entscheidend für die Entstehung der autoimmunen Entzündung ist jedoch die Produktion von IL-17 durch Th-17-Zellen. Vor kurzem konnte

gezeigt werden, dass Th-17-Zellen nicht aus Vorläufer-Th1-Zellen entstehen, wie zuvor angenommen, sondern neben Th1- und Th2-Effektorzellen eine dritte Th-Population darstellen. Ihre Entwicklung wird direkt durch IL-23 induziert, das von DCs produziert wird, und sowohl durch IL-4 als auch durch IFN- $\gamma$  inhibiert. Damit wirken beide Zytokine, IL-4 und IFN- $\gamma$ , präventiv gegenüber den ebenfalls zunehmend häufiger auftretenden Autoimmunerkrankungen (Harrington 2006, Park 2006).

Die vorliegenden tierexperimentellen Daten zeigen, dass, gemäß der Dichotomie des Immunsystems, die Exposition mit mikrobiellen Antigenen die allergenbedingte Th2-Immunantwort supprimieren und die Entwicklung der allergischen Entzündung verhindern kann. Die Stimulation des angeborenen, unspezifischen Immunsystems führt darüberhinaus zur Induktion einer unspezifischen Th1-Immunantwort, die die Sensibilisierung gegen eine Vielzahl von Allergenen verhindern könnte.

## 5 Zusammenfassung

Als „Epidemie des 21. Jahrhunderts“ und erhebliches Gesundheitsproblem der westlichen Industrienationen erfordern Erkrankungen des atopischen Formenkreises die Entwicklung primär präventiver Konzepte auf der Basis natürlicher, immunregulatorischer Mechanismen. Die natürliche Exposition des Organismus mit mikrobiellen Antigenen hat wahrscheinlich wesentlichen Anteil an der normalen Entwicklung des Immunsystems und damit auch an der Balance innerhalb des adaptiven Immunsystems zwischen der allergeninduzierten Th2-Immunantwort auf der einen und der Th1-Immunantwort auf der anderen Seite.

Der genaue Zeitpunkt der allergischen Sensibilisierung und damit der optimale Zeitpunkt für den Einsatz immunmodulatorischer Therapien sind derzeit strittig. Eine bereits pränatal beginnende und postnatal fortgeführte Exposition mit Lipopolysacchariden (LPS) vor Beginn einer systemischen Sensibilisierung der Jungtiere mit OVA verhinderte in dem vorliegenden Mausmodell die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in den Jungtieren. Dieser protektive Effekt auf die allergische Entzündung war assoziiert mit einer verminderten Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und einer erhöhten Produktion des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  durch mononukleäre Zellen der Milz, die *in vitro* mit OVA stimuliert worden waren. Die gleichzeitige Induktion der LPS-Rezeptoren LBP, CD14 und TLR-4 sowie des Th1-kontrollierenden Transkriptionsfaktors T-bet in den Lungengewebe der Jungtiere stellte den wahrscheinlichsten Mechanismus dieses primär präventiven Effektes der pränatal beginnenden LPS-Exposition dar.

Eine bereits pränatal beginnende Exposition mit immunmodulatorisch wirksamen Bakterienbestandteilen wie LPS könnte die Grundlage für ein neues Konzept zur primären Prävention allergischer Erkrankungen darstellen. Die dabei pränatal beginnende Stimulation des angeborenen Immunsystems könnte die Entwicklung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zusätzlich induzieren und so die Ansprechbarkeit des Organismus gegenüber diesen Bakterienbestandteilen während der Entwicklung des Immunsystems erhöhen.

## Literaturverzeichnis

- 1 Adkins B, Du RQ. Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. *J Immunol* 1998; 160: 4217-4224.
- 2 Adkins B, Bu Y, Guevara P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol* 2001; 166: 918-925.
- 3 Agnello D, Lankford CS, Bream J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003; 23: 147-161.
- 4 Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-Ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperre-activity. *Nature Medicine* 2002; 8: 1024-1032.
- 5 Alexis NE, Lay JC, Almond M, et al. Acute LPS inhalation in healthy volunteers induces dendritic cell maturation in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 345-350.
- 6 Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, et al. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol* 2008; 179: 4083-4092.
- 7 Blumer N, Herz U, Wegmann M, et al. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 397-402.
- 8 Bønnelykke K, Pipper CB, Bisgaard H. Sensitization does not develop in utero. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 646-651.
- 9 Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002; 347: 869-877.
- 10 Burney PGJ, Chinn S, Rona RJ. Has the prevalence of asthma increased in children? Evidence from the National study of Health and Growth 1973 - 1986. *BMJ* 1990; 300: 1306-1310.

- 11 Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, et al. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/ early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 93-119.
- 12 Coffman RL. Origins of the TH1-TH2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 2006; 7: 539-541.
- 13 Dittrich AM, Erbacher A, Specht S, et al. Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol* 2008; 180: 1792-1799.
- 14 Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000; 164: 1814-1819.
- 15 Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, et al. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* 1998; 187: 561-569.
- 16 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336.
- 17 Gao JX, Madrenas J, Zeng W, et al. CD40-deficient dendritic cells producing interleukin-10, but not interleukin-12, induce T-cell hyporesponsiveness in vitro and prevent acute allograft rejection. *Immunology* 1999; 98: 159-170.
- 18 Gayle DA, Beloosesky R, Desai M, et al. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotrophin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R1024-1029.
- 19 Gentile DA, Schreiber R, Howe-Adams J, et al. Diminished dendritic cell interleukin 10 production in atopic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92: 538-544.
- 20 Gerberick GF, Curse LW, Miller CM, et al. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 1-10.
- 21 Gergen PJ, Weiss KB. The increasing problem of asthma in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 823-824.

- 22 Gerhold K, Blümchen K, Bock A, et al. Endotoxins Prevent Murine IgE Production, Th2 Immune Responses and Development of Airway Eosinophilia, but not Airway Hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 110-116.
- 23 Gerhold K, Blümchen K, Franke A, et al. Exposure to endotoxin in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 389-396.
- 24 Grüber C, Gerhold K, von Stuckrad S, et al. Common vaccine antigens inhibit allergen-induced sensitization, airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in a murine model. *Allergy* 2006; 61: 820–827.
- 25 Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, et al. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *Clin Invest* 1999; 103: 175–183.
- 26 Herz U, Gerhold K, Grüber C, et al. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 14: 867-874.
- 27 Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981; 42: 409-417.
- 28 Hoshino A, Tsuji T, Matsuzaki J, et al. STAT6-mediated signaling in Th2-dependent allergic asthma: critical role for the development of eosinophilia, airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion, distinct from its role in Th2 differentiation. *Int Immunol* 2004; 16: 1497-1505.
- 29 Hubeau C, Apostolou I, Kobzik L. Adoptively transferred allergen-specific T cells cause maternal transmission of asthma risk. *Am J Pathol* 2006; 68: 1931-1939.
- 30 Illi S, von Mutius E, Lau S, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001; 322: 390-395.
- 31 Isolauri E, Huurr A, Salminen S, et al. The allergy epidemic extends beyond the past few decades. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1007-1010.
- 32 Jenmalm MC, Björkstén B. Cord blood levels of immunoglobulin G subclass antibodies to food and inhalant allergens in relation to maternal atopy and the develop-

- ment of atopic disease during the first 8 years of life. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 34-40.
- 33 Kabesch M, Schedel M, Carr D, et al. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 269-274.
- 34 Kaisho T, Akira S. Toll like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 979-987.
- 35 Kennedy JD, Hatfield CA, Fidler SF, et al. Phenotypic characterization of T lymphocytes emigrating into lung tissue and the airway lumen after antigen inhalation in sensitized mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 613-623.
- 36 Kips JC, Brusselle GJ, Joos GF, et al. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 535-539.
- 37 Knapp S, Florquin S, Golenbock DT, et al. Pulmonary Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. *J Immunol* 2006; 176: 3189-3195.
- 38 Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol* 1996; 157: 1432-1439.
- 39 Lauener RP, Birchler T, Adamski J, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002; 360: 465-466.
- 40 Li B, Samanta A, Song X, Furuuchi K, et al. Foxp3 ensembles in T-cell regulation. *Immunol Reviews* 2006; 212: 99-113.
- 41 Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 379-392.
- 42 Liu AH, Leung DYM. Renaissance of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1063-1066.
- 43 Loibichler C, Pichler J, Gerstmayr M, et al. Materno-fetal passage of nutritive and inhalant allergens across placentas of term and pre-term deliveries perfused in vitro. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1546-1551.

- 44 McGuirk P, McCann C, Mills KHG. Pathogen-specific T Regulatory 1 Cells Induced in the Respiratory Tract by a Bacterial Molecule that Stimulates Interleukin 10 Production by Dendritic Cells: A Novel Strategy for Evasion of Protective T Helper Type 1 Responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 2002; 195: 221-231.
- 45 Michel O, Kips J, Duchateau J, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1641-1646.
- 46 Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties (Review). *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
- 47 Nickel R, Lau S, Niggemann B, et al. Messages from the German Multicentre Allergy Study. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13: 7-10.
- 48 O'Byrne PM. Cytokines or their antagonists for the treatment of asthma. *Chest* 2006; 130: 244-250.
- 49 Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest* 2004; 114: 28-38.
- 50 Peters M, Kauth M, Schwarze J, et al. Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* 2006; 6: 134-139.
- 51 Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, et al. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104: 1021-1029.
- 52 Ruiz RG, Kemeny DM, Price JF. Higher risk of infantile atopic dermatitis from maternal atopy than from paternal atopy. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 762-766.
- 53 Savage ND, Harris SH, Rossi AG, et al. Inhibition of TCR-mediated shedding of L-selectin (CD62L) on human and mouse CD4+ T-cells by metalloproteinase inhibition: analysis of the regulation of Th1/Th2 function. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2905-2914.

- 54 Schaub B, Campo M, He H, Perkins D, et al. Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. *Respir Res* 2006; 7/40:
- 55 Silva E, Possebon da Silva MD, Lefort J, et al. Endotoxins, asthma, and allergic immune responses. *Toxicology* 2000; 152: 31-35.
- 56 Stassen M, Fondel S, Bopp T, et al. Human CD25+ regulatory T-cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1303-1311.
- 57 Stock P, Akbari O, Berry G, . Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyperreactivity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1149-1156.
- 58 Strachan DP. House dust mite allergen avoidance in asthma. Benefits unproved but not yet excluded. *BMJ* 1998; 317: 1096-1097.
- 59 Sur S, Wild JS, Choudhury BK, . Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1999; 162: 6284-6293.
- 60 Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 625-635.
- 61 Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights into pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135: 173-186.
- 62 Tulic, MK, Knight DA, Holt PG, et al. Lipopolysaccharide inhibits the late-phase response to allergen by altering nitric oxide synthase activity and interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 640-646.
- 63 Tulic M, Wale JL, Holt PG, et al. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 604-612.
- 64 Umetsu DT, DeKruyff RH. Th1 and Th2 CD4+ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 1-6.

- 65 Unger WWJ, Jansen W, Wolvers DAW, et al. Nasal tolerance induces antigen-specific CD4+CD25- regulatory T-cells that can transfer their regulatory capacity to naive CD4+ T-cells. *Int Immunol* 2003; 15: 731-739.
- 66 Usui T, Preiss JC, Kanno Y, . T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *JEM* 2006; 203: 755-766.
- 67 Wang Y, McCusker C. Neonatal exposure with LPS and/ or allergen prevents experimental allergic airway disease: Development of tolerance using environmental antigens. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 143-151.
- 68 Weidinger S, Klopp N, Wagenpfeil S, et al. Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J Med Genet* 2004; 41: 658-663.
- 69 Yang IA, Fong KM, Holgate ST, . The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 23-28.
- 70 Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 2002; 8: 625-629.

# Anhang

## 1. Abkürzungsverzeichnis

- APC                      antigenpräsentierende Zelle
- aTreg                     adaptive regulatorische T-Zelle
- BAL                      bronchoalveoläre Lavage
- CD                        cluster of differentiation
- ConA                     Concanavalin
- Cy                        Cyanin
- DC                        dendritische Zelle
- DL                        Detektionslimit
- ELISA                    enzyme-linked immuno sorbent assay
- FACS                     fluorescence activated cell sorting
- FITC                     fluorescein-isothiocyanate
- Foxp                     forkhead box protein
- IFN                        Interferon
- Ig                         Immunglobulin
- IL                         Interleukin
- i.p.                        intraperitoneal
- LBP                        LPS-bindendes Protein
- LPS                        Lipopolysaccharid
- MAMP                    microorganism associated molecular pattern
- MHC                     major histocompatibility complex
- nTreg                    natürlicherweise vorkommende regulatorische T-Zelle
- OVA                      Ovalbumin

- PBS                    phosphate buffer saline
- PCR                    Polymerase-Kettenreaktion
- (p)DC                plasmazytoide dendritische Zelle
- Penh                  enhanced pause
- PE                     phycoerythrin
- PPR                    pattern recognition receptor
- RT                     Raumtemperatur
- STAT                  signal transducer and activator of transcription
- SI                     Stimmulationsindex
- T-bet                  T-box expressed in T-cells
- TCR                    T-Zell-Rezeptor
- TGF                    tumor-growth-factor
- Th                     T-Helfer
- TLR                    Toll-like-Rezeptor
- TNF                    Tumor-Nekrose-Faktor
- Treg                    regulatorische T-Zelle

## 2. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1: Hypothese.** In einem prädisponierten Organismus führt die Exposition mit einem Allergen zur Entwicklung von Th2-Zellen, die die Zytokine IL-4 und IL-13 produzieren und dadurch den Switch zur IgE-Produktion in B- bzw. Plasmazellen und die allergische Sensibilisierung induzieren. Die Zytokine IL-3, IL-4 und IL-5 sorgen für die Akkumulation eosinophiler Granulozyten ins Gewebe und sind damit für die allergische Entzündung verantwortlich. Die Zytokine IL-13 auch IL-9 induzieren eine vermehrte Schleimproduktion. Im Bereich der Atemwege resultiert infolge der entzündlich veränderten Schleimhaut, der vermehrten Schleimproduktion und einer verstärkten Muskelkontraktion eine bronchiale Obstruktion, die zu dem klinischen Bild des Asthma bronchiale führt. Im gesunden Organismus verhindern dagegen die natürlichen Antagonisten der Th2-Immunantwort, Th1- und regulatorische T-Zellen, ein Übergewicht der Th2-Zellen. Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass eine pränatal beginnende Exposition mit LPS Th1-Zellen in den Jungtieren induziert und so eine spätere allergenvermittelte Sensibilisierung und Atemwegsentzündung verhindert.

**Abbildung 2: Pränatal beginnende und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS vor allergischer Sensibilisierung der Jungtiere.** Trächtige BALB/c-Mäuse wurden vom Tag 7 der Tragzeit (Tag -14 des Protokolls) bis zur Entbindung mit aerosolisiertem LPS (1 µg/ 10 ml, Escherichia coli 0111:B4) dreimal wöchentlich exponiert. Bei einigen der Nachkommen wurde diese LPS-Exposition postnatal vom Tag 1 (Tag der Geburt) bis zum Tag 25 dreimal wöchentlich fortgeführt. Zwischen Tag 28 und Tag 42 wurden die Jungtiere systemisch mit OVA sensibilisiert (10µg/ 100µl/ Maus/ Dosis, 6 x, i.p.). Zur Induktion einer allergenbedingten Atemwegsentzündung erfolgten bei allen Tieren an den Tagen 56, 57 und 58 Provokationen mit OVA (100 mg/ 10 ml, 20 min./ Tag) über die Atemwege. Die Analyse der Tiere fand am Tag 60 statt. Einige Jungtiere wurden vor der Sensibilisierungsphase an den Tagen 1 und 28 des Protokolls analysiert.

**Abbildung 3: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die zelluläre Immunantwort der Jungtiere am Tag der Geburt.** Nach pränataler Exposition mit LPS wurde die Zytokinproduktion auf Einzelzellebene mittels intrazellulärem Zytokinnachweis in der FACS-Analyse in CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup> (= CD4<sup>+</sup>), CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>-</sup> Zellen der Milz am Tag der Geburt in den Jungtieren gemessen. Dargestellt sind die IFN-γ/ IL-4-Ratio (Abbildung 3 A und B) und die TNF-α/ IL-4-Ratio (Abbildung 3 C und D) nach pränataler LPS-

Exposition (LPS, graue Säulen) im Vergleich zur Placebo-Exposition (PBS, weiße Säulen, \* $p \leq 0,05$  versus PBS).

**Abbildung 4: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die allergen-induzierte Atemwegsentzündung.** Nach pränataler oder pränataler und postnatal fortgeführter LPS-Exposition wurde in den mit OVA sensibilisierten und über die Atemwege provozierten Tieren das Ausmaß der allergen-bedingten Atemwegsentzündung mittels Differenzierung der Leukozyten in der BAL (Abbildung 4A), das IL-5 (Abbildung 4B) in der BAL-Flüssigkeit mittels ELISA und die Atemwegsreaktivität *in vivo* (Abbildung 4C) nach inhalativer Provokation mit Methacholin mittels Ganzkörperplethysmographie am Tag 60 gemessen (\* $p < 0,05$  versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, † $p < 0,05$  versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere).

### 3. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die Atemwege nicht sensibilisierter Jungtiere am Tag 60.** Am Tag 60 des Protokolls wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht-sensibilisierten Tieren das Ausmaß einer neutrophilen Atemwegsentzündung in der BAL und die Atemwegsreaktivität untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen mit placebo-exponierten nicht sensibilisierten Tieren (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, nicht-sensibilisierte Tiere).

**Tabelle 2: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die humorale und zelluläre Immunantwort in nicht-sensibilisierten Jungtieren am Tag 28.** Am Tag 28 des Protokolls wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht sensibilisierten Tieren die Serumentiter des Gesamt-IgG2a mittels ELISA und die LPS-spezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz *in vitro* mittels <sup>3</sup>[H]-Thymidininkorporation untersucht. Die Ergebnisse wurden verglichen mit placebo-exponierten, nicht-sensibilisierten Tieren (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, nicht-sensibilisierte Tiere).

**Tabelle 3: Effekt der pränatalen Exposition mit LPS auf die Zytokinproduktion in nicht-sensibilisierten Jungtieren.** Die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit ConA oder LPS wurde nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in den nicht sensibilisierten Tieren an den Tagen 28 und 60 mittels ELISA gemessen (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, nicht-sensibilisierte Tiere). Am Tag 28 wurden die Milzzellen von jeweils drei Tieren einer Gruppe zusammengeführt; ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.

**Tabelle 4: Effekt der pränatal begonnenen und postnatal fortgeführten Exposition mit LPS auf die Immunglobulinproduktion nach systemischer Sensibilisierung.** Die Serumentiter der Gesamt- und OVA-spezifischen Immunglobuline wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS in OVA-sensibilisierten Tieren am Tag 60 mittels ELISA quantifiziert (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, †p < 0,05 versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere).

**Tabelle 5: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die allergen-vermittelte Proliferation und Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz *in vitro*.** Am Tag 60

wurde die Proliferation mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit OVA *in vitro* mittels  $^3\text{[H]}$ -Thymidininkorporation und die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz nach Stimulation mit ConA oder OVA *in vitro* mittels ELISA nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS und anschließender Sensibilisierung der Jungtiere mit OVA quantifiziert (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, †p < 0,05 versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere, DL = Detektionslimit).

**Tabelle 6: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die T-Zell-Differenzierung nach allergischer Sensibilisierung.** Die Aktivierungsmarker CD62L und CD25 wurde auf CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition und anschließender OVA-Sensibilisierung am Tag 60 mittels FACS-Analyse untersucht (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte, placebo-sensibilisierte Tiere, †p < 0,05 versus placebo-exponierte, OVA-sensibilisierte Tiere).

**Tabelle 7: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die Expression der T-Zelldifferenzierung regulierenden Transkriptionsfaktoren.** Die RNA-Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3, T-bet und Foxp3 wurden nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter LPS-Exposition und anschließender OVA-Sensibilisierung am Tag 60 mittels quantitativer Real-time-PCR im Lungengewebe untersucht.

**Tabelle 8: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die löslichen LPS-Rezeptoren LBP und CD14.** Die Serumtiter der löslichen LPS-Rezeptoren LBP und CD14 wurden nach pränataler oder pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS am Tag 60 mittels ELISA gemessen. Da sich die Daten für placebo- und OVA-sensibilisierte Tiere nicht unterschieden, wurden sie in den jeweiligen LPS-Gruppen zusammengeführt (\*p < 0,05 versus placebo-exponierte Tiere).

**Tabelle 9: Effekt der pränatalen LPS-Exposition auf die Expression der Membran gebundenen PPRs im Lungengewebe.** Die RNA-Expression der PPRs TLR-2, -4 und -9 wurden nach pränatal begonnener und postnatal fortgeführter Exposition mit LPS am Tag 60 mittels quantitativer Real-time-PCR gemessen.

#### **4. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich seit dem Anfang der wissenschaftlichen Tätigkeit auf vielfältige Weise unterstützt und so die Entstehung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Ich möchte hier gern an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Eckard Hamelmann für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die stetige Unterstützung bei dessen Weiterentwicklung, die finanzielle Organisation sowie die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe herzlich danken. Mein besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Ulrich Wahn für die vielseitige Unterstützung und die mir gegebene Möglichkeit, in Deutschland forschen zu können. Frau Dr. Kerstin Gerhold danke ich für ihre exzellente wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung bei den Experimenten und für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und die gute Zusammenarbeit. Ich bedanke mich herzlich bei Frau Christine Seib für die Einführung in das Labor und die stetige Motivation, für die freundliche Anleitung und ausdauernde Hilfe in technischen Fragen, für ihre hilfreichen Tipps und Ratschläge, die mir besonders in den Anfangsphasen der Promotion viel geholfen haben. Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hamelmann, der Arbeitsgruppe Stock sowie allen anderen Personen, die mir in den letzten Jahren über den Weg gelaufen sind, möchte ich für die schöne Zeit und all die netten Gespräche danken.

Ich möchte allen Organisatoren für die finanzielle Förderung danken, insbesondere der Studienstiftung des Abgeordnetenhauses von Berlin, der Sonnenfeldstiftung, der Forschungsförderung von Charité sowie der Kommission für wissenschaftliche Nachwuchsförderung und Weiterbildung der Charité Berlin.

Zuletzt danke ich ganz besonders meiner Familie für das Verständnis und die Unterstützung, die ich immer von ihr bekommen habe.

## 5. Publikationen

### 5.1 Originalarbeiten

1. Gerhold K., **Avagyan A.**, Reichert E., Blümchen K., Wahn U., Hamelmann E.: Lipopolysaccharides Modulate Allergen-Specific Immune Regulation in a Murine Model of Mucosal Tolerance Induction. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147: 25-34.
2. Schnoeller C., Rausch S., Pillai S., **Avagyan A.**, Wittig BM., Loddenkemper C., Hamann A., Hamelmann E., Lucius R., Hartmann S.: A Helminth Immunomodulator Reduces Allergic and Inflammatory Responses by Induction of IL-10-Producing Macrophages. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 4265-4272.
3. Jaudszus A., Krokowski M., Möckel P., Darcan Y., **Avagyan A.**, Matricardi P., Jahreis G., Hamelmann E.: Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice. *J Nutr.* 2008 Jul; 138(7): 1336-1342.
4. Dittrich AM., Erbacher A., Specht S., Diesner F., Krokowski M., **Avagyan A.**, Stock P., Ahrens B., Hoffmann WH., Hoerauf A., Hamelmann E.: Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. *J Immunol.* 2008 Feb 1; 180(3): 1792-1799.
5. Minne A., Jaworska J., Gerhold K., Ahrens B., **Avagyan A.**, Vanbever R., Matricardi PM., Schmidt AC., Hamelmann E.: Intranasal delivery of whole influenza vaccine prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway hyper-reactivity in mice. *Clin Exp Allergy.* 2007 Aug; 37(8): 1250-1258.
6. Feleszko W., Jaworska J., Rha RD., Steinhausen S., **Avagyan A.**, Jaudszus A., Ahrens B., Groneberg DA., Wahn U., Hamelmann E.: Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007 Apr; 37(4): 498-505.
7. Gerhold K.\*, **Avagyan A.\***, Seib C., Frei R., Steinle J., Ahrens B., Dittrich AM., Blumchen K., Lauener R., Hamelmann E.: Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Sep; 118(3): 666-673. Epub 2006 Jul 20.

8. Blumchen K., Gerhold K., Schwede M., Niggemann B., **Avagyan A.**, Dittrich AM., Wagner, B., Breiteneder H., Hamelmann E.: Effects of established allergen sensitization on immune and airway responses after secondary allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Sep; 118(3): 615-621. Epub 2006 Jul 28
9. Grüber C., Gerhold K., von Stuckrad SL., **Avagyan A.**, Quarcoo D., Ahrens B., Wahn U., Hamelmann E.: Common vaccine antigens inhibit allergen-induced sensitization and airway hyperresponsiveness in a murine model. *Allergy.* 2006 Jul; 61(7): 820-827.
10. Gerhold K., Blümchen K., Bock A., Franke A., **Avagjan A.**, Hamelmann E.: Endotoxins and allergy: lessons from the murine model. *Pathobiology.* 2002-2003; 70(5): 255-259. Review.
11. **Avagyan A.**: Special clinical Features in broncho-obstruktive Diseases in earl Childhood. *Collecton of scientific Works , Conference of Medical Students 1998, Yerevan.*

## 5.2 Originalarbeiten in Vorbereitung

1. Gerhold K.\*, **Avagyan A.\***, Reichert E., Wahn U., Hamelmann E.: Prenatal allergen exposure prevents later allergen-mediated sensitization and airway inflammatory responses in the offspring. In preparation.

## 5.3 Abstracts

1. Gerhold K., **Avagyan A.**, Reichert E., Seib C., Stock P., Hamelmann E.: Regulatory T cells protect from allergen-mediated sensitization and airway disease in offspring after specific tolerance induction in pregnancy. *ESI. Berlin, Germany.* 2009
2. Schnöller C., Rausch S., **Avagyan A.**, Lucius R., Worm M., Hamelmann E.: Infection with the gastrointestinal parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus* alters experimenral asthma but not atopic dermatitis . *Wold Immune Regulation Meeting, Davos 2007. Switzerland.*
3. Gerhold K., **Avagyan A.**, Seib C., Ahrens B., Jaworska J., Dittrich AM., Wahn U., Hamelmann E.: Prenatal Exposure with Aerosolized Allergen Prevents Subsequent Allergen-Induced Aensibilization and Airway Inflammation in Young Mice. *Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. San Diego, USA, März 2006.*

4. Gerhold K., **Avagyan A.**, Seib C., Ahrens B., Jaworska J., Dittrich A., Wahn U., Hamelmann E.: Prenatal Treatment with Aerosolized Allergen Inhibits Subsequent Allergen- Induced Sensitization and Airway Inflammation in Young Mice. Annual Meeting of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Vienna, Austria, Juni 2006. Allergy Clin. Immunol.. J Wold Allergy Org.
5. Ahrens B., Rha Ro-Dug, Freund T., Dittrich AM., **Avagyan A.**, Quarcoo D., Hamelmann E.: BCG priming of Dendritic Cells suppresses Th2 and enhances Th1 and T regulatory function in vitro and in vivo. Annual Meeting of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Vienna, Austria, Juni 2006. Allergy Clin. Immunol. J Wold Allergy Org.
6. Gerhold K., **Avagyan A.**, Beier K., Ahrens B., Quarcoo D., Hamelmann E.: Prenatal Exposure with Lipopolysaccharides Prevents Allergen Sensitization und Eosinophilic Airway Inflammation in a Murine Model. Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. San Antonio, USA, März 2005.
7. **Avagyan A.**, Gerhold K., Ahrens B., Dittrich AM., Quarcoo D., Beier K., Hamelmann E.: Prenatal Exposure with Aerosolized Lipopolysaccharides Prevents Subsequent Allergen- Induced Sensitization and Airway Inflammation in Young Mice. Annual Meeting of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Munich. Germany. Juni 2005. Allergy Clin. Immunol.. J Wold Allergy Org.
8. **Avagyan A.**, Wanis M., Arutjunyan K.: Basis Reasons of Formation of Inborn Heart Defects and Early Diagnosis. Young Doctors in the Threshold of the Third Millenium". Yerevan, Armenia 17.-22.09.2001.
9. **Avagyan A.**, Arutjunyan K.: Complex Treatment of Bronchobstructive Syndrome in Children at Early Ages. Young Doctors in the Threahold of the Third Millenim". Yerevan, Armenia 17.-22.09.2001.
10. **Avagyan A.**, Wanis, M.: Prophylaxis and Treatment of Disdiosis of Intestines by Eubiotics in Children of Early Ages. Young Doctors in the Threahold of the Third Millenim". Yerevan, Armenia 17.-22.09.2001.

## 6. Curriculum Vitae

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen □□  
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."



## **7. Erklärung an Eides Statt**

Ich, Anzhela Avagyan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Effekt der pränatalen Exposition mit Lipopolysacchariden auf die spätere allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in der jungen Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 29.04.2009