

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

DISSERTATION

**Einfluss von Schutzimpfungen auf die Entwicklung einer allergischen
Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in einem Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Sae Lim von Stuckrad

aus Seoul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. K. Gerhold

 2. Prof. Dr. med. B. Niggemann

 3. Prof. Dr. med. M. Kopp

Datum der Promotion: 25.10.2013

meinen Kindern Elias und Sanna

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	4
2	Einleitung.....	6
2.1	Allergische Erkrankungen und ihre Pathogenese	6
2.1.1	Epidemiologie allergischer Erkrankungen	6
2.1.2	Allergische Sensibilisierung.....	7
2.1.3	Allergische Entzündung.....	9
2.1.4	Atemwegsreaktivität.....	10
2.2	„Hygiene-Hypothese“.....	11
2.3	Pathomechanismus der „Hygiene-Hypothese“	14
2.3.1	Th1- und Th2- Immunantwort	14
2.3.2	Regulatorische T-Zellen.....	15
2.4	Immunantwort nach Immunisierung gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis.....	17
2.5	Hypothese der vorliegenden experimentellen Studie	18
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Tiere	22
3.2	Genehmigung nach Tierschutzgesetz	22
3.3	Immunisierung der BALB/c-Maus gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis.....	22
3.4	Sensibilisierung der BALB/c-Maus gegen Ovalbumin	24
3.5	Induktion einer allergen-bedingten Atemwegsentzündung in der BALB/c-Maus.....	25
3.6	Behandlungsprotokolle	26
3.6.1	DT- oder DTPw-Immunisierung vor Beginn der Allergensensibilisierung.....	26
3.6.2	DT-Immunisierung während der Allergensensibilisierung	27
3.7	Nachweis der allergischen Sensibilisierung	29
3.7.1	Serumgewinnung	29
3.7.2	Bestimmung der Immunglobuline aus dem Serum mittels ELISA	30
3.8	Nachweis der allergen-induzierten Atemwegsentzündung.....	35
3.8.1	Bronchoalveoläre Lavage	35
3.9	Ganzkörperplethysmographie zur Messung der Atemwegsreaktivität <i>in vivo</i>	37
3.10	Isolierung und Aufbereitung mononukleärer Zellen aus der Milz	40

3.11	Analyse der adaptiven zellulären Immunantwort	42
3.11.1	Zellkulturbedingungen	42
3.11.2	Antigen-/Allergenspezifische Proliferation mononukleärer Zellen	43
3.11.3	Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz.....	45
3.11.4	Durchflusszytometrie zur Differenzierung der T-Zellen aus der Milz.....	49
3.12	Statistische Auswertung.....	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Zelluläre Immunantwort nach DT- und DTPw-Immunsierung.....	53
4.1.1	Antigenspezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz <i>in vitro</i>	53
4.1.2	Antigenspezifische Zytokinproduktion <i>in vitro</i>	54
4.2	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die allergen-vermittelte Sensibilisierung, Atemwegsentzündung und Atemwegsreaktivität	55
4.2.1	Allergenspezifische Sensibilisierung nach DT- oder DTPw-Immunsierung.....	56
4.2.2	Allergen-bedingte Atemwegsentzündung nach DT- und DTPw-Immunsierung	58
4.2.3	Atemwegsreaktivität <i>in vivo</i> nach DT- und DTPw-Immunsierung	60
4.3	Einfluss der DT- oder DTPw-Immunsierung auf die T-zelluläre Immunantwort nach allergischer Sensibilisierung	61
4.3.1	T-Zell-Differenzierung	61
4.3.2	Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz <i>in vitro</i>	62
5	Diskussion.....	64
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literatur.....	75
8	Anhang.....	90
8.1	Abkürzungen	90
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	93
8.3	Tabellenverzeichnis.....	94
8.4	Danksagung	95
8.5	Publikation	96
8.6	Curriculum vitae	97
8.7	Erklärung an Eides Statt	98

2 Einleitung

2.1 Allergische Erkrankungen und ihre Pathogenese

Pirquet führte 1906 erstmalig den Begriff „Allergie“ ein, welcher eine pathologische, überschießende Reaktion eines Organismus nach einem zweiten oder weiteren Kontakt mit einem Fremdartigen (hier auch Allergen genannt) beschreibt. Es wird davon ausgegangen, dass der Entstehung dieser überschießenden Reaktion eine genetische Prädisposition zugrunde liegt, die als Atopie bezeichnet wird (*Casas, 2004*). Die resultierende, vom adaptiven Immunsystem vermittelte Entzündung kennzeichnet die klassischen Krankheitsbilder des atopischen Formenkreises: die Nahrungsmittelallergie, die atopische Dermatitis, die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale.

Charakteristisch für das allergisch bedingte Asthma bronchiale sind eine chronisch rezidivierende Entzündung der Bronchialschleimhaut und eine reversible Bronchokonstriktion. Durch Kontraktion der Bronchialmuskulatur, Schleimhautschwellung und vermehrtes Sekret entsteht eine obstruktive Ventilationsstörung mit der klinischen Symptomatik: Husten, giemendes Atemgeräusch und Dyspnoe bis hin zur respiratorischen Globalinsuffizienz.

2.1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

Allergische Erkrankungen gehören heute, insbesondere in den industrialisierten Ländern, zu den häufigsten Leiden. Zahlreiche epidemiologische Studien belegen weltweit bei Kindern und Erwachsenen einen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten, wenngleich die Sichtweisen und Verfahren der Diagnosestellung sich über die letzten Jahrzehnte in den ertragsstarken Nationen verändert haben (*Beasley et al.,*

2000, Masoli et al., 2004). Einen internationalen Vergleich erlaubt die „ISAAC-Studie“ (Asher et al., „International Study of Asthma and Allergies in Childhood“ 1998), wobei in 155 Zentren weltweit Daten hinsichtlich der Prävalenz des Asthma bronchiale, der allergischen Rhinokonjunktivitis und der atopischen Dermatitis bei Kindern erhoben worden sind. Es zeigte sich, dass in Ländern mit hohem britischen Bevölkerungsanteil sowie hohem sozio-ökonomischen Standard höhere Prävalenzen gefunden worden sind, z.B. in Australien, Neuseeland und England mit über 25%. Die Prävalenz beispielsweise des allergischen Asthma bronchiale bei Kindern zwischen 13 und 14 Jahren variierte weltweit zwischen 1,5% und 37%, in Europa zwischen 2,5% und 19,5% und in Deutschland zwischen 4% und 7%.

2.1.2 Allergische Sensibilisierung

Für die Entwicklung einer allergischen Erkrankung ist neben der Disposition die allergische Sensibilisierung des Organismus nach seinem ersten Kontakt mit dem entsprechenden Allergen die Voraussetzung. Für die Induktion einer Immunantwort muss das Allergen die äußeren Barrieren, wie z.B. Haut bzw. Bronchialschleimhaut, durchbrechen. Es wird von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen, prozessiert und weiteren immunkompetenten Zellen, den T-Lymphozyten, präsentiert. Je nach Lokalisation nehmen verschiedene Zellarten die Funktion der APCs ein: intraepitheliale dendritische Zellen (DCs) und Alveolarmakrophagen in den Lungen, Langerhans-Zellen in der Haut, B-Lymphozyten und Monozyten im peripheren Blut und in Lymphknoten. Ein inhalatives Allergen wird nach Durchtritt durch das Atemwegsepithel von DCs phagozytiert und in Form von Allergenfragmenten an der Oberfläche durch Komplexbildung mit Klasse II-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), sogenannten HLA-Antigenen, gebunden. So wird das Peptid an der Oberfläche präsentiert und kann als T-Zell-Epitop von den ruhenden

CD4-positiven T-Helfer-(Th-)Lymphozyten in der T-Zell-Zone der Lymphknoten erkannt werden (*Racioppi et al., 1993*). Dadurch werden die ruhenden, naiven T-Zellen zu allergenspezifischen Th-Effektorzellen aktiviert und produzieren spezifische Botenstoffe, die T-Zell-Zytokine. Neben der spezifischen Antigenerkennung (erstes Signal) ist ein zweites Signal für die vollständige Aktivierung der T-Zellen erforderlich: Als zweites Signal vermitteln ko-stimulatorisch wirkende B7-Moleküle (B7.1 und B7.2) auf den APCs durch Wechselwirkung mit dem T-zellulären Liganden CD28 die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu antigenspezifischen Th2-Lymphozyten (*Palmer et al., 1997, Renauld et al., 2001*). Th2-Zellen sezernieren die Interleukine (IL-) IL-4, -5, -10 und -13 (*Akdis et al., 2004; Renauld et al., 2001*). Von Th2-Zellen, aber auch von aktivierten Makrophagen, peritonealen B-Lymphozyten und Thymozyten, werden IL-4 und IL-10, welche die Expression des MHC-Klasse-II-Rezeptors und die Proliferation muriner B-Lymphozyten steigern, synthetisiert (*Paul et al., 1991, Punnonen et al., 1993, Clinchy et al., 1995*).

Die Antigenerkennung der inaktiven, antigenspezifischen B-Lymphozyten erfolgt über membranständige Immunglobuline (Ig). Sie differenzieren durch B-Zell-T-Zell-Interaktion zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen. Diese Interaktion wird durch das B-Zell-Oberflächenmolekül CD40 und den entsprechenden T-Zell-Liganden, CD40L (CD154), vermittelt. CD40 ist ein Glykoprotein, das von B-Zellen, dendritischen Zellen und Thymusepithelzellen exprimiert wird. B-Lymphozyten produzieren zunächst T-Zell-unabhängig membranständiges IgM. Th2-Zellen, die die Zytokine IL-4 und IL-13 sezernieren, leiten den Klassenwechsel zur IgE- und IgG4- im humanen Organismus, bzw. zur IgE- und IgG1-Synthese im murinen Organismus ein (*Jelinek et al., 2000, Stern et al., 2004, Van der Pouw-Kraan et al., 1998*). Daneben sind IL-5 und IL-6 als IgE-fördernde Zytokine beschrieben

worden (*Bacharier et al., 2000*). Das besondere funktionelle Merkmal der Zellen, die die allergische Entzündung auslösen, ist die Expression des hochaffinen Rezeptors für IgE (FcεRI). Hierzu gehören basophile und aktivierte eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen und aktivierte Langerhans-Zellen. Niedrigaffine FcεRII-Rezeptoren (CD23) werden zusätzlich auf eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Durch die Bindung des freigesetzten allergenspezifischen IgEs an diese zellulären FcεRI-Rezeptoren sind die Zellen allergenspezifisch sensibilisiert (*Turner et al., 1999, Payet et al., 1999*).

2.1.3 Allergische Entzündung

Nach vorausgegangener allergischer Sensibilisierung folgen beim Asthma bronchiale nach erneutem Allergenkontakt über die Bronchialschleimhaut die typischen Zeichen der allergischen Entzündung. Aufgrund der Pathogenese wird die allergische Entzündung in eine Sofort- und eine Spätreaktion unterteilt (*Turner et al., 1999*).

Sofortreaktion

Allergenmoleküle binden an das allergenspezifische IgE sensibilisierter Mastzellen, aber auch basophiler und eosinophiler Granulozyten. Durch Kreuzvernetzung mindestens zweier rezeptorgebundener IgE-Moleküle nach Bindung des spezifischen Allergens kommt es zur Aktivierung und Degranulation der Mastzelle. Hierbei werden präformierte oder schnell synthetisierte Mediatoren aus der Granula der Mastzellen, wie Histamin, Enzyme und Prostaglandine, freigesetzt. Sie wirken direkt auf die Blutgefäße und glatte Muskulatur (*Mayr et al., 2002, Williams et al., 2000*) und initiieren so die Sofortreaktion der Überempfindlichkeitsreaktion nach Coombs und Gell (Typ I Reaktion) (*Gordon et al., 1990*), welche sich innerhalb von Sekunden nach Allergenkontakt entwickelt (*Mayr et al., 2002*,

Williams et al., 2000). Die Entzündung der Sofortreaktion in den Atemwegen wird durch ein lokales Erythem und Ödem infolge Vasodilatation und gesteigerter Gefäßpermeabilität sowie Hypersekretion im Bereich der Schleimhäute und Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur charakterisiert (*Nadel, 1992*). Klinisch sind Husten und Atemnot als typisches Zeichen eines akuten Asthmaanfalls die Folge.

Spätreaktion

Nach ihrer allergenvermittelten Aktivierung produzieren die Zellen der allergischen Entzündung, hauptsächlich Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten, Entzündungsmediatoren wie Plättchen-Aktivierungs-Faktor (PAF), Sauerstoffradikale, Prostaglandine (PGD₂) und Leukotriene (LTC₄, LTD₄, LTB₄) sowie Zytokine, wie IL-1, IL-5, IL-6, den Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), transforming growth factor- (TGF-) α und β und Chemokine (*Mayr et al., 2002; Williams et al., 2000*). Diese pro-inflammatorischen Mediatoren führen innerhalb von acht bis zehn Stunden durch weitere Chemotaxis neutrophiler und eosinophiler Granulozyten sowie Lymphozyten, insbesondere Th2-Zellen, zur Entwicklung der Spätreaktion (*Miller und Schwartz, 1989, Buckley und Nijkamp, 1994, Brusselle et al., 1995*). Die Entzündung der Spätreaktion ist damit charakterisiert durch ein zunehmendes zelluläres Infiltrat und wird aufrechterhalten durch autokrine Aktivierung und Chemotaxis, insbesondere eosinophiler Granulozyten (*Gleich, 2000*).

2.1.4 Atemwegsreaktivität

Unter der Atemwegsreaktivität versteht man den Grad, mit dem die Atemwege auf unspezifische oder spezifische Stimulation mit einer Bronchokonstriktion reagieren. Bei einer

gesteigerten Atemwegsreaktivität führt eine Bronchokonstriktion zu einem pathologisch erhöhten Atemwegswiderstand. Eine Bestimmung der Atemwegsreaktivität ist durch Messung der Lungenfunktion nach Provokation der Atemwege mit unspezifischen und spezifischen Stimuli möglich: direkte Bronchokonstriktoren wie Methacholin, Histamin und Serotonin, aber auch physikalische Reize wie trockene oder kalte Luft, Anstrengung, Hyperventilation, oder auch virale Atemwegsinfekte. Klinisch können die typischen Symptome eines Asthmaanfalls auftreten. Zumeist dient die inhalative Provokation mit Methacholin oder Histamin zur klinischen Bestimmung der Atemwegsreaktivität mittels Ganzkörperbodyplethysmographie. Nach Inhalation dieser bronchokonstriktorischen Substanzen resultieren ein Anstieg des Atemwegswiderstandes und ein Abfall des forcierten expiratorischen Volumens in der 1. Sekunde (FEV₁). Der genaue Pathomechanismus der Entwicklung einer erhöhten Atemwegsreaktivität ist noch weitgehend unbekannt. Diskutiert werden multifaktorielle Mechanismen, die zur gesteigerten Atemwegsreaktivität beitragen könnten, wie eine funktionelle oder strukturelle Abnormalität der Atemwegsmuskulatur in Form von Hypertrophie oder Hyperplasie (*De Jongste et al., 1989 und 1991*), strukturelle Verengung der Atemwege mit Erhöhung des Atemwegswiderstandes (*James et al., 1989*) und neurologische Ungleichgewichte der erregenden und hemmenden Nervenleitbahnen einhergehend mit einer Kontraktion der glatten Muskulatur und Sekretion in die Atemwege (*Matera et al., 2002*).

2.2 „Hygiene-Hypothese“

Die „Hygienehypothese“ wurde erstmals von Strachan 1989 aufgestellt. In seiner kurzen Arbeit, erschienen im British Medical Journal, schlug er als Erklärung für das vermehrte Auftreten allergischer Erkrankungen verbesserte Hygienemaßnahmen mit dadurch

verminderter Infektionsübertragung in den zusätzlich zunehmend kleiner werdenden Familien vor (*Strachan et al., 1989*). In der nachfolgenden Zeit wurden immer mehr epidemiologische Hinweise dargelegt, dass virale und bakterielle Infektionen in der frühen Kindheit möglicherweise einen protektiven Effekt auf die spätere Entwicklung allergischer Erkrankungen ausüben (*Martinez et al., 1999, Flohr et al., 2012, Amarasekera et al., 2012*). Kinder, aufgewachsen im städtischen Umfeld mit einer geringen mikrobiellen Exposition in früher Kindheit, haben möglicherweise ein nicht genügend stimuliertes Immunsystem und entwickeln eher eine pro-allergische Immunitätslage, wodurch das Auftreten einer Allergie begünstigt wird (*Liu, 2007*).

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurde der Begriff des „Farmeffektes“ etabliert: Eine allergenbedingte Sensibilisierung und Rhinokonjunktivitis wurde bei Individuen, die in der frühen Kindheit auf dem Land Tierkontakt hatten, seltener beobachtet als bei Individuen, die zwar auf dem Land, jedoch nicht auf einem Bauernhof mit Tierkontakt aufwuchsen (*Braun-Fahrländer, 2002*). Hintergrund dieses protektiven „Farmeffektes“ stellt wahrscheinlich die intensive Auseinandersetzung mit mikrobiellen Komponenten in organischen Stäuben dar. Epidemiologische Studien und tierexperimentelle Daten weisen hier auf protektive Effekte insbesondere durch Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien und Lipoteichonsäuren grampositiver Bakterien hin (*Braun-Fahrländer, 2003, Schaub et al., 2006, Gerhold et al., 2006, Debarry et al., 2007 und 2010, Rigaux et al., 2009*).

Die Rolle aktiver Impfungen für die Entwicklung allergischer Erkrankungen wurde und wird im Zuge der Auseinandersetzung mit der „Hygiene-Hypothese“ kontrovers diskutiert. Wie natürliche Infektionen stimulieren aktive Impfungen das adaptive Immunsystem und

induzieren eine protektive Immunantwort gegen das Impfantigen und damit auch gegen das natürliche, infektiöse Antigen.

Ende der 1990er Jahre konnte bei Kindern anthroposophischer Familien eine geringere Allergieprävalenz als in anderen Familien gezeigt werden (*Alm et al., 1999*). Seither stehen Impfungen, insbesondere die Masernimpfung, die dem anthroposophischen Lebensstil entgegensteht, in der Diskussion, als möglicher Promotor der Allergieentwicklung zu gelten. Die Vermutung eines positiven Zusammenhanges wurde möglicherweise zusätzlich durch den zufälligen zeitlichen Zusammenfall der ersten Schutzimpfung gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis, und den ersten allergischen Symptomen um den dritten Lebensmonat unterstützt. Im Einklang dazu zeigten einige retrospektive Studien eine niedrigere Prävalenz der Atopie unter Kindern mit einer geringeren Impftrate gegen Masern, aber auch gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis (*Odent et al., 1994, Kemp et al., 1997, Hurwitz et al., 2000*). Keinen Zusammenhang zwischen diesen Impfungen und dem kindlichen Asthma wurde dagegen in einem großen Datenbestand von Gesundheitsorganisationen gefunden (*DeStefano et al., 2002*). Ähnlich hatte die Impfung gegen Pertussis keine Auswirkung auf die Prävalenz atopischer Erkrankungen in einer schwedischen randomisierten, placebo-kontrollierten Interventionsstudie (*Nilsson et al., 1998*). Andere epidemiologische Daten wiesen darauf hin, dass Impfungen möglicherweise zur Allergieprävention beitragen (*Grüber et al., 2001*). So wurde eine umgekehrte Assoziation zwischen der Gesamtzahl der Impfdosen und der Prävalenz der allergischen Sensibilisierung oder atopischen Dermatitis in einer Geburtskohorte gefunden (*Grüber et al., 2003*). Vereinbar mit diesen Ergebnissen wurde in einer populationsbasierten Untersuchung bei Jugendlichen, die gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis geimpft waren, ein geringeres Risiko verzeichnet, Asthma oder andere

atopische Erkrankungen zu entwickeln, als bei nicht geimpften Jugendlichen (*Martignon et al., 2005*).

2.3 Pathomechanismus der „Hygiene-Hypothese“

Immunologischer Hintergrund für die „Hygiene-Hypothese“ und im Besonderen für eine mögliche Prävention allergischer Erkrankungen durch Impfungen stellte die zunächst angenommene Dichotomie des zellulären Immunsystems dar.

2.3.1 Th1- und Th2- Immunantwort

Erstmalig wurde aufgrund unterschiedlicher Zytokinmuster die Einteilung der murinen CD4⁺ Lymphozyten in zwei Subklassen, Th1 und Th2, von Mosmann und Coffman beschrieben (*Mosmann et al., 1986 und 1989, Coffman, 2006*). Th2-Zellen, die die charakteristischen Zellen der allergischen Sensibilisierung sind, produzieren IL-4, IL-5 und IL-13. Th1-Zellen induzieren infolge bestimmter viraler und bakterieller Infektionen die Produktion von IL-2 und Interferon- (IFN-)γ.

Von einer gemeinsamen naiven Vorläuferzelle ausgehend, die zwar IL-2, jedoch nicht IL-4 oder IFN-γ produzieren kann, entwickelt sich nach antigenspezifischer Stimulation zunächst die sogenannte Th0-Zelle, die sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine synthetisiert (*Sad und Mosmann, 1994, Wang et al., 2001*).

Th0-Zellen differenzieren sich in Gegenwart von IL-4, das aus Mastzellen, Eosinophilen und T-Zellen selbst sezerniert wird, zu IL-4 produzierenden Th2-Zellen (*Le Gros et al., 1990, Hsieh et al., 1993, Renauld, 2001*). IL-4 steuert die humorale Immunantwort, indem es direkt den Isotypenwechsel von IgM zu IgE bzw. IgG1 bei der Maus bewirkt (*Lebman and Coffman,*

1988). IL-5 ist eines der wichtigsten Mediatoren der allergischen Entzündung. Seine Wirkung ist chemotaktisch und aktivierend gegenüber Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten, deren Apoptose es zusätzlich inhibiert (*Yamaguchi et al., 1988, Gani et al., 1998*).

Durch eine Th1-Immunantwort bei Infektionen mit intrazellulären Bakterien wie Mykobakterien, produzieren antigenpräsentierende Makrophagen und B-Lymphozyten IL-12 und IL-18, die die Differenzierung von Th0- in Th1-Zellen vermitteln (*Le Gros et al., 1990, Hsieh et al., 1993, Chung, 2001, Leonard et al., 2003*). Auch IFN- γ führt zu einer Differenzierung der Th0- zur Th1-Zelle (*Bradley et al., 1996*) und kann gleichzeitig die Th2-Differenzierung hemmen (*Maggy et al., 1992*). Weiter wird sowohl die IL-12 Produktion als auch die Aktivierung von Makrophagen durch IFN- γ unterstützt. Es entsteht ein auto-regulatorisches positives Feedback, woraus eine starke Th1-Immunantwort direkt gegen das Antigen resultiert (*Wills-Karp, 1998*).

Insgesamt entsteht durch die Differenzierung der Th1- und Th2-Zellen eine dynamische Interaktion der Zytokine, die physiologischerweise in einem Gleichgewicht miteinander stehen. Es wird angenommen, dass durch Mangel einer Zellpopulation und damit auch durch Mangel der entsprechenden Zytokine ein immunologisches Ungleichgewicht entsteht. So könnte durch fehlende mikrobielle Stimulation des Immunsystems ein Mangel an Th1-Zellen und eine Dominanz der Th2-Zellen mit verstärkter Neigung zur allergischen Sensibilisierung resultieren.

2.3.2 Regulatorische T-Zellen

Seit Mitte des ersten Jahrzehnts des 21. Jahrhunderts sind regulatorische T-Zellen (Tregs) zunehmend in den Fokus der Forschung um die Pathogenese und Prävention allergischer

Erkrankungen gerückt. So beschrieben Akdis und Kollegen 2004 erstmals, dass Tregs bei atopischen Erkrankungen vermindert vorzufinden sind (*Akdis et al., 2004*).

Als Untergruppe der CD4⁺ T-Zellen sorgen Tregs für die Entwicklung und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz, das heißt der physiologischen „Nicht-Reaktivität“ gegen körpereigene oder harmlose körperfremde Antigene. Sich im Thymus entwickelnde T-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, werden durch den Mechanismus einer „negativen Selektion“ entfernt; T-Zellen dagegen, die Fremd- von Selbstantigen unterscheiden, entwickeln sich nach einem Prozess der „positiven Selektion“ natürlicherweise im Thymus (natural occurring Tregs = nTregs). Charakteristisch für sie ist ihre antigenunabhängige immunsuppressive Wirkung, die wesentlich zur Verhinderung von Autoimmunität beiträgt. Ihre Identifizierung ist unter anderem anhand des Oberflächenmoleküls CD25- der membrangebundenen IL-2R α -Kette- und dem Transkriptionsfaktor forkhead box protein (Foxp)3 möglich (*Li, 2006*).

Eine heterogene Gruppe adaptiver, antigenspezifischer Tregs (aTregs) entstehen nach Kontakt mit einem Fremdartigen in der Peripherie. Ihre Entwicklung wird durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 induziert, die durch DCs produziert werden. Kompliziert wird ihre Identifikation durch die späte Expression des Oberflächenmoleküls CD25 und der unvollständigen Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*Li, 2006*). ATregs wirken durch ihre Zytokine IL-10 und TGF- β aber auch durch ihre Oberflächenmoleküle cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA)4 und programmed death (PD)-1 immunsuppressiv und induzieren eine lebenslange Toleranz gegen spezifische Antigene (*Wan et al., 2006*). Dieser Mechanismus wird bei der allergenspezifischen Immuntherapie gegen allergische

Erkrankungen genutzt (*Umetsu et al., 2006*). Werden spezifische DCs mit einem Allergen und Hitze inaktivierter *Listeria monocytogenes* als Adjuvans zur Produktion von IL-10 und IL-12 aktiviert, können sie die Entwicklung Th1-ähnlicher aTregs induzieren. Diese aTregs produzieren IL-10- und IFN- γ exprimieren Foxp3 und den Transkriptionsfaktor T-bet (T-box expressed in T-cells) und können die Entwicklung einer gesteigerten allergisch bedingten Atemwegsreaktivität in der Maus verhindern (*Stock et al., 2004*).

2.4 Immunantwort nach Immunisierung gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis

Corynebacterium diphtheriae, *Clostridium tetani* und *Bordetella pertussis* sind extrazelluläre Bakterien, deren Pathogenität durch Exotoxine vermittelt wird. Die protektive Immunantwort nach Wildinfektion, aber auch nach Impfung, wird durch gegen Toxinantigene produzierte Antikörper (Antitoxine) vermittelt und stellt damit vor allem eine Funktion des humoralen Immunsystems dar (*Deutsche Gesellschaft für Infektiologie e.V., 2003*).

Bei der humoralen Immunantwort gegen Impfantigene bindet die B-Zelle durch den B-Zellrezeptor direkt das Impfantigen und wird dadurch aktiviert. Die vollständige B-Zellaktivierung ist T-Zell-abhängig: Die impfantigentragenden B-Zellen benötigen ein zweites Signal von impfantigenspezifischen Th2-Zellen. Impfantigenspezifische B-Zellen können das gebundene Impfantigen phagozytieren, intrazellulär prozessieren und einzelne Antigenbestandteile, die Epitope, über MHC-II Moleküle antigenspezifischen naiven T-Zellen präsentieren. Diese naiven T-Zellen erkennen das Epitop mit Hilfe ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors und werden zu Th2-Zellen aktiviert. Th2-Zellen liefern das zweite Signal zur Aktivierung der impfantigenspezifischen B-Zellen über ihr Zytokin IL-4: IL-4 fördert das B-

Zellwachstum und aktiviert B-Zellen zu Plasmazellen, die gegen die Impfantigene gerichtete Antikörper sezernieren. Für einen langjährigen Schutz vor der jeweiligen Wildinfektion sorgen nach der Impfung sich entwickelnde B-Gedächtniszellen, die nach einem erneuten Kontakt mit dem Impf- oder Wildantigen für eine schnellere und stärkere Produktion protektiver Antikörper sorgen (*Ada, 1990; Germain, 1994*).

Die entsprechenden Impfstoffe gegen Diphtherie und Tetanus enthalten die Exotoxine als formalin-inaktivierte Toxoide, im folgenden mit D und T abgekürzt, die ihre Adhäsionsfähigkeit an Zielzellen und damit ihre zytotoxischen Eigenschaften verloren haben. Der sich aktuell auf dem Markt befindende azelluläre Impfstoff gegen Pertussis enthält bis zu fünf Antigene verschiedener virulenzvermittelnder Strukturen der *Bordetella pertussis*; hierzu gehören das Exotoxin, aber auch Antigene der Fimbrien und das filamentöse Hämagglutinin (*Deutsche Gesellschaft für Infektiologie e.V., 2003*).

Die ganzzelluläre Pertussisvakzine (Pw) enthält nicht nur die einzelnen Antigene, sondern besteht aus dem inaktivierten vollständigen Bakterium. Es wurde gezeigt, dass Pw nicht nur eine protektive humorale Immunantwort induziert, sondern auch zu einer starken zellulären Immunantwort führt, die zur Protektion gegen die Wildinfektion mit *Bordetella pertussis* beiträgt. Diese ist charakterisiert durch die Entwicklung IL-2 und IFN- γ produzierender Th1-Zellen (*Ausiello et al., 1997, Ryan et al., 1998*).

2.5 Hypothese der vorliegenden experimentellen Studie

Impfantigene, wie D, T und Pw lösen über die humorale Immunantwort und damit über IL-4 die Produktion spezifischer IgG- und IgM-, aber auch spezifischer IgE-Antikörper aus. Das

Auftreten einer solchen spezifischen Immunantwort, auch unter nicht-atopischen Kindern legt nahe, dass die IgE-Bildung gegen Impfantigene Teil einer normalen Immunantwort ist. Diese antigenspezifische IgE-Produktion kann allerdings bei Individuen, die zur Atopie prädisponiert sind überschießend und verlängert sein (*Aalberse et al., 1995, Dannemann et al., 1996, Nilsson et al., 1998*). Diese Ergebnisse trugen zur Annahme bei, dass Schutzimpfungen bei Kindern die IgE-Bildung gegen verschiedenste Umweltallergene begünstigen und daher zur zunehmenden Prävalenz atopischer Erkrankungen führen könnten (*Odent et al., 1994, Rook and Stanford, 1998, Rook et al., 1998*). Zusätzlich wurde ein indirekt proallergischer Effekt durch Unterdrückung Th1-assoziiierter Infektionen, gegen die geimpft wurde, diskutiert (*Alm et al., 1999, Flöistrup et al., 2006*).

Demgegenüber konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bei Kindern im Alter von 2 Lebensjahren, die mit D und T sowie gleichzeitig mit Pw geimpft worden waren, die Serumtiter der impfantigenspezifischen IgE- und IgG4-Antikörper geringer waren als bei Kindern, die zwar mit D und T, jedoch nicht mit Pw geimpft worden waren (*Grüber et al., 2001*). Der protektive Effekt von Pw auf die Serumtiter der impfantigenspezifischen IgE- und IgG4-Antikörper war dabei abhängig von der Anzahl der verabreichten Impfungen und damit von der Gesamt-Impfdosis (*Grüber et al., 2001*). Die gleichzeitige Impfung mit Pw beeinflusste dagegen nicht die Serumtiter der schützenden T- bzw. D-spezifischen IgG-Antikörper und war nicht mit einer häufigeren Sensibilisierung gegen Aeroallergene wie Hausstaub assoziiert. In weiteren experimentellen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Pw geringere Serumtiter an IgE gegen Pertussistoxin induziert als der azelluläre Impfstoff (*Grüber et al., 2001*). In späteren und zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannten Arbeiten

wurde zusätzlich gezeigt, dass der Pw mit einer starken Th1-Immunantwort assoziiert ist (Dirix et al., 2009).

Diese bis dahin kontrovers diskutierten Ergebnisse zu Impfungen und allergischer Sensibilisierung führten zu diesem Zeitpunkt zu zwei prinzipiellen und wichtigen Fragestellungen:

1. Sind die D-, T- und Pw-Impfungen mit einem erhöhten Sensibilisierungsrisiko gegen Umweltallergene behaftet oder ist diese Annahme, den aktuellen klinisch epidemiologischen Daten entsprechend, zu verwerfen?
2. Wirken die D-, T- und Pw-Impfungen protektiv gegen die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung?

Gerade die zweite Fragestellung ist in einem größeren gesellschafts- und gesundheitspolitischen Kontext zu sehen: Nach aktuellem Kenntnisstand überwiegen die Vorteile der Schutzimpfungen durch die effektive Prävention bedrohlicher Infektionen bei weitem ihre potentiellen Risiken im Hinblick auf die Allergieentwicklung. Kann zusätzlich ein protektiver Effekt von Impfungen auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen gezeigt werden, könnten diese Ergebnisse gesundheitspolitisch sowohl für die Impfraten atopisch prädisponierter Kinder in Form der Elternberatung, als auch für die Entwicklung allergiepräventiver Maßnahmen für die atopisch prädisponierten Kinder von großer Bedeutung sein.

Mit diesem Hintergrund und basierend auf den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, ergab sich die Hypothese für die vorliegende experimentelle Arbeit:

Eine systemische Vakzinierung gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis vor oder gleichzeitig mit einer systemischen Allergenexposition induziert eine Th2-antagonisierende Immunantwort, die die allergische Sensibilisierung und Entwicklung einer verstärkten Atemwegsreaktivität in einem Mausmodell für die allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung unterdrückt.

Als Zielgrößen sollte nach vorausgegangener oder gleichzeitiger Immunisierung gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis die Entwicklung einer nachfolgenden allergenvermittelten

- a. Sensibilisierung, gemessen anhand der allergenspezifischen IgE-Produktion
- b. erhöhten *in vivo* Atemwegsreaktivität
- c. zellulären Immunantwort

in diesem Mausmodell untersucht werden.

Für eine solche Analyse ist ein Mausmodell besonders geeignet, da es eine Vielzahl an immunologischen Werkzeugen und Antikörpern gibt und die zelluläre Immunreaktion des murinen Immunsystems in eine dichotome Th1- und Th2-Immunantwort differenziert werden kann (*Mosmann et al., 1989, Taube et al., 2004*). In der vorliegenden Arbeit wurden BALB/c-Mäuse eingesetzt, da dieser Mausstamm als genetisch determinierter IgE-„high-responder“ nach einer allergischen Sensibilisierung größere Mengen an allergenspezifischem IgE produziert als andere Mäusestämme (*Holt, 1982*).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Sechs bis zwölf Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, D) wurden in individuell ventilierten Käfigen unter pathogen-armen Bedingungen in klimatisierten Räumen gehalten (SPF-Haltung; Temperatur $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 61 % relative Luftfeuchtigkeit, konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden). Die Tiere erhielten ovalbuminfreies Futter und Wasser ad libitum. Zur Wahrung der Keimarmut erfolgte die Behandlung der Tiere unter einer Sicherheitswerkbank.

3.2 Genehmigung nach Tierschutzgesetz

Die tierexperimentelle Studie ist nach § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes durch das damals zuständige Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin am 30.03.1999 genehmigt, verlängert bis 31.12.2003 unter dem Geschäftszeichen G0410/98 worden.

3.3 Immunisierung der BALB/c-Maus gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis

Prinzip

Das Protokoll zur *in vivo* Immunisierung von BALB/c-Mäusen gegen Diphtherie, Tetanus und Pertussis wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eng an bereits publizierte Daten zur Immunisierung von Mäusen mit DT (*Lavigne et al., 2004*) angelehnt, da im Vordergrund der Fragestellung nicht die Mechanismen der Immunisierung standen, die eine

Protokolletablierung mit Dosis-Wirkungseffekten erforderlich gemacht hätten, sondern, im Sinne eines „Proof of concept“, der Effekt einer Immunisierung auf die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung.

Die Immunisierung der BALB/c-Maus erfolgte mit dem Kombinationsimpfstoff aus Diphtherie- und Tetanustoxoid sowie der ganzzellulären Pertussisvakzine. Den bereits publizierten Protokollen entsprechend (*Lavigne et al., 2004*), erhielten BALB/c Mäuse eine Impfdosis von 40 % der bei Kindern wirksamen Dosis (in internationalen Einheiten, IE) des gängigen Kombinations-Kinderimpfstoffes gegen D (30 IE) und T (40 IE) und des Pw-Impfstoffes (15×10^9 Keime). Die Einzeldosis pro Maus entsprach damit für D 12 IE, für T 16 IE und für Pw 6×10^9 Keime = 6 optical units (OU, 1OU = 10^9 Keime). Die Immunisierung erfolgte subkutan (s.c.) in den Nacken der Mäuse, da eine wie bei Kindern intramuskuläre Applikation aufgrund der geringen Muskelmasse der Mäuse nicht möglich ist. Eine Grundimmunisierung ist bei Kindern erst nach dreimaliger Applikation der DTP-Impfung gewährleistet; daher wurde hier ebenfalls diese Frequenz gewählt. Alle kommerziell erhaltenen Impfstoffe waren mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid versetzt, das grundsätzlich die Entwicklung einer Th2-Immunantwort unterstützt (*Brewer et al., 1999*).

Die Immunisierung der Tiere erfolgte vor Beginn der Sensibilisierung mit einem Allergen; um den Effekt der Immunisierung gegen D, T oder Pw während einer Sensibilisierungsphase zu untersuchen, wurden Immunisierung und Sensibilisierung zusätzlich simultan durchgeführt.

Material

Diphtherie- und Tetanus-Impfstoff Mérioux Aventis Pasteur MSD, Leimen, D

für Kinder (DT)

Pertussis ganzzellulär (Pw)	Behring, Marburg, D
PBS-Dulbecco	PAA Laboratories, Linz, A
1 ml-Spritzen (Omnifix®)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (0,4 x 20mm)	Terumo Europe N.V., Leuven, B

BALB/c Mäuse wurden je einmal an den Tagen -21, -14 und -7 des Protokolls mit dem Kombinationsimpfstoff gegen D (Einzeldosis 12 IE/ Maus) und T (Einzeldosis 16 IE/ Maus) oder mit diesem Impfstoff in Kombination mit Pw (Einzeldosis 6×10^9 Keime/ Maus) s.c. immunisiert (Nackebereich, Gesamtvolumen 500 μ l/ Applikation/ Maus) (Behandlungsprotokoll I).

In einem weiteren Ansatz erhielt eine Gruppe von BALB/c-Mäusen an den Tagen -21, -14 und -7 eine Placebo-Immunsierung mit PBS; diese Gruppe wurde an den Tagen 1, 3 und 5 mit DT immunisiert und gleichzeitig gegen Ovalbumin sensibilisiert (Behandlungsprotokoll II).

3.4 Sensibilisierung der BALB/c-Maus gegen Ovalbumin

Prinzip

Das Allergen Ovalbumin (OVA) ist ein weitverbreitet eingesetztes Modellallergen, das zu einer zuverlässigen allergen-vermittelten Sensibilisierung der BALB/c-Maus führt (*Ohkawara et al., 1997, Gerhold et al., 2003*), die mit standardisierten Methoden nachweisbar ist; daher wurde dieses Allergen auch hier eingesetzt. Die Sensibilisierung der BALB/c-Maus mit OVA erfolgte systemisch, das heißt intraperitoneal (i.p.), nach einem in unserem Labor bereits

etablierten Protokoll (*Gerhold et al., 2003*). Prinzip ist die Entwicklung von allergenspezifischem IgE nach wiederholter systemischer Applikation des Allergens.

Material

Ovalbumin (Grad VI)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
PBS-Dulbecco	PAA Laboratories, Linz, A
1 ml-Spritzen (Omnifix®)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (0,4 x 20mm)	Terumo Europe N.V., Leuven, B

Durchführung

Zur systemischen Sensibilisierung wurden BALB/c Mäusen 10µg OVA (Grad VI), in sterilem PBS gelöst, in einem Volumen von 100µl/Maus sechsmal an den Tagen 1, 3, 5 und 10, 12, 14 i.p. injiziert. Zur Kontrolle der Sensibilisierung erfolgte bei einer Gruppe von Tieren eine Placebo-Sensibilisierung mit PBS anstelle des OVAs in einem Volumen von 100 µl s.c. an den Tagen 1, 3, 5 und 10, 12, 14.

3.5 Induktion einer allergen-bedingten Atemwegsentzündung in der BALB/c-Maus

Prinzip

Nach systemischer Sensibilisierung induzieren wiederholte Allergenprovokationen über die Atemwege eine allergen-vermittelte Atemwegsentzündung in der Maus (*Clay et al., 1983*). Die Tröpfchengröße des verwendeten Allergen-Aerosols betrug 1-2µm und war somit lungengängig.

Material

Ovalbumin (Grad V)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
PBS-Dulbecco	PAA Laboratories, Linz, A
Plastikkammer (20 x 20 x 15 cm ³)	Spec Lab, Berlin, D
Pari-Boy®	Pari-Werke, Starnberg, D
1 ml-Spritzen (Omnifix®)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (0,4 x 20mm)	Terumo Europe N.V., Leuven, B

Durchführung

Zur Induktion der allergischen Atemwegsinfektion erfolgten inhalative Allergenprovokationen (per inhalationem, p.i.) dreimal an den Tagen 28, 29 und 30. Hierzu wurden die Tiere in eine Plastikkammer mit abnehmbarem Deckel und Abzugsschlauch gesetzt, in die das Allergen (OVA, Grad V, 1%, 5mg OVA/50ml in PBS) als Aerosol 20 Minuten kontinuierlich zugeführt wurde. Eine Placebo-Inhalation wurde nicht durchgeführt.

3.6 Behandlungsprotokolle

3.6.1 DT- oder DTPw-Immunsierung vor Beginn der Allergensensibilisierung

BALB/c Mäuse erhielten die DT- oder DTPw-Immunsierung jeweils dreimal im Abstand von 7 Tagen an den Tagen -21, -14, -7 (Abbildung 1). Die allergische Sensibilisierung der Tiere erfolgte mittels sechsmaliger intraperitonealer Applikationen des Allergens OVA zwischen den Tagen 1 und 14; die allergen-vermittelte Atemwegsinfektion wurde mittels inhalativer Allergenexposition (p.i.) an den Tagen 28, 29 und 30 induziert (Abbildung 1). Die

Messung der Atemwegsreaktivität *in vivo* erfolgte am Tag 32, die Analysen der weiteren Zielgrößen allergische Sensibilisierung und Atemwegsinflammation am Tag 33 (Abbildung 1).

Zur Kontrolle der Immunisierung gegen DT oder DTPw erhielten die nur sensibilisierten Tiere, die Positivkontrollen (PBS/OVA-Tiere), an den Tagen -21, -14 und -7 jeweils eine subkutane Placebo-Immunisierung mit PBS, bevor sie mit OVA sensibilisiert wurden. Zum Nachweis einer regelrechten allergen-vermittelten Sensibilisierung wurde eine Gruppe von Tieren mit einer Placebo-Immunisierung an den Tagen -21, -14 und -7 sowie mit einer Placebo-Sensibilisierung mit PBS zwischen den Tagen 1 und 14 behandelt (Negativkontrolle, PBS/PBS). Da die PBS/OVA-Tiere grundsätzlich wie die gegen DT oder DTPw immunisierten Tiere (DT/OVA- oder DTPw/OVA-Tiere) behandelt wurden, jedoch keine Immunisierung erhielten, wurde auf eine weitere Kontrollgruppe, die zwar immunisiert, jedoch nicht sensibilisiert wurde, verzichtet. Der Erfolg der Immunisierung gegen DT bzw. DTPw wurde dementsprechend in Relation zu den nicht-immunisierten PBS/OVA-Tieren gemessen. Die Tierzahlen pro Gruppe sind in Tabelle I dargestellt.

3.6.2 DT-Immunisierung während der Allergensensibilisierung

BALB/c Mäuse erhielten vor systemischer Sensibilisierung Placebo-Immunisierungen mit PBS (Tage -21, -14, -7). Während der systemischen Sensibilisierung mit Ovalbumin zwischen den Tagen 1 bis 14 erfolgten subkutane DT-Immunisierungen an den Tagen 1, 3 und 5 (jeweils direkt vor der OVA-Sensibilisierung) (Abbildung 2). Die allergen-vermittelte Atemwegsinflammation wurde mittels inhalativer Allergenexposition an den Tagen 28, 29 und 30 induziert. Die Messung der Atemwegsreaktivität *in vivo* erfolgte am Tag 32, die

Analysen der weiteren Zielgrößen am Tag 33 (Abbildung 2). Die entsprechenden Tierzahlen pro Gruppe sind in Tabelle 2 gezeigt.

Zur Kontrolle der Immunisierung gegen DT erhielten die nur sensibilisierten PBS/OVA-Tiere, an den Tagen -21, -14 und -7 jeweils eine subkutane Placebo-Immunsierung mit PBS, bevor sie mit OVA sensibilisiert wurden. Die Negativkontrollen (PBS/PBS-Tiere) erhielten wiederum Placebo-Immunsierungen an den Tagen -21, -14 und -7 sowie Placebo-Sensibilisierungen mit PBS zwischen den Tagen 1 und 14. Da die PBS/OVA-Tiere grundsätzlich wie die gegen DT immunisierten Tiere (DT+OVA-Tiere) behandelt wurden, jedoch keine Immunisierung erhielten, wurde auch hier auf eine weitere Kontrollgruppe, die zwar immunisiert, jedoch nicht sensibilisiert wurde, verzichtet. Der Erfolg der Immunisierung gegen DT wurde in Relation zu den nicht-immunisierten PBS/OVA-Tieren gemessen. Die Tierzahlen pro Gruppe sind in Tabelle I dargestellt.

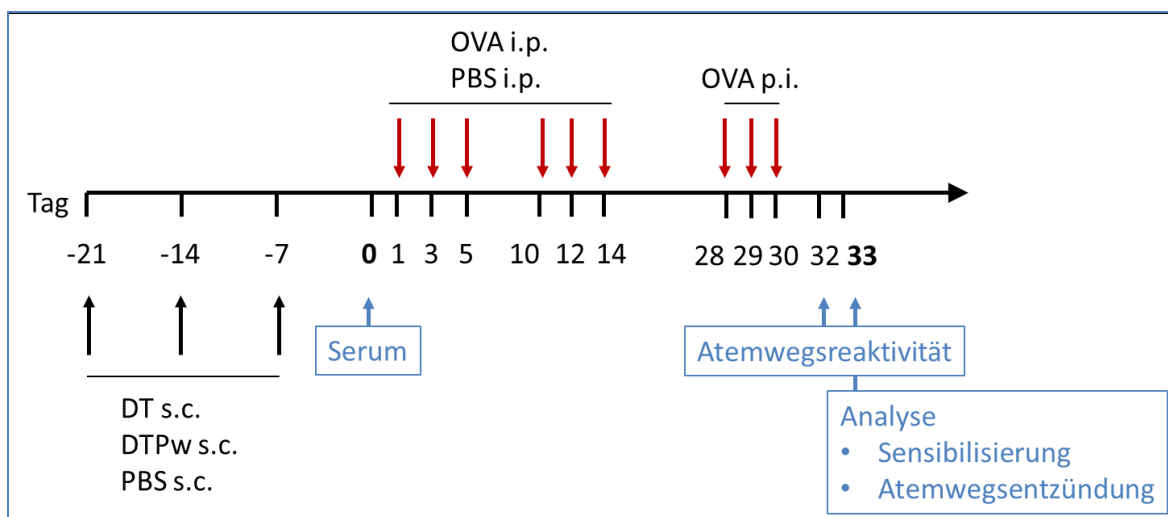


Abbildung 1: DT- oder DTPw-Immunsierung vor Beginn der allergischen Sensibilisierung (Behandlungsprotokoll I).

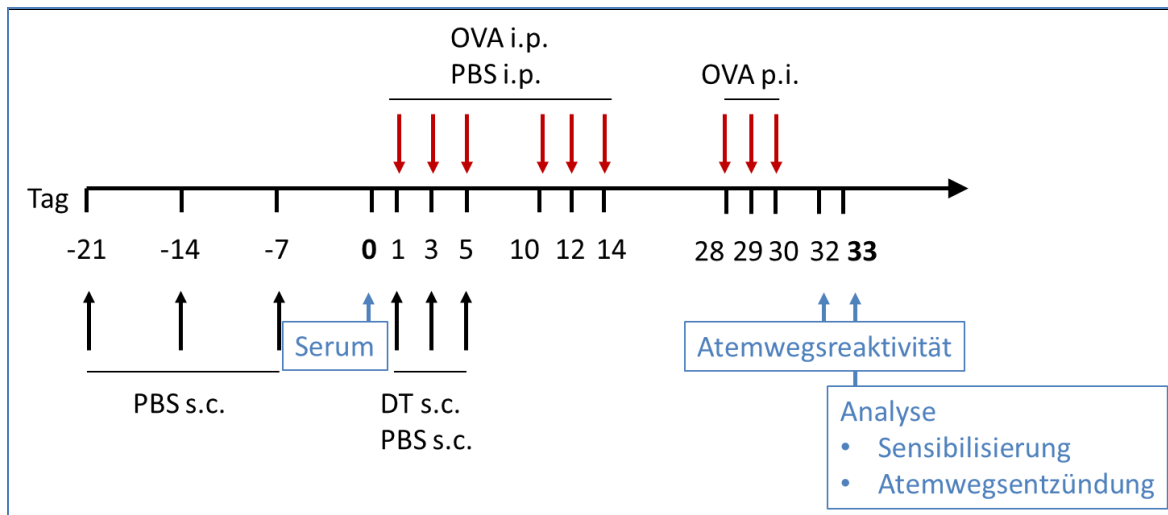


Abbildung 2: DT-Immunsierung während der OVA-Sensibilisierung (Behandlungsprotokoll II).

Tabelle I: Tierzahlen pro Gruppe mit gleicher Behandlung. Die Immunisierungsphase umfasst die Tage -21, -14 und -7, die Sensibilisierungsphase die Tage 1 bis 14 der Behandlungsprotokolle I und II. Angegeben sind die Gesamtanzahl der Tiere pro Gruppe aus insgesamt vier unabhängigen Versuchen.

Gruppenname	Immunisierung	Sensibilisierung	Anzahl
PBS/PBS (Negativkontrolle)	PBS	PBS	14
PBS/OVA (Positivkontrolle)	PBS	OVA	28
DT/OVA	DT	OVA	20
DT+OVA	PBS	DT+OVA	10
DTPw/OVA	DTPw	OVA	18

3.7 Nachweis der allergischen Sensibilisierung

3.7.1 Serumgewinnung

Material

Skalpelli (Surgical Blades No. 11)	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, J
1ml-Reaktionsgefäß	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, D
Pipetten, Pipettenspitzen	Becton Dickinson, Heidelberg, D

Durchführung

Die Blutabnahme erfolgte aus der Schwanzvene zu den Zeitpunkten vor Sensibilisierung (Tag 0) und nach Sensibilisierung (Tag 33). Nach Zentrifugation des Vollblutes (1200rpm, 10 min) erfolgte die Abnahme der Serumüberstände und die weitere Lagerung bis zur Analyse in 1ml-Reaktionsgefäßen bei -20°C.

3.7.2 Bestimmung der Immunglobuline aus dem Serum mittels ELISA

Prinzip

Allergenspezifische Immunglobuline (Igs) werden zur Quantifizierung der allergischen Sensibilisierung aus dem Serum bestimmt. Die Höhe der allergenspezifischen Serumtiter, nicht dagegen die Höhe der Gesamtimmunglobulin-Titer, korreliert mit dem Grad der Sensibilisierung. Bei der Maus werden die Subklassen IgE und IgG1 über die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13, die Subklasse IgG2a über das Th1-Zytokin IFN- γ reguliert.

Die Messung der Immunglobuline aus dem Serum erfolgte mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Hierbei wird eine Mikrotiterplatte mit einem primären Antikörper beschichtet, der spezifisch gegen das zu bestimmende Immunglobulin gerichtet ist. Anschließend werden das Serum sowie ein Standard, der das zu messende Immunglobulin in definierter Konzentration enthält, auf die Platte aufgetragen. Ein zweiter biotinierter (markierter) Antikörper gegen dasselbe Antigen bindet an das bereits an den primären Antikörper gebundene Immunglobulin und den Standard. Durch Zugabe eines farblosen Substrats (Streptavidinperoxidase), das an den Biotinanteil des sekundären Antikörpers

bindet, wird der Farbstoff 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in einer Redoxreaktion in ein Cyanin umgesetzt; als Oxidationsmittel fungiert Wasserstoffperoxid. Durch das entstandene Cyanin beobachtet man einen Farbumschlag von gelb nach blau. Nach einer definierten Zeit wird diese Reaktion mittels Senkung des pH-Wertes durch Schwefelsäure gestoppt, so dass wiederum ein Farbumschlag von blau nach gelb entsteht. Aus der photometrisch gemessenen Extinktion (Testfilter: 450 nm, Referenzfilter: 490 nm) wird mit Hilfe der Standardkurve die Konzentration des jeweiligen Immunglobulins berechnet.

Material

96-well Rundbodenplatten	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, D
Pipetten, Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
1 ml-Reaktionsgefäße	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, D
Schüttler	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Dynatech MR 7000-Photometer	Dynatech, Denkendorf, D
Bioplex Suspension Array System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA
Ovalbumin, Grad VI	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
Laborinternes Standardserum	Pool von Seren OVA-sensibilisierter BALB/c-Mäuse
Biotin-anti-Maus-IgE	PharMingen, Hamburg, D
Biotin-anti-Maus-IgG2a	PharMingen, Hamburg, D
Streptavidinperoxidase	Calbiochem, Bad Soden, D
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB100mM)	Fluka Chemie, Buchs, CH

Das Substrat TMB wurde gelöst in:

- Dimethylsulfoxid (DMSO, 50%) Merck, Darmstadt, D
- Ethanol (50%) Merck, Darmstadt, D

PBS, pH 7:

- Natriumchlorid (140mM) Merck, Darmstadt, D
- Dinatriumhydrogenphosphat(8.17mM) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumdihydrogenphosphat (2mM) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumchlorid (3mM) Merck, Darmstadt, D

Waschpuffer:

- PBS, pH 7
- Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D
- Tween 20, 0,1 %

Blockpuffer:

- PBS, pH 7
- Bovines Serumalbumin (BSA, 3% ig in PBS) Sigma Chemie, Deisenhofen, D

Verdünnungspuffer:

- PBS, pH 7; 3% BSA Calbiochem, Bad Soden, D

Gallatipuffer, pH 3.95:

- Zitronensäure-Monohydrat (200mM) Merck, Darmstadt, D

- Kaliumhydroxidlösung (4M) Merck, Darmstadt, D
- Schwefelsäure (2M) Merck, Darmstadt, D
- Wasserstoffperoxid Merck, Darmstadt, D

Durchführung

Zunächst wurden die 96-well-Mikrotiterplatten mit dem primären Antikörper gegen das jeweilige Gesamt-IgE und -IgG2a (2 µg/ml in PBS, pH7, 50 µl/well) oder direkt mit OVA (20 µg/ml, in PBS, pH7, 50 µl/well) für das OVA-spezifische IgE und IgG2a beschichtet. Nach einer Inkubationszeit über Nacht bei +4°C wurde der überschüssige Antikörper durch zweimaliges Waschen mit einem Waschpuffer entfernt. Eine Sättigung der unspezifischen Bindungen konnte durch den Blockpuffer (200 µl/well) erzielt werden. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Auftragung der Serumproben sowie des Standardserums, das das zu messende Immunglobulin in definierter Konzentration erhielt, in jeweils einem Volumen von 50µl/well als Doppelbestimmung. Als Negativkontrolle (Vierfachbestimmung) diente PBS. Die Seren der OVA-sensibilisierten Tiere wurden nach folgendem Schema mit PBS verdünnt:

Gesamt-IgE	1:100
Gesamt-IgG2a	1:10000
Anti-OVA-IgE	1:10, 1:100, 1:1000
Anti-OVA-IgG2a	1:10000, 1:100000

Die Seren der placebo-sensibilisierten Tiere wurden folgendermaßen verdünnt:

Gesamt-IgE	1:10
Gesamt-IgG2a	1:10000

Anti-OVA-IgE	1:2, 1:10, 1:1000
Anti-OVA-IgG2a	1:2, 1:5, 1:10, 1:10000, 1:100000

Es galten folgende Detektionsgrenzen für die Proben und laborinternen Standards:

Gesamt-IgE	10 ng
Gesamt-IgG2a	20 ng
Anti-OVA-IgE	7,5-35,9 ng (10 ng)
Anti-OVA-IgG2a	12,7-38,2 ng (20 ng)

Durch erneutes fünfmaliges Waschen wurde die ungebundene Probe eliminiert. Der jeweilige biotinierte Antikörper inkubierte in einer Verdünnung von 2,5µg/ml (50 µl/well) über 120 min. (Schüttler, Raumtemperatur (RT)). Der Waschvorgang wurde fünfmal wiederholt und die Streptavidinperoxidase (1:10000 verdünnt, 50 µl/well) auf die Platten aufgetragen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min. im Dunkeln bei RT erfolgten erneut acht Waschvorgänge. Anschließend wurde das Substrat TMB (1:100 in Gallatipuffer verdünnt, 150 µl/well) aufgetragen; die einsetzende Redoxreaktion wurde nach 15 bis 30 min. mit Schwefelsäure gestoppt. Um die Konzentration der zu messenden Substanz zu berechnen, wurde photometrisch die Extinktion (Testfilter: 450nm, Referenzfilter 490 nm) mit dem Bioplex Suspension Array System gemäß der jeweiligen Gebrauchsanweisung quantifiziert.

3.8 Nachweis der allergen-induzierten Atemwegsentzündung

3.8.1 Bronchoalveoläre Lavage

Prinzip

Die inhalative Allergenprovokation nach allergischer Sensibilisierung zieht eine allergische Entzündung der Atemwege nach sich. Die Infiltrate, in denen Lymphozyten und eosinophile Granulozyten dominieren, liegen insbesondere peribronchial und perivasal. Durch eine bronchoalveoläre Lavage lassen sich diese Zellen leicht gewinnen, so dass sich in der Lavageflüssigkeit durch mikroskopische Zelldifferenzierung nach Haematoxylin-Eosin-Färbung die Zusammensetzung des Infiltrates qualifizieren und das Ausmaß der Entzündung durch Zellzählung gut quantifizieren lässt. Zusätzlich kann das Zytokinmilieu der Atemwegsentzündung durch Messung der Zytokine direkt aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) mittels ELISA charakterisiert werden.

Material

PBS-Dulbecco (1x)	PAA Laboratories, Linz, A
Einbettmedium	Leica Instruments, Nussloch, D
Complete TM Mini	Boehringer, Mannheim, D
Zentrifuge, Laborfuge M	Kendro Laboratory Products, Berlin, D
Zytozentrifugen-Container	Kendro Laboratory Products, Berlin, D
Diff Quick	Dade Behring AG, Düdingen, CH
Filterkarton 26 x 45 mm	Schleicher&Schuell, Dassel, D
Objektträger 76 x 26 mm SUPER FROST	Menzel-Gläser, D

1ml-Spritzen (Omnifix®)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (0,4 x 20 mm), Injektionsnadeln	Terumo Europe N.V., Leuven, B
Mikrogefäße 1,5 ml	Heraeus, Hanau, D
Tissue Tek	Bayer Diagnostics, Hampshire, UK
Stickstoff, flüssig	Linde, Berlin, D
Proteinase-Inhibitor	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

Durchführung

Nach zervikaler Dislokation zur Tötung der Tiere wurde der Brustkorb der Mäuse eröffnet und die Trachea freipräpariert, mittels Kanüle sondiert und unterhalb des Schildknorpels mit einem Faden abgebunden. Mit 1ml kaltem PBS wurden die Lungen zweimalig durchspült. Durch Zusatz eines Proteinase-Inhibitors zur Spülflüssigkeit wurde der Zytokinabbau verhindert. Durch Zentrifugation beider Aliquots (2200 rpm, 10 min) wurde die BAL-Flüssigkeit von den BAL-Zellen getrennt. Die Flüssigkeit des ersten Aliquots wurde bei -20°C zur späteren Bestimmung des Zytokins IL-5 eingefroren. Die gepoolten BAL-Zellen beider Aliquots wurden in 500µl PBS resuspendiert, und 200µl für die nun folgenden Zytospins abgenommen. Zur Zelldifferenzierung erfolgte eine Zytozentrifugation (90rpm, 10 min, ohne Bremse, RT). Im Anschluss erfolgte die Färbung mittels Hämatoxilin-Eosin (Diff Quick) zur Auszählung von 200 Zellen nach morphologischen Kriterien. Die Person, die die Zellen ausgezählt hat, war hinsichtlich der Versuchsgruppen geblindet.

3.9 Ganzkörperplethysmographie zur Messung der Atemwegsreaktivität *in vivo*

Prinzip

Die barometrische Ganzkörperplethysmographie gilt als nicht-invasive Methode, um die Atemwegsreaktivität *in vivo* bei Mäusen nach Provokation der Atemwegsmuskulatur zum Beispiel mittels Methacholin zu messen (Hamelmann *et al.*, 1997). Das Prinzip besteht aus der Druckdifferenzmessung zwischen zwei Kammern, der Hauptkammer, in der sich die Maus befindet, und einer Referenzkammer mit konstantem Druck. Gemessen werden Druck- bzw. Volumenveränderungen, die durch die Thoraxbewegungen der Maus während eines Atemzyklus entstehen. Die Druckdifferenz zwischen Haupt- und Referenzkammer wird über einen sogenannten Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt und zu einem Transformator weitergeleitet. Von dort werden die Daten durch das Computerprogramm IOX weiter berechnet und gespeichert.

Mit zunehmender Bronchokonstriktion steigen der intrathorakale Druck während der Expirationsphase und damit der Druck in der Hauptkammer. Gleichzeitig verlängert sich die Expirationsphase, die Atemfrequenz ist dementsprechend vermindert. Diese Bronchialobstruktion führt zum erhöhten Atemwegswiderstand. Angegeben wird der Atemwegswiderstand mit Hilfe eines berechneten Wertes, der sogenannten „verlängerten Pause“ (enhanced pause, Penh). In diesen Wert gehen die Druckänderung der In- und Expiration und ein Zeitvergleich der frühen und späten Expiration (Pause) ein. Die Penh korreliert direkt mit dem Atemwegswiderstand (Resistenz, R_L). Als Atemwegsreaktivität wird die relative Zunahme des Penh-Wertes nach Provokation der Atemwege, hier mit

Methacholin ($Penh_{Mch}$), im Vergleich zu den Werten nach PBS-(Schein)-Provokation ($Penh_{PBS}$) gemessen.

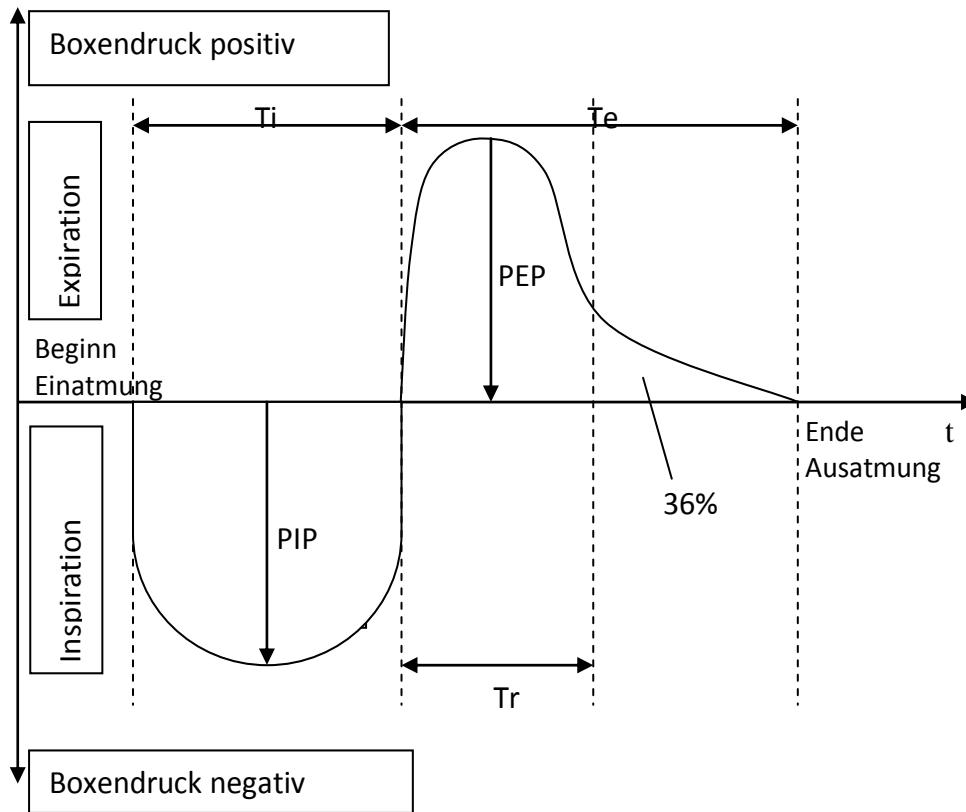


Abbildung 3: Darstellung der Messparameter der barometrischen Ganzkörperplethysmographie (Hamelmann et al., 1997).

Definitionen der während der Ganzkörperplethysmographie aufgezeichneten Parameter

Enhanced Pause

$$Penh = \text{Pause} \times PEP/PIP$$

Bei einer durch Methacholin hervorgerufenen Bronchokonstriktion ist die Änderung der Druckwerte während der Expiration höher als während der Inspiration.

Pause

$$\text{Pause} = T_e - T_r / T_r$$

	Zeitvergleich zwischen der frühen und der späten Expiration
Expirationszeit T_e	Zeit von dem Ende der Inspiration bis zum Start der Expiration in Sekunden
Relaxationszeit T_r	Die Relaxationszeit T_r ist definiert als die Zeit, die benötigt wird, bis der expiratorische Druck auf 36 % des höchst möglichen expiratorischen Druckes abgefallen ist.
Inspirationszeit T_i	Zeit vom Beginn der Inspiration bis zum Ende der Inspiration
PEP	(peak expiratory box pressure) höchster Expirationsdruck in ml/s, definiert als höchster positiver Boxendruck während eines Atemzugs
PIP	(peak inspiratory box pressure) höchster Inspirationsdruck in ml/s definiert als maximaler negativer Boxendruck während eines Atemzugs

Material

Ganzkörperplethysmograph

EMKA Technologies, Paris, F

Metacholin

Sigma, St. Louis, MO, USA

PBS-Dulbecco

PAA Laboratories, Linz, A

Ultraschallvernebler SYSTAM 2901

Le Ledat, Villeneuve, F

Software IOX 1.493d

Emka Technologies, Paris, Frankreich

Durchführung

Um die basalen Penh-Werte zu bestimmen, wurde jeweils eine Maus über drei Minuten in die Hauptkammer gesetzt und die Penh-Werte abgeleitet. Dann erfolgte die Provokation zunächst mit PBS, anschließend mit Methacholin in ansteigenden Konzentrationen (6,25mg/ml, 12,5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml) über ebenfalls jeweils drei Minuten. PBS und Methacholin wurden jeweils mit Hilfe eines Ultraschall-Verneblers aerosolisiert; das Aerosol wurde, unterstützt von einer Wasserpumpe, durch ein Schlauchsystem in die Hauptkammer geleitet. Die Aufzeichnung der Atemreaktion der Maus, die Messung und die Berechnung des Penh-Durchschnittswertes begann jeweils eine Minute nach Verneblung.

3.10 Isolierung und Aufbereitung mononukleärer Zellen aus der Milz

Prinzip

Als Repräsentant der systemischen Immunantwort nach Sensibilisierung mittels allergenspezifischer Stimulation wurde die Milz gewählt, da sie als sekundäres lymphatisches Organ sich nach intraperitonealer Applikation des Allergens mit diesem auseinandersetzt und die systemische Immunantwort zeigt.

Zur Isolierung der mononukleären Zellen der Milz erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei lassen sich mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten

und Monozyten, ihrer Dichte gemäß von den übrigen Zellen nach Homogenisierung der Milz und Eliminierung des Bindegewebes trennen.

Material

2-Propanol (70 % in aqua dest.)	Merck, Darmstadt, D
Präparationsbesteck	A. Dumont & Fils, Montignez, Sh
Kleine Siebe	Becton Dickinson, Le Point de Claix, F
Große Siebe	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
Medium (RPMI 1640)	PAA Laboratories, Linz, A
Kulturmedium:	
– Medium (RPMI 1640)	PAA Laboratories, Linz, A
– Fetales Kälberserum 10 %	Biochrom, Berlin, D
– Amphotericin B (Fungizone)	GIBCO, Eggstein, D
– Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
– L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, A
Konische Reagenzgläser (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Le Point de Claix, F
Petrischalen	Becton Dickinson, Le Point de Claix, F
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifuge Kendro	Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Coulter Counter	Coulter, Krefeld, D
Trennmedium Lympholite-M®	Cedarline Lab, Hornby, Canada

Durchführung

Nach Fixierung des getöteten Tieres auf dem Rücken und Desinfektion der Bauchhaut wurde die Peritonealhöhle eröffnet und die Milz weitestgehend steril entnommen.

Es erfolgte die Homogenisierung jeweils einer Milz einer Maus unter sterilen Bedingungen mittels eines feinmaschigen Siebes. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde mehrfach in 4ml Medium resuspendiert und vorsichtig über drei ml Trennmedium geschichtet. Zur Separation der mononukleären Zellen erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation (20 min, 1300 g, RT, ohne Bremse). Vorsichtig wurde der an der Interphasengrenze entstandene Zellring mit einer Pipette abgenommen und in einem weiteren Röhrchen zweimalig mit Medium gewaschen (800 g, 10 min, RT, mit Bremse). Das Zellpellet wurde in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zählung erfolgte nach einer 1:10 Verdünnung maschinell (Coulter Counter).

3.11 Analyse der adaptiven zellulären Immunantwort

3.11.1 Zellkulturbedingungen

Prinzip

In vivo induzierten antigenspezifischen T-Zellen lassen sich *in vitro* nach antigenspezifischer Restimulation mittels Proliferationsassay und Zytokinproduktion nachweisen. Im Folgenden werden die *in vitro* Bedingungen aufgeführt.

Materialien

96-well-Rundbodenplatten

Becton Dickinson, Le Point Claix, F

Kulturmedium (siehe "Material u. Methoden", 3.10)

Stimulation für die Zellkultur:

- Concavalin A Sigma Chemie, Deisenhofen, D
- Pertussis-Konzentrat Chiron Behring, Marburg, D
- Diphtherie- und Tetanus-Toxoid Behring, Marburg, D
- Ovalbumin, Grad VI Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

Durchführung

In 96-well-Rundbodenplatten wurden 2×10^5 (Proliferationsassay) bzw. 2×10^6 mononukleäre Milzzellen (Zytokinassay) in einem Endvolumen von 200 μ l aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ über 48 oder 96 Stunden, in Abhängigkeit von der nachfolgenden Untersuchung, mit folgenden Stimulanzen kultiviert: Als Negativkontrolle wurde Kulturmedium ohne Stimulans eingesetzt, die unspezifische Stimulation der Zellen erfolgte mit dem T-Zell-Mitogen Concanavalin A (ConA, 2,5 μ g/ml) als Positivkontrolle. Die antigenspezifische Stimulation nach Immunisierung erfolgte mit Pertussis ($0,01 \times 10^9$ Keime/ml), Diphtherie- oder Tetanustoxoid (jeweils 20 lf/ml); die allergenspezifische Stimulation nach *in vivo* Sensibilisierung mit OVA (Grad VI, 100 μ g/ml).

3.11.2 Antigen-/Allergenspezifische Proliferation mononukleärer Zellen

Prinzip

Anhand des ³[H]-Thymidin-Proliferationsassays kann die Immunisierung eines Organismus gegen bestimmte Antigene durch die klonale Expansion antigenspezifischer Lymphozyten nach ihrer Restimulation mit diesem Antigen nachgewiesen werden. Während der Zellteilung wird der β -Strahler ³[H]-Thymidin als Nukleosidanalogen in die DNA

proliferierender Zellen eingebaut. Nach Einbau wird die β -Strahlung der Zellen mit einem Szintillationsmessgerät gemessen. Der dokumentierte Stimulationsindex (SI) wird wie folgt berechnet:

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

Material

$^3\text{[H]}$ -Thymidin	Amersham Buchler, Braunschweig, D
Filterplättchen	Filter Dunn Labortechn., Asbach, D
Szintillationsröhrchen (5ml)	Packard Instruments, Groningen, D
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Instr., Fullerton, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellharvester	Titertek, Lier, N
Liquidszintillationsmessgerät (Wallac1409)	Wallac, Turku, F

Durchführung

Für den Proliferationsassay erfolgte die Stimulation der Zellen nach den unter 3.11.1 beschriebenen Bedingungen über 96 Stunden. Über die letzten 24h erfolgte die Inkubation mit $^3\text{[H]}$ -Thymidin (25 $\mu\text{l/well}$, 18,5 kBq/well, in PBS). Anschließend wurden die Zellen jeweils einer Vertiefung der Rundbodenplatte nach Absaugen des Zellkulturüberstandes durch Überführung auf ein Filterpapierplättchen mit dem Zellharvester geerntet. Ein Plättchen wurde mit 2ml Szintillationsflüssigkeit in je einem Szintillationsröhrchen aufgelöst und die Radioaktivität darin mit einem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät bestimmt.

3.11.3 Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz

Prinzip

Die antigenspezifische Immunantwort des zellulären Immunsystems lässt sich durch T-zelluläre Zytokine charakterisieren. Schlüsselzytokine der Th1-Immunantwort sind IL-2 und INF- γ , die der Th2-Immunantwort sind IL-4, -5 und -10. Die Quantifizierung dieser Zytokine erfolgte nach allergen- und antigenspezifischer Restimulation mononukleärer Zellen *in vitro* mittels ELISA aus dem Zellkulturüberstand.

Material

96-well-Rundbodenplatten	Becton Dickinson, Le Point Claix, F
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
1ml-Reaktionsgefäße	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, D
Schüttler (IKA -Schüttler MTS 4)	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Dynatech MR 7000-Photometer	Dynatech, Denkendorf, D
Natriumbicarbonat (0,1 M, pH 8.2)	Serva, Heidelberg, D
Streptavidinperoxidase	Calbiochem, Bad Soden, D
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB100mM)	Fluka Chemie, Buchs, CH
Das Substrat TMB wurde gelöst in:	
– Dimethylsulfoxid (DMSO, 50%)	Merck, Darmstadt, D
– Ethanol (50%)	Merck, Darmstadt, D
PBS, pH 7:	
– Natriumchlorid (140mM)	Merck, Darmstadt, D

- Dinatriumphosphat(8.17mM) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumdihydrogenphosphat (2mM) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumchlorid (3mM) Merck, Darmstadt, D

Waschpuffer:

- PBS, pH 7
- Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, D
- Tween 20, 0,1 %

Blockpuffer:

- PBS, pH 7
- Bovines Serumalbumin (BSA, 3%ig in PBS) Sigma Chemie, Deisenhofen, D

Verdünnungspuffer:

- PBS, pH 7; 3% BSA Calbiochem, Bad Soden, D

Gallatipuffer, pH 3.95:

- Zitronensäure-Monohydrat (200mM) Merck, Darmstadt, D
- Kaliumhydroxidlösung (4M) Merck, Darmstadt, D
- Wasserstoffperoxid Merck, Darmstadt, D
- Schwefelsäure (2M) Merck, Darmstadt, D

IL-4:

Gereinigter Ratten-anti-Maus-IL-4 mAk Pharmingen, Hamburg, D

Rekombinantes Maus-IL-4 Pharmingen, Hamburg, D

Interne Laborkontrolle

Biotinierter Ratten-anti-Maus-IL-4 mAk Pharmingen, Hamburg, D

IL-5:

Gereinigter Ratten-anti-Maus-IL-5 mAk Pharmingen, Hamburg, D

Rekombinantes Maus-IL-5 Pharmingen, Hamburg, D

Interne Laborkontrolle

Biotinierter Ratten-anti-Maus-IL-5 mAk Pharmingen, Hamburg, D

IL-10:

OptEIA Set Pharmingen, San Diego, CA, USA

IFN- γ :

Gereinigter Ratten-anti-Maus-IFN- γ mAk R&D Systems, Minneapolis, USA

Rekombinantes Maus-IFN- γ R&D Systems, Minneapolis, USA

Interne Laborkontrolle

Biotinylierter Ratten-anti-Maus IFN- γ mAk R&D Systems, Minneapolis, USA

Durchführung

Nach Kultivierung der Milzzellen, wie unter 3.11.1 aufgeführt, wurden die Zellkulturüberstände nach 48 (IFN- γ) und 96 Stunden (IL-4, -5, -10) abgenommen, in ein 1ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Messung der Zytokine gelagert.

Nach Beschichtung einer 96-well-Rundbodenplatte mit dem jeweiligen primären Antikörper (50 μ l/well) erfolgte bei +4 °C über Nacht die Inkubation. Um die überschüssigen Antikörper zu eliminieren, wurde mit Waschpuffer dreimalig gewaschen und unspezifische Bindungen mittels Blockpuffer gesättigt (150 μ l/well, 120 min., Schüttler, RT). Wiederum nach

zweimaligen Waschen wurden die zu messenden Proben, definierten Standards, eine Negativkontrolle, Kulturmedium (50 µl/well, Dreifachbestimmung), und eine Positivkontrolle (laborintern generiert) aufgetragen (50 µl/well). Die Inkubation erfolgte wiederum bei +4 °C über Nacht. Durch erneutes viermaliges Waschen wurden die nicht gebundenen Probenanteile entfernt; anschließend wurde der sekundäre biotinierte Antikörper auf die Platte aufgetragen (50 µl/well, 60 min., RT, Schüttler). Nach achtmaligem Waschen auf die Platten wurde das Enzym Streptavidinperoxidase in einer 1:10.000-Verdünnung (50 µl/well, 30min., RT, im Dunkeln) auf die Platten gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min., erneut achtmaliges Waschen der Platten und das Auftragen des Substrats TMB (1:100 in Galatti-Puffer, 150 µl/well, RT, im Dunkeln) auf die Platte. Nach ca. 15-30 Minuten wurde die einsetzende Redoxreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure terminiert (50 µl/well).

IL-10 wurde mit Hilfe des OptEIA-Sets der Firma Pharmingen (PharMingen, San Diego, CA, USA) gemessen. Die Durchführung dieser ELISA-Tests erfolgte nach den Arbeitsanweisungen der Gebrauchsanleitung.

Es galten folgende Verdünnungen der Proben für die zu bestimmenden Zytokine:

IL-4 und IL-5	keine Verdünnung
IL-10	ConA und OVA 1:10
INF- γ	keine Verdünnung

Es galten folgende Detektionsgrenzen für die Proben und laborinternen Standards:

IL-4 und IL-5	16 pg/ml
IL-10	78 pg/ml

3.11.4 Durchflusszytometrie zur Differenzierung der T-Zellen aus der Milz

Prinzip

Eine Quantifizierung der Zelltypen über Erkennung ihrer Oberflächenantigene ist mit Hilfe des Fluorescence activated cell sorting (FACS) möglich. Die Zellen werden dabei mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, die an entsprechende Oberflächenantigene der Zellen binden. In einem Flüssigkeitsstrom werden die markierten Zellen einzeln durch zwei aufeinander folgende Laserstrahlen (Argon, $\lambda_1=488$ nm, $\lambda_2=635$ nm) geführt. Bestimmte Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranbeschaffenheit und intrazelluläre Granularität, bewirken eine Lichtstreuung. Die Sammlung und photometrische Messung der Lichtstreuung erfolgt durch je eine Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und eine rechtwinklig dazu platzierte (Seitwärtsstreulicht).

Im Wesentlichen bestimmen die Zellgröße das Vorwärtsstreulicht und die intrazelluläre Granularität das Seitwärtsstreulicht. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand morphologischer Kriterien ausgewählt und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der an den Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff wird von dem Laserstrahl zur Emission von Lichtquanten angeregt, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei der Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Ausgewertet wird nach dem Prozentsatz der für ein bestimmtes Oberflächenantigen positiven Zellen (% positiv) sowie nach der mittleren Intensität der gemessenen Fluoreszenz

Isotype Control anti-rat-IgG2a, κ; PE konjugiert	Pharmingen, Hamburg, D
anti-Maus-CD62L FITC konjugiert	R.A. Kroccek, RKI, Berlin , D
anti-Maus-CD25 FITC konjugiert	R.A. Kroccek, RKI, Berlin , D

Durchführung

Für die FACS-Analyse wurden die Milzzellen homogenisiert und die Erythrozyten der Milzzellsuspension mit einem Lysepuffer lysiert (10 ml, 15min, RT, Rotator). Es erfolgte eine Zentrifugation (550 g, 10 min, RT, mit Bremse), anschließend die Abnahme der Zellüberstände und das Auftragen der Zellen auf eine 96-well-Mikrotiterplatte in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 100 µl PBS-azid. Eine erneute Zentrifugation (550 g, 4 °C, 5 min, mit Bremse), die Abnahme des Zellüberstandes und die Blockade der Fc-Rezeptoren mit einem Blockpuffer (50 µl/ 2×10^5 Zellen, 10 min, Zentrifugation mit 550 g, 4 °C, 5 min, mit Bremse) schlossen sich an.

Die Oberflächenantigene wurden markiert, indem jeweils 2×10^5 Zellen in PBS-azid aufgenommen und auf Eis unter Lichtschutz für 20 min. 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 (jeweils 4 µl) inkubiert wurden.

Eine Färbung mit dem entsprechenden Isoantikörper erfolgte als Kontrolle für die spezifischen monoklonalen Antikörper. Nach einem erneuten zweimaligen Waschvorgang mit PBS-azid (150 bzw. 200 µl/well, Zentrifugation mit 550 g, 4 °C, 5 min, mit Bremse), Abnahme der Zellüberstände und Resuspendierung der Zellen in 200 µl PBS-azid, wurden die toten Zellen mit Propidium-Jodid (1 µg/ml) markiert. Nun konnte die

Oberflächenantigendifferenzierung der Zellen mittels Durchflusszytometer durchgeführt werden. Für die Datenaufnahme und Weiterverarbeitung wurde das „CellQuest“-Programm verwandt.

3.12 Statistische Auswertung

Aus vier unabhängigen Versuchen wurden die Daten der Mäuse in einer Behandlungsgruppe zusammengefasst (siehe Tabelle I). Die Tiergruppen bestanden jeweils aus zwei bis 5 Tieren. Die Resultate repräsentieren die Mittelwerte plus/ minus dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes (Standard-Error of the Mean, SEM). Die unabhängigen Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf Unterschiede verglichen; das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt (zweiseitig). Für die statistische Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics, Version 12 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, D) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Zelluläre Immunantwort nach DT- und DTPw-Immunisierung

Eine erfolgreiche antigenspezifische Immunantwort nach Kombinationsimmunisierungen mit DT oder DTPw nach entsprechenden Applikationen an den Tagen -21, -14 und -7 des Behandlungsprotokolls I (Abbildungen 1) oder mit DT an den Tagen 1, 3 und 5 des Behandlungsprotokolls II (Abbildungen 2) wurde mit Hilfe des ³[H]-Thymidin-Proliferationsassays und der Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz *in vitro* untersucht (Tabellen II und III).

4.1.1 Antigen-spezifische Proliferation mononukleärer Zellen der Milz *in vitro*

Nach unspezifischer Stimulation mit dem T-Zell-Mitogen ConA als Positivkontrolle war die Proliferation mononukleärer Zellen der Milz in allen Gruppen erhöht, Signifikanzunterschiede ergaben sich nicht (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren, zeigte sich in gegen D und T immunisierten Tieren eine verstärkte Proliferation der Milzzellen nach Stimulation mit D und T; bei zusätzlicher Immunisierung mit Pw war auch diese Proliferation im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren verstärkt (Tabelle II).

Tabelle II: Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die antigen- und allergenspezifische Immunantwort.

Mononukleäre Milzzellen von DT oder DTPw-immunisierten Tieren wurden mit D, T oder Pw kultiviert. Die Proliferationsantwort nach antigen-spezifischer Stimulation ist als Stimulationsindex in Relation zur Stimulation ohne Antigen angegeben (*p ≤ 0,05 versus PBS/PBS, †p ≤ 0,05 versus PBS/OVA).

<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i>			
Immunsierung	Sensibilisierung	n	Diphtherie	Tetanus	Pertussis	OVA
PBS	PBS	6	5,3 ± 1,6	2,8 ± 0,8	1,1 ± 0,6	1,3 ± 0,4
PBS	OVA	12	15,6 ± 3,9	3,5 ± 0,5	1,8 ± 0,5	3,2 ± 0,8*
DT	OVA	19	40,2 ± 9,5†	22,9 ± 8,2†	5,3 ± 1,7	2,8 ± 0,4*
PBS	DT+OVA	10	40,2 ± 6,7†	11,6 ± 1,9†	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,2*
DTPw	OVA	8	42,2 ± 9,2†	16,3 ± 3,5†	22,4 ± 5,3†	2,3 ± 0,3*

4.1.2 Antigen-spezifische Zytokinproduktion *in vitro*

Die *in vitro* Produktion der hier untersuchten Zytokine IL-5, IL-10 und IFN- γ der mononukleären Milzzellen der DT- bzw. DTPw-immunisierten Mäuse, stimuliert mit dem entsprechenden Antigen, war insgesamt signifikant höher als in placebo-immunisierten placebo-sensibilisierten (PBS/PBS) oder OVA-sensibilisierten Tieren (PBS/OVA, Tabelle III). Die *in vitro* Stimulation mit Pw zeigte lediglich eine leichte unspezifische Zytokinproduktion in den DT-immunisierten Tieren; die Produktion aller Zytokine war jedoch deutlich höher in der Gruppe der DTPw-immunisierten Tiere im Vergleich zu nicht mit Pw immunisierten Tieren (Tabelle III).

Die DTPw-Immunsierung bewirkte eine deutlich geringere Produktion des Th2-Zytokins IL-5 und des regulatorischen Zytokins IL-10 der mononukleären Milzzellen nach Stimulation mit D (Daten nicht gezeigt) oder T (Tabelle III). Weiter zeigte sich ebenfalls in der Gruppe der

DTPw-immunisierten Tiere eine signifikant gesteigerte Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ der mononukleären Milzzellen als Antwort auf D (Daten nicht gezeigt), T oder insbesondere Pw, verglichen mit den nur DT-immunisierten Tieren (Tabelle III).

Gemäß der Daten zur antigenspezifischen Proliferation und zur antigenspezifischen Zytokinproduktion mononukleärer Zellen *in vitro* war von einer erfolgreichen Immunisierung der DT- oder DTPw-immunisierten Tiere gegen DT oder DTPw auszugehen.

Tabelle III: Einfluss der DT- und DTPw-Immunisierung auf die antigenspezifische Zytokinproduktion der mononukleären Milzzellen *in vitro*. Die BALB/c-Mäuse wurden subkutan mit DT vor oder während OVA-Sensibilisierung oder mit DTPw vor OVA-Sensibilisierung immunisiert. Die *in vitro* Zytokinproduktion der mononukleären Milzzellen, jeweils kultiviert mit T oder Pw, wurde mittels ELISA gemessen ($\dagger p \leq 0,05$ versus PBS/OVA).

Immunisierung	Sensibilisierung	n	T <i>in vitro</i>			Pw <i>in vitro</i>		
			IL-5	IL-10	IFN- γ	IL-5	IL-10	IFN- γ
[pg/ml]								
PBS	PBS	11	32 \pm 0	38 \pm 4	78 \pm 0	32 \pm 0	56 \pm 18	78 \pm 0
PBS	OVA	18	33 \pm 2	32 \pm 0	78 \pm 0	36 \pm 4	47 \pm 9	79 \pm 1
DT	OVA	6	1275 \pm 294 \dagger	1017 \pm 249 \dagger	120 \pm 33 \dagger	37 \pm 6	266 \pm 51 \dagger	97 \pm 19
PBS	DT+OVA	8	1929 \pm 431 \dagger	1398 \pm 334 \dagger	163 \pm 44 \dagger	167 \pm 45 \dagger	190 \pm 28 \dagger	170 \pm 59
DTPw	OVA	10	231 \pm 78 \dagger	165 \pm 44 \dagger	623 \pm 246 \dagger	444 \pm 158 \dagger	796 \pm 272 \dagger	4505 \pm 1942 \dagger

4.2 Einfluss der DT- und DTPw-Immunisierung auf die allergen-vermittelte Sensibilisierung, Atemwegsentzündung und Atemwegsreaktivität

Der Effekt der Immunisierung mit DT oder mit DTPw vor und mit DT während der Sensibilisierung mit OVA auf die allergen-vermittelte Sensibilisierung wurde am Tag 0 und am Tag 33, der entsprechende Effekt auf die Atemwegsentzündung und auf die

Atemwegsreaktivität am Tag 33 der Behandlungsprotokolle I und II (Abbildungen 1 und 2) untersucht.

4.2.1 Allergenspezifische Sensibilisierung nach DT- oder DTPw-Immunsisierung

Die DT- und DTPw-Immunsisierung führten am Tag 0 direkt nach Immunsisierung an den Tagen -21, -14 und -7 zu einer signifikant erhöhten Gesamt-IgE Produktion, wohingegen sich die Gesamt-IgG2a Titer nur nach der DTPw-Immunsisierung deutlich erhöht zeigten, verglichen mit den placebo-immunisierten Mäusen (Abbildung 4). Das Gesamt-IgE war in der Gruppe der DT- und DTPw-immunisierten Tiere trotz der nachfolgenden Sensibilisierung am Tag 33 geringer als am Tag 0, während das Gesamt-IgG2a am Tag 33 nach DTPw-Immunsisierung deutlich höher lag als am Tag 0.

Am Tag 33 bewirkte die systemische OVA-Sensibilisierung eine signifikant erhöhte Produktion des Gesamt- und OVA-spezifischen IgE, OVA-spezifischen IgG2a, jedoch nicht des Gesamt-IgG2a im Vergleich zur Placebo-Sensibilisierung (Abbildung 4). Zu diesem Zeitpunkt waren die Titer des Gesamt-IgE in der Gruppe der DT- und DTPw-immunisierten Tiere höher als in der Gruppe der placebo-immunisierten, aber OVA-sensibilisierten Tiere. Das Gesamt-IgG2a war deutlich erhöht in der Gruppe der DTPw-immunisierten OVA-sensibilisierten Tiere im Vergleich zur Gruppe der placebo-immunisierten, aber OVA-sensibilisierten Tiere.

Die DT- oder DTPw-Immunsisierung vor oder DT-Immunsisierung während der Sensibilisierung hemmten signifikant die Produktion des OVA-spezifischen IgEs. Im Vergleich zu den placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tieren waren die OVA-spezifischen IgG2a Titer in der Gruppe der DTPw-immunisierten, OVA-sensibilisierten Mäuse signifikant erhöht (Abbildung 4).

Die DT-Immunsierung vor und während der OVA-Sensibilisierung führte also zu einer Verminderung der OVA-spezifischen IgE-Produktion; die DTPw-Immunsierung vor OVA-Sensibilisierung führte zu einer Verminderung der OVA-spezifischen IgE-Produktion und zu einer zusätzlichen Induktion der IFN- γ vermittelten Produktion des OVA-spezifischen IgG2as (Abbildung 4).

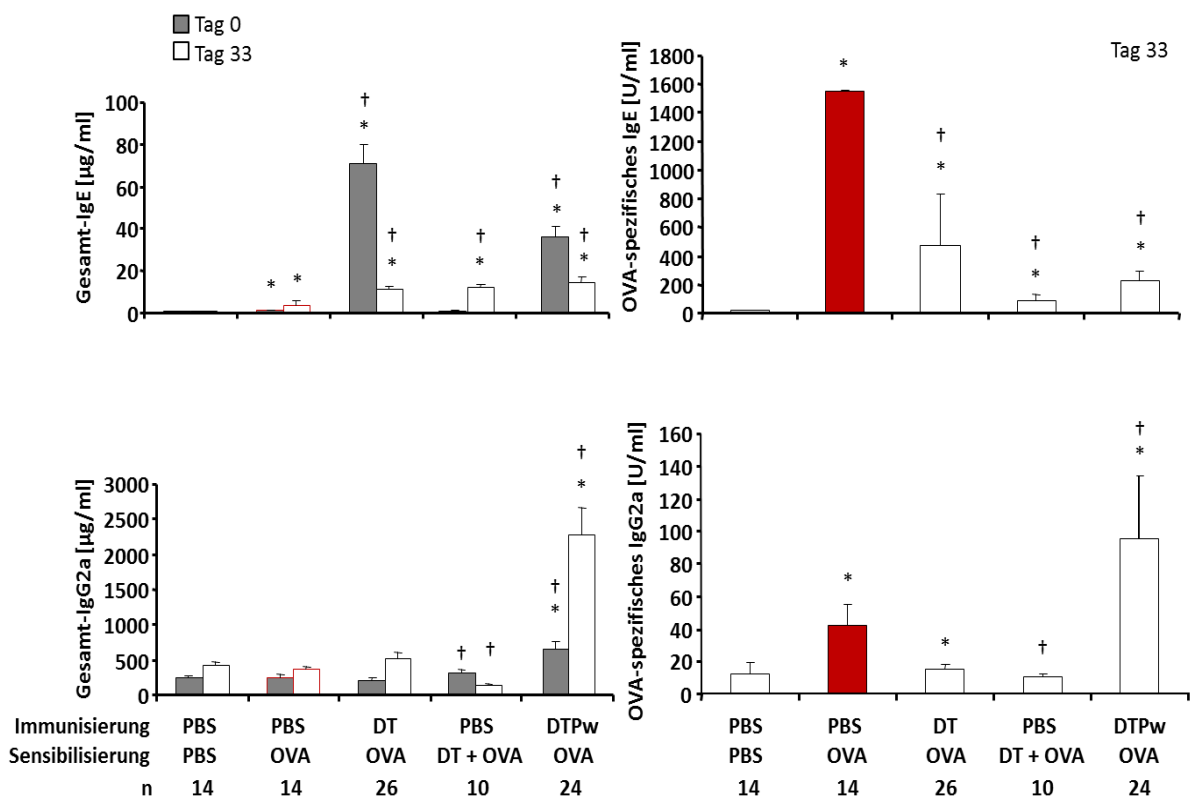


Abbildung 4: Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die Gesamt- und allergenspezifische Immunglobulinproduktion. Die Serumtitere der OVA-spezifischen und Gesamt-Immunglobuline wurden nach subkutaner Immunsierung der Mäuse mit DT vor oder während OVA-Sensibilisierung oder mit DTPw vor OVA-Sensibilisierung mittels ELISA gemessen (*p ≤ 0,05 versus PBS/PBS, †p ≤ 0,05 versus PBS/OVA).

4.2.2 Allergen-bedingte Atemwegsentzündung nach DT- und DTPw-Immunsierung

Die BAL-Flüssigkeit der placebo-exponierten, placebo-sensibilisierten Tiere enthielt nur wenige Zellen, in der Differenzierung vorwiegend aus Monozyten bestehend (Abbildung 5). Die OVA Sensibilisierung bewirkte eine allergeninduzierte Atemwegsentzündung, gekennzeichnet durch einen Zellinflux in die Atemwege, überwiegend aus Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten bestehend (Abbildung 5). Die vor oder während der OVA Sensibilisierung mit DT immunisierten Tiere entwickelten eine deutlich verminderte allergeninduzierte eosinophile Atemwegsinfammation, verglichen mit der Gruppe der placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tiere (Abbildung 5). Die DTPw-immunisierten und OVA-sensibilisierten Tiere zeigten im Vergleich zu den placebo-immunisierten und OVA-sensibilisierten Tieren eine signifikant verminderte Infiltration von eosinophilen Granulozyten, aber eine nicht signifikant unterschiedliche Infiltration von Lymphozyten in die Atemwege.

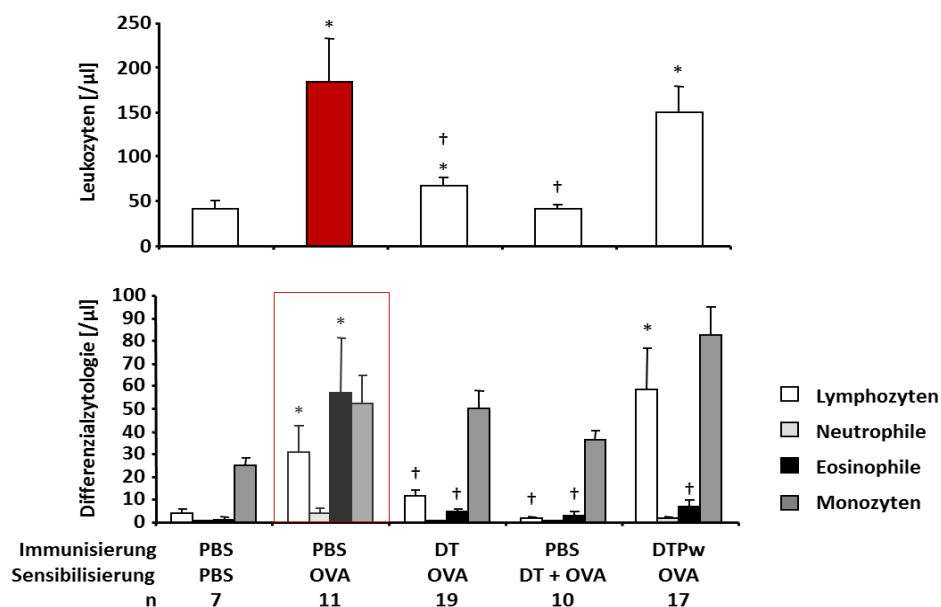


Abbildung 5: Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die allergeninduzierte eosinophile Atemwegsentzündung. Die von Mäusen gewonnenen Zellen der BAL-Flüssigkeit, subkutan immunisiert mit DT vor oder während OVA-Sensibilisierung oder mit DTPw vor OVA-Sensibilisierung, wurden lichtmikroskopisch nach morphologischen Kriterien differenziert und hinsichtlich einer allergen-induzierten eosinophilen Atemwegsentzündung untersucht (* $p \leq 0,05$ versus PBS/PBS, † $p \leq 0,05$ versus PBS/OVA).

In der BAL-Flüssigkeit der placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tiere zeigte sich eine größere Menge des Th2-Zytokins IL-5 als in der placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Tiergruppe (Abbildung 6). In der Gruppe der DT- oder DTPw-immunisierten und nachfolgend OVA-sensibilisierten Mäuse sowie in der Gruppe der DT-immunisierten und gleichzeitig OVA-sensibilisierten Tiere zeigte sich eine im Vergleich zu den placebo-immunisierten und OVA-sensibilisierten Tieren leichte Verminderung der lokalen IL-5 Produktion, die IL-5 Produktion war in diesen Gruppen so hoch wie bei den placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Tieren. Signifikante Unterschiede ergaben sich insgesamt keine (Abbildung 6).

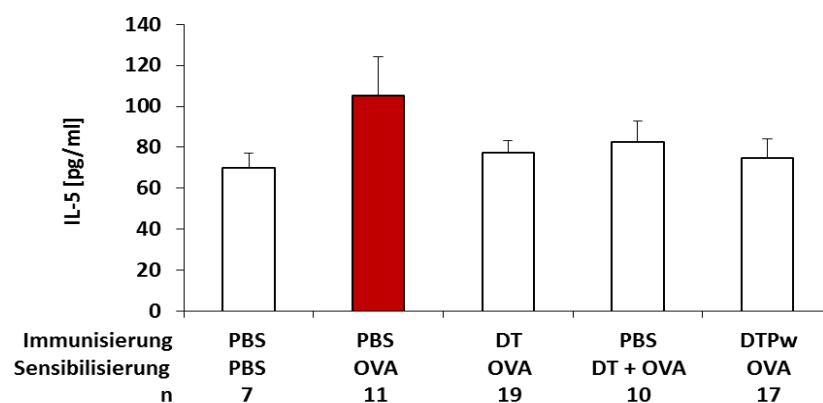


Abbildung 6: Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die lokale IL-5-Produktion. Die lokale IL-5-Produktion wurde nach Immunisierung mit DT oder DTPw und nachfolgender Allergensensibilisierung oder

nach DT-Immunsierung und gleichzeitiger Allergensensibilisierung und wiederholten Allergenprovokationen über die Atemwege in der BAL-Flüssigkeit mittels ELISA quantifiziert.

Die Ergebnisse der BAL-Untersuchungen zeigten insgesamt, dass die DT-Immunsierung vor oder während der Sensibilisierung mit OVA sowie die DTPw-Immunsierung vor OVA-Sensibilisierung zu einer verminderten eosinophilen Infiltration in die Atemwege als Maß für die allergen-vermittelte Atemwegsentzündung führten.

4.2.3 Atemwegsreaktivität *in vivo* nach DT- und DTPw-Immunsierung

Die Placebo-Immunsierung und OVA-Sensibilisierung bewirkte eine erhöhte *in vivo* Atemwegsreaktivität als Antwort auf eine unspezifische Atemwegsprovokation mittels Metacholin, gezeigt anhand eines im Vergleich zu den placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Tieren signifikant erhöhten Penh-Wertes (Abbildung 7). Nach DT-Immunsierung während oder nach OVA-Sensibilisierung war die AR gleichermaßen wie in der Gruppe der placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tiere im Vergleich zu den placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Mäusen erhöht (Abbildung 7). Die DTPw-Immunsierung vor OVA-Sensibilisierung verhinderte jedoch fast vollständig die Entwicklung einer erhöhten Atemwegsreaktivität *in vivo*, gemessen anhand eines deutlich verminderten Penh-Wertes im Vergleich zur placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Gruppe und einem ähnlichen Penh-Wert im Vergleich zur placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Gruppe.

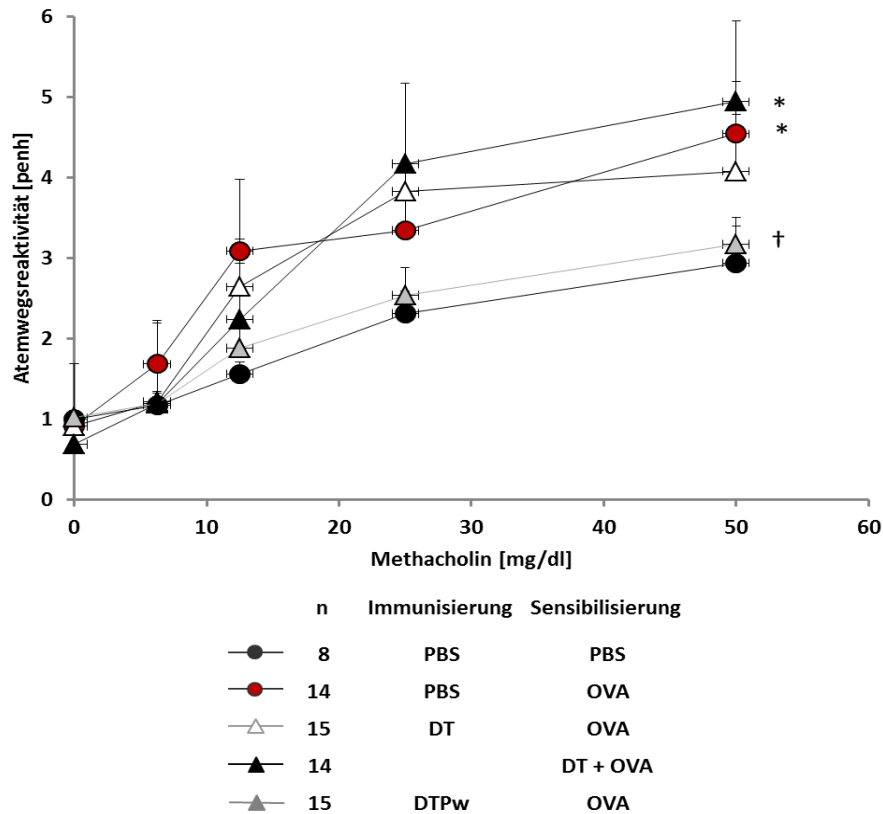


Abbildung 7: Einfluss der DT- bzw. DTPw-Immunsierung auf die Atemwegsreaktivität *in vivo*. Die Mäuse wurden subkutan mit DT vor oder während OVA-Sensibilisierung bzw. mit DTPw vor OVA-Sensibilisierung immunisiert. Die *in vivo* AR wurde nach Provokation mit ansteigenden Konzentrationen des aerosolisierten Methacholins mittels Ganzkörperplethysmographie gemessen. Die dargestellten Penh-Werte korrelieren mit dem Atemwegswiderstand als Maß für die Atemwegsreaktivität (* $p \leq 0,05$ versus PBS/PBS, † $p \leq 0,05$ versus PBS/OVA).

4.3 Einfluss der DT- oder DTPw-Immunsierung auf die T-zelluläre Immunantwort nach allergischer Sensibilisierung

4.3.1 T-Zell-Differenzierung

Als Marker naiver T-Zellen, notwendig für die Lymphozytenzirkulation zwischen peripheren Lymphknoten und entzündetem Gewebe, gilt CD62L (L-Selectin) (Gerberick *et al*, 1997). Das

Oberflächenmolekül CD25 findet sich auf natürlichen und adaptiven regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (Fontenot et al., 2003). Beide Oberflächenmoleküle wurden auf CD4⁺ T-Zellen der Milz am Tag 33 analysiert.

Verglichen mit den placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tieren ergab sich keine signifikante Zunahme der regulatorischen T-Zellen nach der der Sensibilisierung vorausgegangenen oder gleichzeitigen DT-Immunsierung oder nach der der Sensibilisierung vorausgegangenen DTPw-Immunsierung (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Zytokinproduktion mononukleärer Zellen der Milz *in vitro*

In den placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tieren war die Produktion der Th2 Zytokine IL-4, -5 und -10 durch mononukleäre Milzzellen als Immunantwort auf die *in vitro* Stimulation mit OVA oder ConA als T-Zell-Mitogen signifikant erhöht, verglichen mit den placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Tieren (Tabelle IV). Die DT-Immunsierung vor oder während OVA-Sensibilisierung und insbesondere die DTPw-Immunsierung vor OVA Sensibilisierung unterdrückten signifikant die *in vitro* Produktion dieser Th2-Zytokine durch mononukleäre Zellen der Milz nach *in vitro* Stimulation mit OVA oder ConA im Vergleich zur Placebo-Immunsierung und anschließenden OVA-Sensibilisierung (Tabelle IV).

Die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ durch mononukleäre Zellen der Milz nach *in vitro* Stimulation mit OVA oder ConA war in der Gruppe der placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tiere im Vergleich zur Gruppe der placebo-immunisierten, placebo-sensibilisierten Tiere nicht signifikant verändert. Die DT- oder DTPw-Immunsierung vor Sensibilisierung führte dagegen zu einer im Vergleich zu den placebo-immunisierten,

placebo-sensibilisierten Tieren und den placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tieren signifikant erhöhten allergenspezifischen und –unspezifischen *in vitro* Produktion von IFN- γ (Tabelle IV).

Tabelle IV: Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die allergen-induzierte und unspezifische Zytokinproduktion der mononukleären Milzzellen *in vitro*. Mäuse wurden subkutan mit DT vor oder während OVA-Sensibilisierung oder mit DTPw vor OVA-Sensibilisierung immunisiert. Die *in vitro* Zytokinproduktion von mononukleären Milzzellen, allergenspezifisch kultiviert mit OVA oder -unspezifisch mit dem T-Zell-Mitogen ConA, wurde mittels ELISA ermittelt (* $p \leq 0,05$ versus PBS/PBS, † $p \leq 0,05$ versus PBS/OVA).

Immunsierung	Sensibilisierung	n	OVA <i>in vitro</i>				ConA <i>in vitro</i>	
			IL-4	IL-5	IL-10	IFN- γ	IL-5	IFN- γ
			[pg/ml]				[pg/ml]	[ng/ml]
PBS	PBS	8	25 \pm 3	39 \pm 5	37 \pm 11	89 \pm 24	270 \pm 45	7.9 \pm 3.4
PBS	OVA	11	137 \pm 37*	4075 \pm 1075*	1128 \pm 256*	78 \pm 0	664 \pm 117*	5.6 \pm 1.8
DT	OVA	6	73 \pm 14*	818 \pm 179*†	469 \pm 150*†	326 \pm 131†	325 \pm 37†	14.7 \pm 2.6†
PBS	DT+OVA	8	32 \pm 1†	590 \pm 230*†	362 \pm 125*†	78 \pm 0	534 \pm 62*†	33.8 \pm 7.7*†
DTPw	OVA	15	50 \pm 4*†	311 \pm 62*†	107 \pm 30†	149 \pm 33†	474 \pm 59*†	36.6 \pm 12.0*†

Diesen Ergebnissen entsprechend, ergab sich für die T-zelluläre Immunantwort, dass die DT-, vor allem aber die DTPw-Immunsierung vor Sensibilisierung einen generellen Wechsel von dem vorherrschenden Th2-Zytokinmuster, ausgelöst durch die OVA-Sensibilisierung, zu einer vorherrschenden Th1-Immunantwort in immunisierten und sensibilisierten Tieren bewirkte. CD25⁺ regulatorische T-Zellen ließen sich nicht vermehrt nachweisen.

5 Diskussion

Erkrankungen des atopischen Formenkreises stellen für die westlichen Industrienationen ein erhebliches Gesundheitsproblem dar. Die Entwicklung präventiver Ansätze zur Verhinderung der Krankheitsentstehung ist daher notwendig und von großer Bedeutung.

Impfungen mit Toxoiden wie gegen Diphtherie und Tetanus können mit der Produktion impfstoffspezifischer IgE-Antikörper einhergehen. Diese physiologische, toxoidspezifische IgE-Produktion ist bei Kindern mit einer allergischen Prädisposition erhöht (*Dannemann et al., 1996, Grüber et al., 2001*). Vorangegangene Studien zeigten weiterhin, dass eine simultane Immunisierung mit einer ganzzellulären Pertussis-Vakzine, die Produktion diphtherie- und tetanuspezifischer IgE-Antikörper in entsprechend geimpften Kindern herunter reguliert (*Grüber et al., 2001*). Nach derzeitigen Kenntnissen gibt es jedoch nur wenige Daten zur Suppression einer durch ein Allergen induzierten Produktion spezifischer IgE-Antikörper nach Immunisierung gegen Diphtherie oder Tetanus.

Anhand des vorliegenden Mausmodells konnte gezeigt werden, dass 1) eine Immunisierung gegen Diphtherie und Tetanus vor Sensibilisierung mit dem Modellallergen Ovalbumin eine allergenbedingte Sensibilisierung und Atemwegsinflammation verminderte. 2) Ebenso verhinderte eine Immunisierung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid und gleichzeitige Allergensensibilisierung die Entwicklung der allergenbedingten Sensibilisierung und Atemwegsinflammation. 3) Die simultane Immunisierung mit Diphtherie und Tetanus und ganzzellulärer Pertussis vor Sensibilisierung mit OVA hemmte zusätzlich die Entwicklung einer erhöhten Atemwegsreaktivität.

Die Entwicklung der allergenbedingten Sensibilisierung und eosinophilen Atemwegsentzündung wird durch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 bzw. IL-5 maßgeblich vermittelt und kann einerseits durch die Th1-Zytokine IL-12, IFN- γ und IL-18, andererseits durch regulatorische T-Zellen, die zur Toleranzentwicklung führen (*Wohlleben et al., 2002/2003*), gehemmt werden. Eine Herunterregulation der allergenspezifischen IgE-Antwort ist für andere bakterielle Antigene in Tiermodellen untersucht worden, bisher nicht jedoch für Diphtherie und Tetanus. In der vorliegenden Arbeit verminderte die Diphtherie und Tetanus Immunisierung vor allergischer Sensibilisierung die allergenspezifische und -unspezifische Th2-Zytokinproduktion und induzierte allergenspezifisch sowie -unspezifisch die Produktion des Th1-Zytokins IFN- γ , obgleich der verwendete Impfstoff an das Adjuvans Aluminiumhydroxid adsorbiert war, das an sich zu einer verstärkten Th2-Immunantwort mit erhöhter IgE-Produktion führt (*Chuang et al., 1997*). Die Suppression der allergischen Sensibilisierung und Atemwegsinfammation in diesem Modell war dementsprechend mit einer Verschiebung von einer überwiegenden Th2-Antwort zu einer überwiegenden Th1-Immunantwort assoziiert.

Im Gegensatz zu diesem Modell führte die gleichzeitige Immunisierung gegen Diphtherie und Tetanus mit OVA-Sensibilisierung zu einer verminderten allergenspezifischen IgE Produktion und zu einer Suppression der Atemwegsinfammation, assoziiert mit einer supprimierten Th2-Zytokinproduktion. Ähnliche Ergebnisse konnten in tierexperimentellen Studien mit an Allergen gekoppelten Toxoiden erzielt werden: Die tierexperimentelle Studie von Tamura, in der die hitzelabile B-Untereinheit des Escherichia-coli-Enterotoxins an Ovalbumin gekoppelt worden war, zeigte eine verminderte IgE-Produktion in nachfolgend sensibilisierten Tieren (*Tamura et al., 1997*). In einem weiteren Mausmodell wurde eine verminderte

allergenspezifische IgE-Produktion nach intranasaler Immunisierung der Tiere mit der B-Untereinheit des Cholera Toxoids gekoppelt an Ovalbumin (*Wiedermann et al., 1999, Eriksson et al., 2003, Sun et al., 2008*) gezeigt. In diesem Modell hat das eingesetzte Konjugat aus Allergen und Toxoid eine Anergie induziert, eine Form der antigenspezifischen Toleranz, bei der eine T-zelluläre Immunantwort auf das Antigen durch das Konjugat insgesamt abgeschwächt war (*Wiedermann et al., 1999*). Auch in dem vorliegenden Modell mit gleichzeitiger Immunisierung gegen Diphtherie und Tetanus mit OVA-Sensibilisierung könnte die Verminderung der Th2-Zytokine Folge einer allergenspezifischen T-Zell-Anergie sein, da tendenziell eine leichte Verminderung der allergenspezifischen Proliferation der mononukleären Milzzellen nach Re-Stimulation mit OVA *in vitro* in diesen Tieren beobachtet wurde. Sun zeigte die Assoziation regulatorischer T-Zellen mit peripherer Toleranz nach Applikation eines Konjugats (*Sun et al., 2008*). Tregs spielen eine Schlüsselrolle in der Prävention von Autoimmunerkrankungen und Allergie. Charakteristisch ist eine Hemmung beider Immunantworten, sowohl der Th1- als auch der Th2-Zytokine. Weiter supprimieren Tregs die IgE-Produktion der B-Lymphozyten und hemmen sowohl direkt als auch indirekt die allergische Entzündung, indem sie die Aktivität der eosinophilen und basophilen Lymphozyten sowie auch Mastzellen inhibieren (*Braga, 2011*). Eine Zunahme der regulatorischen T-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet: Es ließ sich in der durchflusszytometrischen Analyse keine erhöhte Frequenz CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen in den mit DT-immunisierten und gleichzeitig OVA-sensibilisierten Tieren im Vergleich zu alleinig OVA-sensibilisierten oder Negativkontrolltieren nachweisen. Der Transkriptionsfaktor forkhead box protein (Foxp3) stand uns zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Als Erklärungsansatz dieser beiden unterschiedlichen Studienresultate könnte

sein, dass die Induktion regulatorischer T-Zellen grundsätzlich eine direkte Kopplung des Antigens an das Allergen erfordert. Zusätzliche Mechanismen hierbei sind die effiziente Bindung der Antigen-Allergen Komplexe an den Zell-Membran-Gangliosid Rezeptor 1 (GM1), vorkommend auf multiplen Zelltypen, der den Effekt der mukosalen Toleranz wesentlich durch eine gesteigerte Phagozytose und Antigenpräsentation potenziert, wobei fast alle B-Zellen zu antigen-präsentierenden Zellen mit jedem Antigen-Allergen-Kontakt werden (*Sun et al., 2008*). Im Vergleich wurde in der vorliegenden Studie Impfstoff und Allergen ungekoppelt appliziert und führte zur isolierten Suppression der Th2-Immunität. Die fehlende Induktion regulatorischer T-Zellen in unserem Modell wird auch durch die fehlende Induktion des Zytokins IL-10 unterstützt. IL-10 gehört sowohl zu den Th2- als auch regulatorischen Zytokinen. Als regulatorisches Zytokin unterdrückt es die antigenspezifische T- und B-Zell-vermittelte Immun- und Entzündungsreaktion (*Stassen et al., 2004*). Bei Kindern mit Atopie im Gegensatz zu Kindern ohne Atopie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die IL-10 Produktion dendritischer Zellen vermindert ist (*Gentile et al., 2004*). In dem vorliegenden Modell führte die Immunisierung insbesondere mit DTP_w vor der allergischen Sensibilisierung zu einer verminderten allergen-spezifischen IL-10 Produktion. Die IL-10 Produktion folgte damit in unserem Modell der verminderten Th2-Immunität.

Die ganzzelluläre Pertussis-Impfung führte bei Kindern zu einer geringeren IgE-Bildung als die Impfung mit der azellulären Pertussisvakzine (Pa) (*Nilsson et al., 1998*). In gleicher Weise wurde die IgE- und IgG4-Bildung in gegen Diphtherie und Tetanus und anschließend ganzzellulär Pertussis geimpften Kindern supprimiert, verglichen mit DT-geimpften oder DTPa-geimpften Kindern. Weitere Unterschiede zwischen azellulärer und ganzzellulärer Pertussisvakzine finden sich im Zytokinprofil. Experimentelle Studien zeigten, dass sowohl in

Tiermodellen (Ryan et al., 1997) als auch bei Kindern (Ausiello et al., 1997, Ryan et al., 1998) der ganzzelluläre Pertussis-Impfstoff (Pw), eine geringere Th2-Immunantwort als das azelluläre Pertussisvakzin induziert. Die Pw-Impfung ruft bei Kindern eine vorherrschende Th1-Immunantwort mit einer Erhöhung des IFN- γ hervor und einer deutlichen Suppression des IL-5; die azelluläre Pertussis-Impfung (Pa) dagegen induziert ein gemischtes Zytokinmuster mit Induktion der Th1- und Th2-Zytokine IFN- γ und IL-5 (Ausiello et al., 1997).

Den Daten der Literatur entsprechend, unterdrückte nicht nur in dem vorliegenden Modell die simultane Immunisierung mit DTPw vor anschließender Allergensensibilisierung das Gesamt- und OVA-spezifische IgE, sondern erhöhte auch die Produktion des Gesamt- und OVA-spezifischem IgG2a. IgE wird im murinen Modell durch die Th2-Zytokine IL-4 und -13 induziert, IgG2a durch das Th1-Zytokin IFN- γ . Pw führte entsprechend auch zu einer ausgeprägten Th1-Immunantwort der mononukleären Milzzellen nach *in vitro* Stimulation mit OVA oder dem T-Zell-Mitogen. Die DTPw-Immunisierung bewirkte damit sowohl eine allergenspezifische als auch eine allergenunspezifische Verschiebung einer vorherrschenden Th2-Immunantwort zu einem überwiegenden Th1-Zytokinmuster. Im Einklang mit dieser ausgeprägten Th1-Immunantwort vermindert die DTPw-Immunisierung nicht nur die allergeninduzierte Th2-Zytokinproduktion und die IgE-Bildung nach Sensibilisierung, sondern hemmt ebenfalls die IL-5 vermittelte eosinophile Atemwegsinfammation und die Entwicklung einer erhöhten Atemwegsreaktivität nach Allergenprovokation bei sensibilisierten Tieren.

Die differente Wirkung der azellulären und ganzzellulären Pertussisvakzine könnte der unterschiedlichen molekularen Struktur der jeweiligen Impfungen zugeordnet werden. Der

azelluläre Impfstoff beinhaltet unter anderem das inaktivierte Pertussis-Toxoid, wohingegen der ganzzelluläre Pertussis Impfstoff potentiell immunmodulierende Komponenten enthält: Intrazelluläre DNA-Bestandteile wie repetitive Dinukleotid-sequenzen (CpG), oder Bakterienwandbestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS), können eine starke Induktion des IL-12 auslösen (*Mahon et al., 1996*). IL-12 wird als das Schlüsselzytokin beschrieben, das die Entwicklung einer Th1-Immunantwort fördert und einer Th2-Immunantwort hemmt (*Heinzel et al., 1995, Snijders et al., 1998, Wang et al., 2012*). In der publizierten Studie von Kim et al. wurde gezeigt, dass CpG als Bestandteil der Bordetella Pertussis-DNA fähig ist, die allergeninduzierte Atemwegsinflammation und Hyperreaktivität durch Hemmung der lokalen Th2-Zytokinausschüttung zu unterdrücken (*Kim et al., 2004*). Auch unterstützen die Resultate Mousaris et al. unsere Daten, indem er demonstrierte, dass die intranasale Applikation von Oligodeoxynukleotiden ein erhöhtes IFN- γ als Th1-Zytokin und eine erhöhte Produktion an IL-10 als regulatorisches Zytokin bewirkt (*Mousari et al., 2008*).

Die Hypothese, dass bakterielle Zellwandkomponenten zu dem anti-allergischen Effekt beitragen könnten, unterstützen weitere Experimente, in denen demonstriert wurde, dass sowohl systemisches als auch lokal appliziertes LPS vor Sensibilisierung der Mäuse, die allergische Atemwegsinflammation in IL-12-Abhängigkeit herunter regulierte (*Lavigne et al., 2004, Gerhold et al. 2002 und 2003*). Ferner wurde der potentiellen Rolle des LPS als modifizierender Faktor der anti-allergischen Immunantwort indirekte Evidenz erwiesen durch die Assoziation, dass eine vermehrte LPS-Exposition in der frühen Kindheit zu einer geringeren Prävalenz atopischer Erkrankungen bei Kindern, die auf einer Farm groß geworden sind, führte (*Gereda et al., 2000, Braun-Fahrländer et al., 2002*). Daher erscheint eine Auseinandersetzung mit bakteriellen Produkten durch eine Stimulation des

angeborenen Immunsystems, fähig zu sein, eine Herunterregulierung eines inflammatorischen Prozesses durch das adaptive Immunsystem zu induzieren.

Die Imbalanz des adaptiven Immunsystems der Th1/Th2-Immunantwort ist die Grundlage für die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und der daraus folgenden Entzündungsreaktion. Voraussetzung ist eine Allergenprovokation (*Saloga et al., 1994*). Die Präsentation des Allergens in der Lunge über CD4⁺ T-Zellen führt über IgE-Allergenvernetzung zur Mastzelldegranulation und zur vermehrten Produktion von Th2-Zytokinen. Diese wiederum führen zur Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und weiteren inflammatorischen Effektorzellen der Lungenmukosa. Die alleinige Immunisierung mit DT vor oder bei gleichzeitiger Sensibilisierung verhinderte, der verminderten allergenspezifischen Th2-Zytokinproduktion folgend, die Entwicklung einer allergenbedingten eosinophilen Atemwegsentzündung. Die DTPw-Immunisierung vor Allergensensibilisierung hemmte die Entwicklung der allergen-vermittelten Atemwegsentzündung nur partiell: Zwar war die Infiltration der Eosinophilen deutlich vermindert, jedoch blieb eine signifikante Lymphozyteninfiltration bestehen.

Die erhöhte AR *in vivo* nach systemischer Sensibilisierung ist ein multifaktorielles Geschehen, dessen Pathogenese bisher nicht vollständig geklärt ist. Das Zusammenspiel verschiedenster Mechanismen auf die Atemwege wie Bronchokonstriktion, Epithelschädigung und vermehrte Mukusbildung spielen möglicherweise eine Rolle (*Wills-Karp et al., 1999*). Die eigene experimentelle Arbeit zeigte eine allergische Atemwegsinfammation, einhergehend mit einer erhöhten Atemwegsreaktivität der placebo-immunisierten, OVA-sensibilisierten Tiere, wie von verschiedenen Autoren beschrieben (*Hamelmann et al. 1997, Williams and Galli,*

2000, Sur 2000). Obwohl die DT-Immunsierung vor und während der Sensibilisierung die Entwicklung der eosinophilen Atemwegsinfektion hemmte, zeigten diese Tiere weiterhin eine erhöhte Atemwegsreaktivität. Dies unterstützt die Hypothese, dass die erhöhte Atemwegsreaktivität im Rahmen des allergischen Asthma bronchiale nicht allein auf die eosinophile Entzündung zurückzuführen ist.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Arbeit gezeigt werden, dass die DT-Immunsierung der Mäuse vor Sensibilisierung mit Ovalbumin eine signifikante Herunterregulierung der allergeninduzierten IgE-Produktion und Atemwegsinfektion aufwies; die Kombinationsimmunsierung mit DTPw verhinderte darüber hinaus die Ausbildung einer erhöhten Atemwegsreaktivität. Diese Ergebnisse unterstützen damit das Konzept der präventiven, und nicht einer fördernden Rolle dieser Impfungen auf die Allergieentwicklung. Die Ergebnisse verleiten zur vorsichtigen Spekulation, dass eine simultane Vakzinierung von bakteriellen Komponenten und Allergenen als Impfung die Entwicklung allergisch-bedingter Erkrankungen verhindern könnte. Ein solcher Ansatz wäre zur gezielten primären Prävention zum Beispiel bei Hochrisikokindern denkbar, um einer allergen-vermittelten Sensibilisierung und nachfolgenden Erkrankungen des atopischen Formenkreises vorzubeugen.

6 Zusammenfassung

Aufgrund der erheblichen Zunahme von Allergien in den letzten beiden Jahrzehnten ist die Entwicklung von Konzepten zur primären Prävention allergischer Erkrankungen bereits in früher Kindheit von großer Bedeutung. Im Sinne der „Hygiene“-Hypothese werden mikrobielle Bestandteile als protektiv gegen die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung beschrieben. Vereinfachte immunologische Grundlage bilden die gegensätzlich regulierten adaptiven Immunantworten auf Allergene einerseits, die Th2-Immunantwort und mikrobielle Antigene andererseits, die Th1-Immunantwort, die im gesunden Organismus in einem Gleichgewicht stehen. Während die „Hygiene“-Hypothese als allgemein akzeptiert gilt, werden Impfungen bezüglich der Auslösung allergischer Erkrankungen kontrovers diskutiert. Impfungen mit Toxoiden wie gegen Diphtherie und Tetanus können mit der Produktion impfstoffspezifischer IgE-Antikörper einhergehen. Diese physiologische, toxoidspezifische IgE-Produktion ist bei Kindern mit einer allergischen Prädisposition erhöht (*Dannemann et al., 1996, Grüber et al., 2001*) und wurde nach Impfung mit der ganzzellulären Pertussisvakzine als vermindert beschrieben. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die gleichzeitige Immunisierung mit Diphtherie- und Tetanustoxoid und der ganzzellulären Pertussisvakzine eine nachfolgende allergen-induzierte Sensibilisierung und Atemwegsentszündung in einem Mausmodell verhindern und dementsprechend primär präventiv gegen die Entwicklung eines allergischen Phänotyps wirken kann.

BALB/c-Mäuse wurden subkutan mit einer Kombination aus Diphtherie- und Tetanus-Toxoid oder mit einer Kombination aus Diphtherie- und Tetanus-Toxoid und dem ganzzellulären Impfstoff gegen *Bordetella pertussis* jeweils an den Tagen -21, -14 und -7 immunisiert. Einige

Tiere wurden gegen Diphtherie und Tetanus an den Tagen 1, 3 und 5 simultan mit der systemischen Allergensensibilisierung immunisiert. Die systemische Sensibilisierung mit dem Modellallergen Ovalbumin erfolgte sechsmal intraperitoneal (10 µg/ 100µl/Maus/ Applikation) an den Tagen 1, 3 und 5 sowie 10, 12 und 14 des Protokolls. Zur Induktion einer Atemwegsentszündung erfolgten wiederholte Provokationen mittels Ovalbumin über die Atemwege je einmal täglich an den Tagen 28 bis 30 (100 mg/ 10 ml, 20 min.).

In den vorliegenden Experimenten induzierte die systemische Sensibilisierung und anschließende Atemwegsprovokation mit Ovalbumin signifikant erhöhte allergenspezifische IgE-Serumtiter, eine eosinophile Atemwegsentszündung und die Entwicklung einer erhöhten Atemwegsreaktivität *in vivo*, verglichen mit einer Placebo-Immunsierung und Placebo-Sensibilisierung. In den sensibilisierten Tieren zeigte sich eine prädominante allergenspezifische und -unspezifische Th2-Zytokinproduktion durch mononukleäre Milzzellen *in vitro*. Die Immunisierung mit Diphtherie- und Tetanus-Toxoid vor oder während der Allergensensibilisierung unterdrückte nicht nur die IgE-Bildung signifikant, sondern auch die Entwicklung einer eosinophilen Atemwegsinfektion. Entsprechend war auch die allergenspezifische Th2-Zytokinantwort *in vitro* in diesen Tieren vermindert. Die Kombinationsimmunsierung aus Diphtherie- und Tetanus-Toxoid und der ganzzellulären Pertussisvakzine vor Allergensensibilisierung verhinderte die allergische Sensibilisierung, führte zu einer partiellen Hemmung der Entwicklung der Atemwegsinfektion und verhinderte die Ausbildung einer erhöhten Atemwegsreaktivität. Diese Immunisierung bewirkte sowohl eine allergenspezifische als auch eine allergenunspezifische Verschiebung von einer vorherrschenden Th2-Immunantwort hin zu einem überwiegenden Th1-

Zytokinmuster. Eine vermehrte Entwicklung regulatorischer T-Zellen nach Immunisierung wurde nicht gefunden.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die eingesetzten Impfantigene gegen bakterielle Erkrankungen die Entwicklung einer allergen-bedingten pathologischen Immunantwort inhibieren können; die Ergebnisse widersprechen somit der insbesondere unter Impfgegnern verbreiteten Annahme, dass Impfungen Allergien auslösen oder verstärken können. Diese Daten können weiterhin als Grundlage primär präventiver Ansätze zur Verhinderung allergischer Erkrankungen dienen, jedoch sind hierfür weitere Experimente notwendig, um eine klinische Anwendbarkeit zu prüfen.

7 Literatur

Aalberse RC., van Ree R., Dannemann A., Wahn U. IgE antibodies to tetanus toxoid in relation to atopy. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 169-171.

Ada GL. The immunological principles of vaccination. *Lancet*. 1990; 335: 523-526.

Akbari O., Freeman GJ., Meyer EH., Greenfield EA., Chang TT., Sharpe AH., Berry G., DeKruyff RH., Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-Ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature Medicine* 2002; 8: 1024-1032.

Akdis CA., Blaser K., Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59 (9): 897-913.

Alm JS., Swartz J., Lilja G., Scheynius A., Petershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 1999; 353: 1485-1488.

Amarasekera M. Gunawardena NK., de Silva NR., Douglass JA., O'Hehir RE., Weerasinghe A. Impact of helminth infection on childhood allergic diseases in an area in transition from high to low infection burden. *Asia Pac Allergy*. 2012 Apr; 2(2):122-8.

Asher MI. on behalf of The ISAAC Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998; 8: 161-176.

Asher MI., Weiland SK. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. *Clin Exp Allergy* 1998; 28 Suppl 5: 52-66.

Ausiello CM., Urbani F., La Sala A., Lande R., Cassone A. Vaccine- and antigen-dependent type 1 and type 2 cytokine induction after primary vaccination of infants with whole-cell or acellular pertussis vaccines. *Infection and Immunity* 1997; 65: 2186-2174.

Bacharier LB., Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 547-558.

Beasley R., Cane J., Lai C.K., Pearce N. Prevalence and aetiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: S466-472.

Bradley LM., Dalton DK., Croft M. A direct role of IFN-gamma in regulation of Th1- cell development. *J Immunol* 1996; 157: 1350-1358.

Braga M. T-regulatory cells in allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011 Jan-Mar; 24(1 suppl.): 55S-64S.

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.

Braun-Fahrländer C. Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April 2002. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 325-329.

Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol.* 1999;163:6448-6454.

Buckley TL., Nijkamp FP. Airways hyperreactivity and cellular accumulation in a delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Modulation by capsaicin-sensitive nerves. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 400-407.

Casas Vilá C. [Round table: Importance of allergens in childhood asthma. Introduction]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2004 May-Jun; 32(3): 119-21.

Chuang YH., Chiang BL., Chou CC., Hsieh KH. Immune effector cells induced by complete Freund's adjuvant exert an inhibitory effect on antigen-specific type 2 T helper responses. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 315-324.

Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm* 2001; 10: 51-59.

Clay MM., Pavia D., Newman SP., Clarke SW. Factors influencing the size distribution of aerosols from jet nebulisers. *Thorax* 1983; 38: 755-759.

Clinchy B., Björck P., Paulie S., Möller G. Interleukin-10 inhibits motility in murine and human B-Lymphocytes. *Immunol* 1994; 82: 376-382.

Coffmann RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 2006;7: 539-541.

Dannemann A., van Ree R., Kulig M. et al. Specific IgE and IgG4 immune responses to tetanus and diphtheria toxoid in atopic and nonatopic children during the first two years of life. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111: 262-267.

Debarry J., Hanuszkiewicz A., Stein K., Holst O., Heine H. The allergy-protective properties of *Acinetobacter lwoffii* F78 are imparted by its lipopolysaccharide. *Allergy* 2010 Jun 1; 65(6): 690-7.

Debarry J., Garn H., Hanuszkiewicz A., Dickgreber N., Blümer N., von Mutius E., Bufe A., Gatermann S., Renz H., Holst O., Heine H. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 2007 Jun; 119(6):1514-21.

DeStefano F., Gu D., Kramarz P. et al. Childhood vaccinations and risk of asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 498-504.

Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie e. V. (Herausgeber). *Infektionen bei Kindern und Jugendlichen*. 2003. Futuramed-Verlag München.

Dirix V., Verscheure V., Goetghebuer T., Hainaut M., Debrie AS., Loch C., Mascart F. Cytokine and antibody profiles in 1-year-old children vaccinated with either acellular or whole-cell pertussis vaccine during infancy. *Vaccine* 2009 Oct 9; 27(43): 6042-7.

Eder W., von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 113-117.

Ennis DP., Cassidy JP., Mahon BP. Acellular Pertussis vaccine protects against exacerbation of allergic asthma due to *Bordetella pertussis* in a murine model. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 409-417.

Eriksson K., Fredriksson M., Nordström I., Holmgren J. Cholera Toxin and Its B Subunit Promote Dendritic Cell Vaccination with Different Influences on Th1 and Th2 Development. *Infect Immun.* 2003 April; 71(4): 1740–1747.

Fireman P. Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc* 2003; 24: 79-83.

Flohr C., Nagel G., Weinmayr G., Kleiner A., Williams HC., Ait-Khaled N., Strachan DP.; ISAAC Phase Two Study Group. Tuberculosis, bacillus Calmette-Guérin vaccination, and allergic disease: findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Two. *Pediatr Allergy Immunol* 2012 Jun; 23(4): 324-31.

Flöistrup H., Schwartz J., Bergström A., et al. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(1): 59-66.

Fontenot JD., Gavin MA., Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-36.

Gani F., Senna G., Piglia P., Grosso B., Mezzelani P., Pozzi E. Cytokines and asthma. *Recenti Prog Med* 1998; 89: 520-528.

Gentile DA., Schreiber R., Howe-Adams J., Trecki J., Patel A., Angelini B., Skoner DP. Diminished dendritic cell interleukin 10 production in atopic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92: 538-44.

Gerberick GF., Curse LW., Miller CM., Sikorski EE., Ridder GM. 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.

Gereda JE., Leung DY., Thatayatikom A., Streib JE., Price MR., Klinnert MD., Liu AH. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355: 1680-1683.

Gerhold K., Blümchen K., Bock A., Stock P., Kallinich T., Seib C., Löhning M., Wahn U., Hamelmann E. 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.

Gerhold K., Blümchen K., Franke A., Stock P., Hamelmann E. Exposure to endotoxin in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 389-396.

Germain RN. Modern concepts in immune recognition and lymphocyte activation. Relevance for the development of useful vaccines. *Int J Technol Assess Health Care*. 1994;10:81-92.

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 651-663.

Grüber C., Lau S., Dannemann A., Sommerfeld C., Wahn U., Alberse R.C. Down-Regulation of IgE and IgG4 Antibodies to Tetanus Toxoid and Diphtheria Toxoid by Covaccination with Cellular Bordetella pertussis Vaccine. *J Immunol* 2001; 167: 2411–2417.

Grüber C., Illi S., Lau S., Nickel R., et al. Transient suppression of atopy in early childhood is associated with high vaccination coverage. *Pediatrics* 2003; 111: e282-e288.

Gordon JR., Burd PR., Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990; 11: 458-464.

Hamelmann E., Schwarze K., Takeda A. et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 766-775.

Heinzel FP., Rerko RM., Ahmed F., Pearlman E. Endogenous IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *J Immunol* 1995; 155: 730-739.

Herz U., Gerhold K., Grüber C., Braun A., Wahn U., Renz H., Paul K. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increases airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 867-874.

Holt PG., Leivers S. Tolerance induction via antigen inhalation: isotype specificity, stability and involvement of suppressor T cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982; 67: 1117-1122.

Hurwitz EL., Morgenstern H. Effects of diphtheria-tetanus-pertussis or tetanus vaccination on allergies and allergy-related respiratory symptoms among children and adolescents in the United States. *J Manipulative Physiol Ther* 2000; 23: 81-90.

Hsieh CS., Macatonia SE. Tripp CS., Wolf SF., O'Garra A., Murphy KM. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-549.

Jelinek DF. Regulation of B lymphocyte differentiation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 84: 375-85.

Kemp T., Pearce N., Fitzharris P. et al. Is infant immunization a risk factor for childhood asthma or allergy? *Epidemiology* 1997; 8: 678-680.

Kim YS., Kwon KS., Kim DK., Choi IW., Lee HK. Inhibition of murine allergic airway disease by *Bordetella pertussis*. *Immunology* 2004; 112: 624-630.

Lavigne MV., Castro M., Andino J. et al. Alternative diphtheria, tetanus and whooping cough immunization schedule to evoke a Th2 tetanus and a Th1 pertussis immune response. *Microbes Infect* 2004; 6: 481-484.

Le Gros G., Ben-Sasson SZ., Seder R., Finkelman FD., Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4) - producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp med* 1990; 172: 921-929.

Lebmann DA., Coffman RL. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med* 1988; 167: 853-862.

Leonard P., Sur S. Interleukin-12: potential role in asthma therapy. *Bio Drugs* 2003; 17: 1-7.

Li B., Samanta A., Song X., Furuuchi K., Iacono KT., Kennedy S., Katsumata M., Saouaf SJ., Greene MI. Foxp3 ensembles in T-cell regulation. *Immunol Reviews* 2006; 212: 99-113.

Liu AH. Allergy and asthma: classic Th2 diseases (?). *Allergy Asthma Proc* 2000 Jul-Aug; 21(4): 227-30.

Liu AH. Hygiene theory and allergy and asthma prevention. *Epidemiology* 2007; 21: 2-7.

Maggi E., Parronchi P., Manetti R., et al. Reciprocal regulatory effect of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992; 148

Martignon G., Oryszczyn MP., Annesi-Maesano I. Does childhood immunization against infectious diseases protect from the development of atopic disease? *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17: 193-200.

Martinez FD., Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet* 1999; 354: (Suppl 2): SII12-5.

Mayr S., Zuberi RI., Zhang M. et al. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol* 2002; 169: 2061-2068.

Masoli M., Fabia, D., Holt S., Beasley R. The global burden of asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59: 469-478.

Miller JS., Schwartz LB. Human mast cell proteases and mast cell heterogeneity. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 637-642.

Mosmann TR., Cherwinski H., Matha W. et al. Two types of murine helper T cell clone. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.

Mosmann TR., Coffmann RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.

Mousari T., Salek Moghadam A., Falak R. Immunotherapy of chenopodium album induced asthma by intranasal administration of CpG oligodeoxynucleotides in Balb/c mice. Iran J Immunol 2008 Mar; 5(1): 57-63.

Munoz JJ., Arai H., Bergman RK., Sadowski PL. Biological activities of crystalline pertussigen from Bordetella pertussis. Infect Immun 1981; 33: 820-826.

Nadel JA. Biologic effects of mast cell enzymes. Am Rev Respir Dis 1992; 145: 37-41.

Nilsson L., Kjellmann NI., Björkstén B. A randomized controlled trial of the effect of pertussis vaccines on atopic disease. Arch Pediatr Adolesc Med 1998; 152: 734-738.

Nilsson L, Grüber C., Granström M, Björkstén B., Kjellmann NI. Pertussis IgE and atopic disease. Allergy 1998; 53: 1195-1201.

Odent MR., Culpin EE., Kimmel T. Pertussis vaccination and asthma: is there a link? JAMA 1994; 272: 592-593.

Ohkawara Y., Lei XF., Stämpfli MR., Marshall JS., Xing Z., Jordana M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;16:510-520.

Palmer E.M., Van Seventer G.A. Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals. J Immunol 1997; 158: 2654-2662.

Paul W.E. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77: 1859-1870.

Pauwels R., van der Straeten M., Platteau B., Bazin H. The non-specific enhancement of Allergy. I. In vivo effects of Bordetella pertussis vaccine on IgE synthesis. *Allergy* 1983; 38: 239-246.

Payet M., Conrad DH. IgE regulation in CD23 knockout and transgenic mice. *Allergy* 1999; 54: 1125-1129.

Punnonen J., Aversa G., de Vries JE. Human pre-B cells differentiate into Ig-secreting plasma cells in the presence of interleukin-4 and activated CD4+ T cells or their membranes. *Blood* 1993; 82: 2781-2789.

Racioppi L., Ronchese F., Matis L.A., Germain R. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signalling. *J Exp Med* 1993; 77: 1047-1060.

Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 577-589.

Rigaux P., Daniel C., Hisbergues M., Muraille E., Hols P., Pot B., Pestel J., Jacquet A. Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy* 2009 Mar; 64(3): 406-14.

Robinson DS., Lloyd CM. Asthma: T-bet – a master controller? *Curr Biol* 2002 Apr 30; 12(9): R322-4.

Rook GA., Stanford JL. Give us this day our daily germs. *Immunol Today* 1998; 19: 113-116.

Ryan M., Gothefors L., Storsaeter J., Mills KH. Bordetella pertussis-specific Th1/Th2 cells generated following respiratory infection or immunization with an acellular vaccine: comparison of the T cell cytokine profiles in infants and mice. *Dev Biol Stand* 1997; 89: 297-305.

Ryan M., Murphy G., Ryan E. et al. Distinct T-cell subtype induced with whole cell and acellular pertussis vaccines in children. *Immunology* 1998; 93: 1-10.

Sad S., Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol* 1994; 153: 3514-3522.

Saloga J., Renz H., Larsen GL., Gelfand E.W. Increased airways responsiveness in mice depends on local challenge with antigen. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 65-70.

Snijders A., Kalinski P., Hilkens CMU., Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; 10: 1593-1598.

Stassen M., Fondel S., Bopp T., Richter C., Muller C., Kubach J. 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: 1303-11

Stern D., Eder W., Tebow G. et al. ALEX Study Group. Rethinking Th2 antibody responses and allergic sensitization. *Novartis Found Symp* 2004; 257: 25-37.

Stock P., Akbari O., Berry G., Freeman GJ., DeKruyff RH., Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyperreactivity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1149-1156.

Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J* 1989; 299: 1259-1260.

Sun JB., Flach CF., Czerkinsky C., Holmgren J. B Lymphocytes Promote Expansion of Regulatory T Cells in Oral Tolerance: Powerful Induction by Antigen Coupled to Cholera Toxin B Subunit 1. *J Immunol*, 2008, 181: 8278–8287.

Tamura S., Hatori E., Tsuruhara T., Aizawa C., Kurata T. Suppression of delayed-type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. *Vaccine* 1997; 15: 225-229.

Taube C., Dakhama A., Gelfand EW. Insights into pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135: 173-186.

Turner H., Kinet JP. Signaling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon R1. *Nature* 1999; 25: B24-30.

Umetsu DT., DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Reviews* 2006; 212: 238-255.

Von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis-the epidemiological evidence. Immunobiology 2007; 212: 433-439.

Van der Pouw Kraan TC., Van der Zee JS., Boeijs LC., De Groot ER., Stapel SO., Aarden LA. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. Clin Exp Immunol 1998; 111: 129-135.

Wan YY., Flavell RA. The role of cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. Immunol Reviews 2006; 212: 114-130.

Wang Y., Fan KT., Li JM., Waller EK. The regulation and activity of IL-12. Front Biosci (school Ed) 2012; 4: 888-899.

Wang X., Mosmann TR. In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)-gamma, and can subsequently differentiate into IL-4 or IFN-gamma-secreting cells. J Exp Med 2001; 194: 1069-1080.

Wiedermann U., Jahn-Schmid B., Lindblad M., et al. Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy. Int Immunol 1999; 11: 1131-1138.

Williams CM., Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. Clin Immunol 2000; 169: 847-859.

Wills-Karp M. Interleukin 12 as a target for modulation of the inflammatory response in asthma. Allergy 1998; 53: 113-119.

Wohlleben G., Erb KJ. Inflammation versus Immunoregulation: What is the key to the development of an effective anti-allergy vaccine? *Pathobiology* 2002/3; 70: 270-276.

Yamaguchi Y., Hayashi Y., Sugama Y., et al. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 1988; 167: 1737-1742.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zellen
AR	Atemwegsreaktivität
aTregs	adaptive regulatorische T-Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
CD4+	Cluster of differentiation 4 positiv
ConA	Concavalin A
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
Cpm	counts per minutes
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte antigen
Cy	Cyanin
D	Diphtherie-Toxoid
DC	Dendritische Zelle
d.h.	das heißt
ELISA	Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment cristallizable
FcεRI	Fragment cristallizable epsilon RI (hochaffiner IgE Rezeptor)
FcεRII	Fragment cristallizable epsilon RII (weniger affiner IgE-Rezeptor)
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in der 1. Sekunde
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	Fetales Kalb Serum

Foxp	forkhead box protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GM1	Zell-Membran-Gangliosid Rezeptor 1
HE Färbung	Hämatoxilin-Eosin Färbung
HLA	Human Leucocyte Antigen
IE	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
Igs	allergenspezifisches Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid binding protein
Lf	Limulus flocculationes
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotriene
M	Masern
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Class II
MNC	mononuclear cell
MW	Mittelwert
NF κ B	Nuclear transcription Factor kappa B
NK Zellen	natürliche Killerzellen
nTreg	natural occurring Tregs
OVA	Ovalbumin
OU	Optical Unit = Trübungseinheit = 1 Milliarde Keime
P _a	Pertussis acellular
P _w	Pertussis whole-cell

PAF	Plättchen-Aktivierungs-Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Programmed Death
PE	Phycoerythrin
Penh	enhanced pause
PEP	peak expiratory box pressure
PGD	Prostaglandine
p.i.	per inhalationem
RKI	Robert-Koch-Institut
s.c.	subcutan
SD	Standard deviation
SEM	Standard Error of the Mean
SI	Stimulationsindex
SPF-Haltung	spezifiziert pathogenfreie Haltung
T	Tetanus-Toxoid
T-bet	T-box esresse in T-cells
T _e	Expirationszeit
TGF-β	Transforming growth factor beta
Th-Zelle	T Helfer Zelle
T _i	Inspirationszeit
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
T _r	Relaxationszeit
Treg	regulatorische T-Zelle

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1	DT- oder DTPw-Immunsierung vor Beginn der allergischen Sensibilisierung (Behandlungsprotokoll I).	27
2	DT-Immunsierung während der OVA-Sensibilisierung (Behandlungsprotokoll II).	28
3	Darstellung der Messparameter der barometrischen Ganzkörperplethysmographie	37
4	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die Gesamt- und allergenspezifische Immunglobulinproduktion.	56
5	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die allergen-induzierte eosinophile Atemwegsentzündung.	57
6	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die lokale IL-5-Produktion.	58
7	Einfluss der DT- bzw. DTPw-Immunsierung auf die Atemwegsreaktivität <i>in vivo</i> .	60

8.2 Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
I	Tierzahlen pro Gruppe mit gleicher Behandlung.	28
II	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die antigen- und allergenspezifische Immunantwort.	53
III	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die antigenspezifische Zytokinproduktion der mononukleären Milzzellen <i>in vitro</i> .	54
IV	Einfluss der DT- und DTPw-Immunsierung auf die allergen-induzierte und -unspezifische Zytokinproduktion der mononukleären Milzzellen <i>in vitro</i> .	62

8.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Eckard Hamelmann danken, der zu dieser Zeit das Labor leitete und dessen Führung der Erfolg zuzusprechen ist, der mir das Promotionsthema überließ und sich um die finanzielle Unterstützung im Rahmen einer Forschungsförderung der Charité kümmerte. Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Ulrich Wahn, Chef der Abteilung und allzeit hilfsbereit. Ganz besonders danken möchte ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Kerstin Gerhold, die diese Arbeit erst ermöglichte, die mir stets exzellent wissenschaftlich zur Seite stand und nicht die Geduld und den Glauben an mich verlor. Weiter danke ich Herrn PD Dr. Christoph Grüber, der viele Vorarbeiten leistete, der so einige organisatorische Fragen klärte und stets ein wichtiger Ansprechpartner war. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Christine Seib, mit der ich tagtäglich zusammen arbeitete, die mich sämtliche technische Methoden lehrte, aufmunterte, aber darüber hinaus ihre Freundschaft schenkte! Natürlich danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Hamelmann, stellvertretend nennen möchte ich Frau Dr. Avagyan, die mir nicht von der Seite wich, wann immer ich sie brauchte. Auch der „TA-Familie“: Petra Ellensohn, in Gedenken, Margret Oberreit-Menesis und Gabi Schulz möchte ich für die großartige Unterstützung und die liebevolle Integration danken. Danken möchte ich meiner Familie: meinen Eltern, meiner Schwester und insbesondere meinem Mann Abla, der es ertrug, dass ich darunter litt diese Arbeit so lange nicht fertig stellen zu können und der seinen Humor darüber nie verlor. Und ein riesen Dank gilt meinen Kindern Elias und Sanna, deren Zeiten und Elternzeiten ich immer wieder nutzte, um bis hierher zu kommen!

8.4 Publikation

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; 61: 820-827.

8.5 Curriculum vitae

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

Erklärung an Eides Statt

Ich, Anne Sae Lim von Stuckrad, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss von Schutzimpfungen auf die Entwicklung einer allergischen Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in einem Mausmodell“ 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, 29.10.2012

Unterschrift