

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Ist mütterliches, allergisches Asthma bronchiale
ein Risikofaktor für die Nachkommen an
allergischem Asthma bronchiale zu erkranken?

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisa Birgit Sodemann

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2. EINLEITENDE ANMERKUNG	2
3. ABSTRACT	2
3.1. ABSTRACT IN DEUTSCH	2
3.2. ABSTRACT IN ENGLISCH	3
4. MANTELTEXT	5
4.1. EINLEITUNG	5
4.2. METHODIK	9
4.2.1. Aufbau des Tierversuchs	9
4.2.2. Blutgewinnung	11
4.2.3. Bronchoalveoläre Lavage, differenzierte Zellzählung und Zytokine	11
4.2.4. Lungenhistologie	12
4.2.5. FoxP3-Immunhistochemie	13
4.2.6. Antikörperkonzentration	13
4.2.7. Analyse der IgG-Glykosylierung	14
4.2.8. Messung des Atemwegswiderstandes.....	14
4.2.9. Statistische Analyse	15
4.3. ERGEBNISSE	15
4.3.1. Inflammatorisches Profil der OVA- und CAS-allergischen Muttertiere.....	15
4.3.2. Inflammatorisches Profil der OVA-allergischen Nachkommen	16
4.3.3. IgG1- und IgG3-Glykosylierung der Muttertiere	20
4.3.4. IgG1- und IgG3-Glykosylierung der OVA-allergischen Nachkommen	21
4.4. DISKUSSION	23
4.4.1. Unterschiedlicher Phänotyp der OVA-allergischen Nachkommen.....	23
4.4.2. Unterschiede in den Antikörperkonzentrationen	23
4.4.3. Zytokine in der BAL.....	24
4.4.4. IgG-Glykosylierung als möglicher Einflussfaktor auf die Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems	25
4.5. LITERATURVERZEICHNIS	29
5. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG / ANTEILSERKLÄRUNG	32
6. AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST	34
7. PUBLIKATION	36
8. LEBENS LAUF	48
9. PUBLIKATIONS LISTE	49
10. DANKSAGUNG	49

1. Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
Asn	Asparagin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CAS	Casein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzymimmunoassay)
Fc	Fragment crystallizable (kristallines Fragment)
G	Galactose
GD	Gestation day (Schwangerschaftstag)
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
KC	Keratinocyte chemoattractant
MCP	Monocyte chemoattractant protein
„newCAST“	„New Computer Assisted Stereological Toolbox“
OD	Optical Density (optische Dichte, Extinktion)
OVA	Ovalbumin
PAS-Reaktion	Periodic acid-Schiff reaction (Periodsäure-Schiff-Reaktion)
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PI	Point of Inflammation (Inflammationsscore)
Rn	Atemwegswiderstand
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Sialinsäure
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TNF	Tumornekrosefaktor

2. Einleitende Anmerkung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – ausgenommen sind die Ergebnisse der Zytokin-Konzentrationen – wurden bereits veröffentlicht in: Sodemann EB, Dähling S, Klopffleisch R, Boiarina E, Cataldo D, Alhasan MM, Yildirim A, Witzenrath M, Tabeling C, Conrad ML. Maternal asthma is associated with persistent changes in allergic offspring antibody glycosylation. *Clinical and Experimental Allergy*. 2020;50(4):520–31.

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit überschneidet sich daher mit dem Inhalt der oben genannten Veröffentlichung. Die Abbildungen entstammen ebenfalls dieser Publikation.

3. Abstract

3.1. Abstract in Deutsch

Es wurde bereits vielfach diskutiert, ob mütterliches Asthma bronchiale einen Risikofaktor für die Nachkommen darstellt, ebenfalls an allergischem Asthma zu erkranken. Die bisher durchgeführten Tierversuche variieren jedoch stark in der Methodik und reichen nicht aus, um die Mechanismen der maternofetalen Risikoübertragung gänzlich zu verstehen. Daher wurde in dem folgenden Maus-Modell der Einfluss einer Asthma-Exazerbation während der Schwangerschaft auf die Asthma-Suszeptibilität der Nachkommen untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf dem Immunglobulin G (IgG), welches in Abhängigkeit von seiner Glykosylierung pro- oder antiinflammatorisch auf den Fetus einwirken kann.

Die weiblichen Mäuse wurden vor der Verpaarung entweder mit Casein (CAS) oder mit Ovalbumin (OVA) subkutan sensibilisiert. Die Kontrollgruppe erhielt eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS: engl. phosphate-buffered saline). Die Exazerbation während der Schwangerschaft wurde mittels einer Aerosol-Exposition des jeweiligen Allergens oder PBS ausgelöst. Bei den Nachkommen wurde nach dem gleichen Protokoll vorgegangen, jedoch verwendete man bei allen Nachkommen OVA als Allergen. Der asthmatische Phänotyp wurde mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL), Lungenhistologie und Messung des Atemwegswiderstandes quantifiziert. Des Weiteren erfolgte eine Analyse der IgG-Glykosylierung im Serum der Muttertiere und deren allergischen Nachkommen.

In den Nachkommen, die mit dem gleichen Allergen behandelt wurden wie das Muttertier (OVA-allergische Nachkommen von OVA-allergischen Muttertieren), konnte ein höheres Risiko für die Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems im Vergleich zu den Nachkommen der Kontrollgruppe gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die OVA-allergischen Nachkommen von CAS-allergischen Muttertieren diesen allergischen Phänotyp nicht. Während sich die CAS- und OVA-Muttertiere nicht in den Ergebnissen der BAL und der Lungenhistologie unterschieden, ließ sich ein signifikanter Unterschied in ihrer IgG-Glykosylierung aufzeigen. Die OVA-allergischen Muttertiere sowie ihre Nachkommen wiesen einen hohen Anteil an IgG auf, welches keine zusätzliche Galaktose oder Sialinsäure am Glykan des Asparagins (Asn)-297 integriert hatte. Das agalactosylierte Glykan verstärkt die proinflammatorischen Eigenschaften des IgG. Die Casein-allergischen Muttertiere zeigten ebenfalls eine Tendenz zu einer proinflammatorischen Glykosylierung des IgG, jedoch in einer deutlich geringeren Ausprägung. Das Glykosylierungsmuster spiegelte sich in ihren Nachkommen wider.

Der verstärkte allergische Phänotyp der OVA-OVA-Nachkommen scheint mit der Asthma-Exazerbation des Muttertieres während der Schwangerschaft zusammenzuhängen und ist mit einem erhöhten Anteil an proinflammatorischem IgG, sowohl bei den Muttertieren als auch bei den Nachkommen, assoziiert. Da IgG transplazentar auf den Fetus übertragen werden kann, stellt dies einen möglichen Mediator der maternofetalen Risikoübertragung dar und sollte daher in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

3.2. Abstract in Englisch

It has often been discussed whether maternal bronchial asthma is a risk factor for offspring to also develop allergic asthma. The animal studies conducted so far vary widely in their structure and are not sufficient to fully understand the mechanisms of maternal-fetal risk transmission. This study used a mouse model to investigate the influence of asthma exacerbation during pregnancy on asthma susceptibility of the offspring. Special attention was paid to immunoglobulin G (IgG), which can have a pro- or anti-inflammatory effect on the fetus depending on its glycosylation status.

Female mice were subcutaneously sensitized with either casein (CAS) or ovalbumin (OVA) prior to mating. The control group received a phosphate-buffered saline solution (PBS). Asthma exacerbation during pregnancy was induced by aerosol exposure of the respective allergen or PBS. The same protocol was followed in the offspring, but the allergen OVA was used in all offspring. The asthmatic phenotype was investigated by bronchoalveolar lavage (BAL), histological analysis of lung inflammation and airway reactivity measurements. Similarly, an analysis of serum IgG glycosylation was performed in dams and their allergic offspring.

If the mothers and their offspring were treated with the same allergen (OVA-allergic offspring of OVA-allergic mothers), the offspring showed a higher risk of developing a hyperreactive bronchial system than the offspring of the control group. However, the OVA-allergic offspring of the casein-allergic mothers were treated with a different allergen than the dam and did not show an increased allergic phenotype. While the CAS and OVA mothers did not differ in BAL and lung histology, significant differences were found in their IgG glycosylation. The OVA-allergic mothers as well as their offspring showed high levels of IgG, which did not integrate additional galactose or sialic acid in the glycan of asparagine (Asn)-297. This agalactosylated glycan enhances the proinflammatory properties of IgG. The casein-allergic mothers also showed a tendency towards proinflammatory glycosylation of IgG, but in a significantly lower degree. This was also reflected in their offspring.

The increased allergic phenotype of OVA-OVA offspring seems to be related to the asthma exacerbation of the mother during pregnancy and is associated with an increased level of proinflammatory IgG in both mothers and offspring. Since IgG can be transmitted transplacentally to the fetus, this is a possible mediator of maternal-fetal risk transmission and should therefore be considered in future studies.

4. Manteltext

4.1. Einleitung

Das allergische Asthma bronchiale zählt zu den häufigsten Erkrankungen im Kindesalter und nimmt damit eine wichtige Stellung in unserem Gesundheitssystem ein [1]. Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegserkrankung, die sich häufig bereits in den frühen Lebensjahren manifestiert [1]. Als Leitsymptome sind vor allem Dyspnoe und ausgeprägte Hustenanfälle zu nennen, welche durch Schleimhautödeme, veränderte Mukusproduktion sowie Bronchospasmus verursacht werden [2]. Diese führen zu einer reversiblen Obstruktion der Bronchien [2]. Mögliche Allergene, die als Triggerfaktoren zu einer Bronchialobstruktion führen können, sind z. B. Pollen, Tierhaare oder Hausstaubmilben [3]. Die Ursache, dass asthmatische Patienten im Gegensatz zu gesunden Menschen auf diese ungefährlichen Stoffe allergisch reagieren, ist in der Hyperreagibilität ihres Bronchialsystems begründet [4]. Es ist jedoch bislang nicht vollständig entschlüsselt, welche Mechanismen dazu führen, dass einige Kinder an allergischem Asthma bronchiale erkranken.

Als Ursache für die Krankheitsentstehung werden sowohl eine genetische Prädisposition als auch exogene Umweltfaktoren beschrieben [5–11]. Bisherige Studien an Menschen konnten zeigen, dass das Risiko an Asthma zu erkranken für Kinder erhöht ist, wenn ein Elternteil an Asthma erkrankt ist [5]. Daraus lässt sich auf einen Einfluss der Gene auf das Krankheitsrisiko schließen. Hierbei scheint mütterliches Asthma im Vergleich zum väterlichen Asthma ein höheres Risiko darzustellen [6]. Die Genetik allein erklärt die Krankheitsentstehung jedoch nicht vollständig. Als prä- und postnatale Risikofaktoren gelten z. B. Adipositas der Mutter [7], Nikotinabusus der Eltern [8] sowie erhöhte Serumkonzentrationen von Kortikosteroiden der Mutter während der Schwangerschaft [9]. Untersuchungen zeigen, dass eine Asthma-Exazerbation der Mutter während der Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko einhergeht, dass das Kind ebenfalls an Asthma erkrankt [10]. Eine erfolgreiche Asthma-Kontrolle während der Schwangerschaft senkt hingegen dieses Risiko der Kinder [11]. In dem folgenden Tierversuch mit Mäusen wurde der zuletzt genannte Risikofaktor, die Asthma-Exazerbation während der Schwangerschaft, genauer untersucht.

Asthma bronchiale belastet nicht nur den Alltag und die Lebensführung, sondern auch die körperliche Entwicklung der erkrankten Kinder [12]. Bislang ist nur eine medikamentöse Symptomkontrolle und keine kurative Therapie möglich [13]. Daher ist es wichtig, die Entstehung der Erkrankung zu verstehen, um präventive Strategien weiterzuentwickeln. Dafür sind strukturierte Versuche, die die Einflussfaktoren während der Schwangerschaft und der ersten Lebenszeit hinsichtlich der Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems untersuchen, essentiell. Modelle an Nagetieren haben sich in der Vergangenheit bewährt. Mäuse besitzen eine hohe Reproduktionsrate. Das heißt, sie vermehren sich schnell und zeugen eine hohe Anzahl an Nachkommen. Dies erleichtert insbesondere Versuche über mehrere Generationen. Für immunologische Studien ist es zudem bedeutsam, dass das Immunsystem der Maus bereits in zahlreichen Versuchen untersucht wurde und man über ein ausreichendes Verständnis dahingehend verfügt [14,15]. Außerdem ähnelt das murine Immunsystem dem des Menschen und lässt so eine gewisse Vergleichbarkeit zu [14,15]. Für reproduktive Studien mit Mäusen ist es ebenso wichtig, dass die Plazenta der Maus im Aufbau und ihrer Funktion der menschlichen Plazenta ähnelt [16,17].

Bisher durchgeführte Versuche mit Mäusen, in welchen die Nachkommen pränatal zu einer mütterlichen Asthma-Exazerbation exponiert waren, variierten stark in ihrem Aufbau und führten zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen [18–20]. Es ist entscheidend, ob das Allergen oral oder subkutan verabreicht wird [15,18,21]. Der Zeitpunkt der Allergen-Exposition stellt ebenfalls einen wichtigen Einflussfaktor dar (vor vs. während der Schwangerschaft) [18–20]. Es ist zudem noch nicht klar, inwiefern es einen wesentlichen Einfluss hat, ob die Nachkommen zu dem gleichen oder zu einem anderen Allergen als das Muttertier exponiert werden [18–20]. Daher bleibt die Frage „Ist mütterliches, allergisches Asthma bronchiale ein Risikofaktor für die Nachkommen an allergischem Asthma bronchiale zu erkranken?“ bestehen und wird im Rahmen des nachfolgenden Versuchs untersucht.

Die Asthma-Exazerbation wurde in diesem Modell bewusst während und nicht vor der Schwangerschaft durchgeführt, da in Studien mit Menschen bereits beschrieben wurde, dass dies den größeren klinischen Effekt auf die Kinder hat [10]. Die Sensibilisierung erfolgte mittels subkutaner Injektion, da eine vorab durchgeführte Literaturrecherche widersprüchliche Ergebnisse bei einer oralen Allergen-Gabe zeigte und die Bedeutung

des intestinalen Immunsystems für die Entstehung allergischer Krankheiten noch nicht vollständig entschlüsselt ist [22,23].

In dem durchgeführten Maus-Modell wurden in einer Gruppe die Muttertiere und ihre Nachkommen mit dem gleichen Allergen (Ovalbumin) sensibilisiert. In einer weiteren Gruppe wurden verschiedene Allergene verwendet; während die Muttertiere zu Casein exponiert waren, wurden die Nachkommen nach der Geburt mit Ovalbumin sensibilisiert. Dies erlaubt es, zu evaluieren, inwiefern es für die mögliche Risikoübertragung entscheidend ist, ob beide Generationen mit dem gleichen oder einem unterschiedlichen Allergen sensibilisiert werden.

Während einer Asthma-Exazerbation der Mutter in der Schwangerschaft ändert sich ihr immunologisches und inflammatorisches Milieu [2,24]. Unter anderem können sich die Zytokin-Konzentrationen im Blut verändern [2,24]. Die meisten Patienten mit Asthma zeigen den sogenannten „Type-2-high“-Phänotyp, welcher sich mit einer erhöhten Konzentration von Zytokinen präsentiert, die von T-Helferzellen Typ 2 ausgeschüttet werden [2,24]. Dazu zählen zum Beispiel die Interleukine (IL) 4, 5 und 13 [2,24]. Außerdem steigt die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IL-1 β [2]. Der Transport von Zytokinen über die Plazenta ist zwischen Mensch und Maus verschieden [24]. Insbesondere für IL-4 und IL-13 konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine die Plazenta nicht überqueren können [24,25]. Sie können daher nur indirekt über eine veränderte Sekretion der Plazenta auf den Fetus einwirken [24,25]. Andere Mediatoren hingegen sind plazentagängig und können direkt auf die Entwicklung des Fetus Einfluss nehmen. Dies trifft unter anderem auf das Immunglobulin G (IgG) zu [26].

IgG wird während der Schwangerschaft von der Mutter auf das Kind übertragen und soll es auch nach der Schwangerschaft vor Infektionen schützen [26]. IgG kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken [27]. Dies ist abhängig von der Glykosylierung der Aminosäure Asparagin (Asn)-297 in der Fc-Region (Fc: engl. fragment crystallizable; kristallines Fragment) des Immunglobulins [27]. Asn-297 befindet sich beidseits in der Fc-Region der schweren Ketten des Antikörpers und ist über eine N-glykosidische Bindung mit einem Glykan verbunden [27]. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, besteht die Basis des Glykans aus zwei aufeinander folgenden N-Acetylglucosamin-Molekülen und

drei Mannose-Molekülen, an deren zwei Enden wiederum jeweils ein N-Acetylglucosamin gebunden ist [27]. Diese Basis wird als „G0“ bezeichnet [27]. Das Grundgerüst kann modifiziert werden, indem an die Enden zusätzlich Galactose (G)-Moleküle und an diese wiederum Sialinsäuren (S) gebunden werden [27]. Ebenso kann an das proximale N-Acetylglucosamin ein Fucose-Rest hinzugefügt werden [27]. Je nach Anzahl der Galactose- oder Sialinsäure-Reste wird das Glykan zum Beispiel mit G1S1, G2S1, G3S1 oder G2S2 abgekürzt [27]. Da sich der Glykan-Komplex in der konstanten Region des Immunglobulins befindet, verändert die zusätzliche Integration von Galactose und Sialinsäure die Bindungsaffinität des Antikörpers an seine Rezeptoren und verstärkt die antiinflammatorischen Eigenschaften des Antikörpers [27]. Ein agalactosyliertes N-Glykan (G0) verstärkt hingegen die proinflammatorische Wirkung des IgG [27].

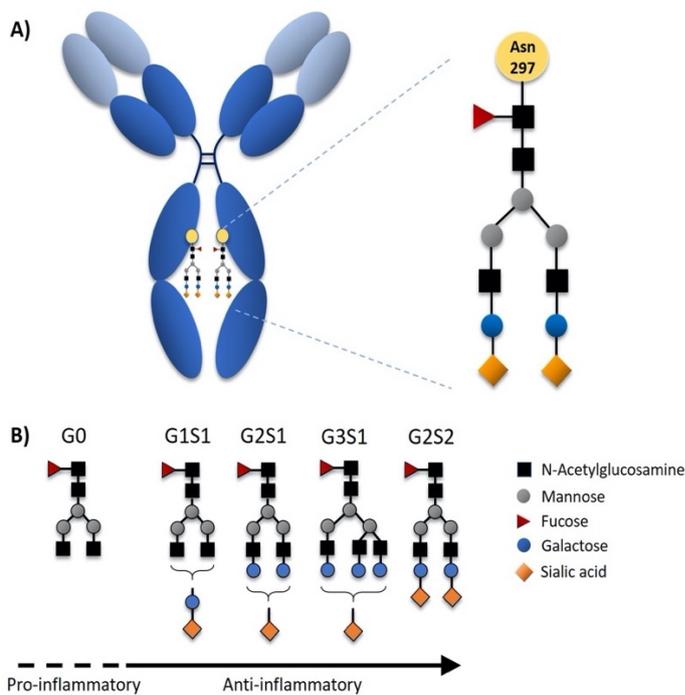


Abbildung 1: Schematische Darstellung der IgG-Glykosylierung. (A) IgG-Molekül (links); hervorgehoben sind die zwei N-Glykane, welche an das Asn-297 der Fc-Region des Immunglobulins gebunden sind; das vergrößerte Glykan-Molekül (rechts) bestehend aus insgesamt vier N-Acetylglucosamin-Molekülen (schwarz) und drei Mannose-Molekülen (grau). Die Basis kann durch das Hinzufügen von Fucose (rot), Galactose (blau) oder Sialinsäure (orange) verändert werden. (B) Verschiedene Varianten des N-Glykans; proinflammatorisch wirkendes Glykan ohne Galactose oder Sialinsäure (G0); antiinflammatorisch wirkende Glykane mit einer unterschiedlichen Anzahl von Galactose- und Sialinsäure-Molekülen (G1S1, G2S1, G3S1, G2S2). [28]

In Studien mit Menschen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Exazerbation von Autoimmunerkrankungen wie bei der rheumatoiden Arthritis oder dem systemischen Lupus erythematoses mit einer erhöhten Konzentration von proinflammatorischem, agalactosyliertem IgG (G0) und einer verminderten Konzentration von antiinflammatorischem, sialyliertem IgG einhergeht [29,30]. Bei diesen Erkrankungen kann in schweren Fällen eine intravenöse Immunglobulin (IVIG)-Therapie zum Einsatz kommen [31]. Der antiinflammatorische Effekt der IVIG-Therapie ist abhängig von der Glykosylierung der Antikörper [31]. Während galactosylierte und sialylierte Immunglobuline eine therapeutische Wirkung zeigen, reduziert sich der antiinflammatorische Effekt beim Einsatz von agalactosyliertem IgG [31]. Nicht nur bei Autoimmunerkrankungen lässt sich die unterschiedliche Wirkung des IgG in Abhängigkeit von seiner Glykosylierung feststellen. Auch in Bezug auf allergische Erkrankungen zeigte eine Studie, dass bei einer spezifischen Immuntherapie (Hyposensibilisierung) eine erfolgreiche Toleranz-Entwicklung gegenüber dem Allergen mit einer erhöhten Konzentration von sialyliertem Allergen-spezifischem IgG einhergeht [32].

Da das mütterliche IgG die Plazenta überqueren und direkt auf den Fetus und seine Entwicklung einwirken kann [26], ist es wichtig, die Glykosylierung des IgG genauer zu untersuchen. In Abhängigkeit von seinen pro- oder antiinflammatorischen Eigenschaften könnte das IgG entscheidend zu der Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems beitragen. Daher wurde im folgenden Maus-Modell der Fragestellung „Ist mütterliches, allergisches Asthma bronchiale ein Risikofaktor für die Nachkommen an allergischem Asthma bronchiale zu erkranken?“ nachgegangen und der Fokus dabei auf den Glykosylierungsstatus des IgG gelegt, um die IgG-Glykosylierung als möglichen Einflussfaktor auf die Asthma-Anfälligkeit der Nachkommen zu evaluieren.

4.2. Methodik

4.2.1. Aufbau des Tierversuchs

Die deutschen und internationalen Richtlinien für Versuche mit Mäusen wurden eingehalten und die Genehmigung vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin lag vor (G0266-13 und G0096-17). Das Protokoll des Tierversuchs ist in Abbildung 2A dargestellt. Die acht Wochen alten, weiblichen BALB/c-Mäuse (Janvier Labs, Frankreich) wurden dreimal im Abstand von jeweils einer Woche sensibilisiert. Dies erfolgte durch

eine subkutane Injektion von 10 µg Casein (CAS – Merck KGaA) oder Ovalbumin (OVA – Merck KGaA) gelöst in 200 µL phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). Die Kontrollgruppe erhielt PBS ohne Zusatz eines Allergens. Im Alter von 80 Tagen wurden die Weibchen gepaart. Die Männchen wurden nicht sensibilisiert. Während der Verpaarungszeit wurden die Weibchen jeden Morgen untersucht. Fand man einen Schleimpfropf in der Vagina, ging man von einer Verpaarung während der Nacht aus. Dieser Tag wurde als erster Schwangerschaftstag (GD0, GD: engl. gestation day) dokumentiert.

Um eine Asthma-Exazerbation auszulösen, wurden die Muttertiere während der Schwangerschaft jeden zweiten Tag von GD6-GD16 für 20 Minuten zu einem Aerosol exponiert, welches 1% CAS oder 1% OVA enthielt. Die Kontrollgruppe wurde einem reinen PBS-Aerosol ausgesetzt. Nach der Geburt verblieben die Nachkommen bei den Muttertieren und konnten gesäugt werden. 21 Tage nach der Geburt wurde das Muttertier von den Nachkommen separiert. Zehn Tage später wurde erneut mit Casein-, Ovalbumin- oder reinem PBS-Aerosol eine Asthma-Exazerbation in den Muttertieren ausgelöst, nun jedoch an drei aufeinander folgenden Tagen. 24 Stunden später wurden sie euthanasiert und die Proben entnommen.

Um das Asthma in den Nachkommen zu induzieren, wurde nach dem gleichen Protokoll vorgegangen wie bei den Muttertieren. Die Sensibilisierungen erfolgten im Abstand von einer Woche im Alter von 21, 28 und 35 Tagen durch eine subkutane Injektion von Ovalbumin gelöst in 200 µL PBS. Die Asthma-Exazerbation wurde durch die 20-minütige Exposition zu einem 1%-igem OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen im Alter von 46, 47 und 48 Tagen induziert.

Die Muttertiere wurden in drei Gruppen eingeteilt und dementsprechend mit Casein, Ovalbumin oder PBS („Sham“/Kontrollgruppe) sensibilisiert (Abb. 2B). Bei allen Nachkommen wurde das Allergen Ovalbumin angewandt. Daraus resultierten drei verschiedene Gruppen an Nachkommen. Eine Gruppe von Nachkommen wurde mit dem gleichen Allergen behandelt wie das Muttertier (OVA-OVA-Gruppe), in einer weiteren Gruppe wurden Muttertier und Nachkommen mit verschiedenen Allergenen sensibilisiert (CAS-OVA-Gruppe). Als Kontrollgruppe dienten die OVA-allergischen Nachkommen von nicht-allergischen Muttertieren (PBS-OVA-Gruppe).

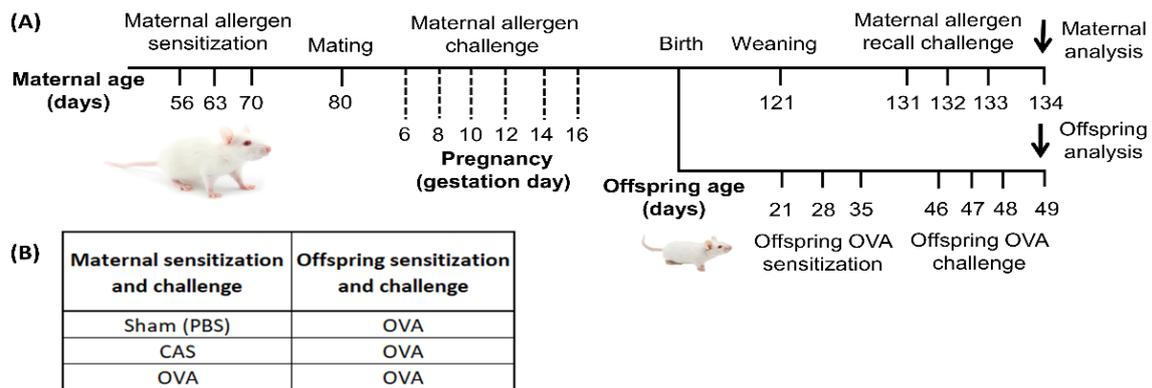


Abbildung 2: Aufbau des Tierversuchs. (A) Protokoll des Maus-Modells. Muttertiere: Die weiblichen Mäuse wurden vor der Verpaarung im Alter von 56, 63 und 70 Tagen subkutan mit Casein oder Ovalbumin sensibilisiert. Die Kontrollgruppe erhielt PBS. Eine Aerosol-Exposition mit entsprechend Casein, Ovalbumin oder PBS fand vom 6. bis zum 16. Tag während der Schwangerschaft jeden zweiten Tag statt. Die Mütter wurden zehn Tage nach der Trennung von den Nachkommen erneut der Aerosol-Exposition ausgesetzt, diesmal an drei aufeinander folgenden Tagen. 24 Stunden später erfolgte die Probenentnahme. Nachkommen: Die Nachkommen wurden im Alter von 21 Tagen von der Mutter getrennt. Es erfolgte eine dreimalige subkutane Sensibilisierung mit OVA im Alter von 21, 28 und 35 Tagen. Die Aerosol-Exposition fand am 46., 47. und 48. Lebenstag statt. Ein Tag später wurden die Proben entnommen. (B) Übersicht der Gruppenaufteilung. Die Muttertiere wurden mit CAS, OVA oder PBS („Sham“/Kontrollgruppe) sensibilisiert. Alle Nachkommen wurden mit OVA behandelt. [28]

4.2.2. Blutgewinnung

24 Stunden nach der letzten Aerosol-Exposition wurden die Blut- und Gewebeprobe von den Mäusen entnommen. Dazu wurde ihnen eine tödliche Dosis Ketamin subkutan verabreicht. Die Blutproben wurden über den orbitalen Sinus entnommen.

4.2.3. Bronchoalveoläre Lavage, differenzierte Zellzählung und Zytokine

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde eine Kanüle über die Trachea der euthanasierten Tiere eingeführt und im Sinne einer bronchoalveolären Lavage (BAL) 1 mL PBS vermischt mit Protease-Inhibitoren (Hoffmann-La Roche) langsam in die Lunge appliziert und anschließend wieder abgesaugt. Die Proben wurden nach der Entnahme bis zur Weiterverarbeitung im Labor auf Eis gelagert. Im Labor wurden sie zehn Minuten bei 4 °C und 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 1 mL PBS + 1% BSA (Bovines Serumalbumin) resuspendiert. 10 µL der Zellsuspension wurden mit 10 µL Trypanblau vermengt. Im Anschluss wurde die Anzahl der Leukozyten unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die totale Leukozytenzahl berechnet.

Weitere 100 µL der Zellsuspension wurden mit 300 µL PBS + 1% BSA verdünnt und für die Anfertigung der Cytospins verwendet. Dafür wurde die Zentrifuge Cellspin I (Tharmac) benutzt. Zunächst wurden 100 µL PBS + 1 % BSA über den Trichter eingefüllt, um den Filter zu befeuchten. Es folgte eine Zentrifugation bei 800 rpm (engl. revolutions per minute; „Umdrehungen pro Minute“) für eine Minute. Anschließend wurden 200 µL der verdünnten BAL-Probe in den Trichter gegeben und bei 700 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die Objektträger wurden vorsichtig entnommen und konnten in der Nacht trocknen. Am nächsten Tag wurden mittels eines Differential Quik Stain Kits (Merz & Dade) die Cytospins angefertigt. Anhand morphologischer Kriterien wurden die Zelltypen (Eosinophile, Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophile) differenziert gezählt. Der Zähler war verblindet und zählte insgesamt pro Cytospin 200 Zellen.

In dem Überstand der BAL-Proben der Nachkommen wurden zusätzlich die Konzentrationen folgender Zytokine gemessen: IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, Eotaxin, KC (engl. keratinocyte chemoattractant), MCP (engl. monocyte chemoattractant protein)-1 und TNF- α . Dafür wurde ein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet und die Anweisungen des Herstellers befolgt.

4.2.4. Lungenhistologie

Direkt im Anschluss an die BAL wurde 1 mL 4%-iges Formalin über die Kanüle in die Lunge gespritzt. Die Kanüle wurde entnommen, die Trachea mittels eines Fadens verschlossen und die Lunge in Formalin eingelegt. Im Labor wurde das Lungengewebe in Paraffin eingebettet, in 4 µm dünne Schichten geschnitten, mittels Periodsäure-Schiff- (PAS: engl. periodic acid-Schiff)-Reaktion angefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht. Der Zähler verwendete die „new Computer Assisted Stereological Toolbox“ („newCAST“ – Visiopharm GmbH) und war verblindet hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Proben. In Abhängigkeit von der Leukozytenzahl wurde für jede Lunge ein Inflammationsscore (PI: engl. point of inflammation) berechnet (Anzahl der Leukozyten pro Quadratmillimeter).

4.2.5. FoxP3-Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung wurde das Lungengewebe mittels Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS: engl. tris-buffered saline) gewaschen und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3%-igem Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit 5%-igem Serum und im Anschluss eine Inkubation mit den primären Anti-FoxP3-Antikörpern (eBioscience) bei 4 °C über Nacht. Die Lungenproben wurden erneut gewaschen und mit einem Biotin-markierten, sekundären Antikörper (Vector Laboratories) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Signal wurde mittels eines Substrat Kits von Agilent (DAB + Substrate Chromogen System) erfasst.

4.2.6. Antikörperkonzentration

Die Blutproben wurden bei 2000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert und das Serum wurde genutzt, um mittels ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay; Enzymimmunoassay) die Antikörperkonzentrationen zu bestimmen. Die ELISA-Platte (MaxiSorp flat bottom 96-well – Sigma-Aldrich) wurde mit 20 µg/mL OVA bzw. Casein gelöst in Natriumhydrogencarbonat-Puffer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Bei der Messung der Gesamt-IgG1-Konzentration wurde die Platte mit 0,5 mg/mL Antikörpern gegen murines IgG1 beschichtet. Nach dem Waschen wurde der Platte PBS + 1% BSA hinzugefügt. Zwei Stunden später wurde erneut gewaschen und die Serum-Proben der Mäuse wurden dazugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde nach dem Waschen entweder ein Antikörper gegen murines Immunglobulin E (IgE) (BD Pharmingen) oder IgG1 (Sigma-Aldrich) hinzugefügt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte 30 Minuten mit Streptavidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich) inkubiert und die chemische Reaktion wurde mit 2-molarer Schwefelsäure gestoppt. Die Farbentwicklung wurde mit einem Microplate Reader von Bio-Rad bei 450 nm ausgelesen.

Die OVA-spezifischen Antikörper (OVA-spezifisches IgG1 und OVA-spezifisches IgE) und die Gesamt-IgG1-Konzentration wurden durch den Vergleich zu einer Normkurve bestimmt und in ng/mL angegeben. Da für die Konzentration der CAS-spezifischen Antikörper (CAS-spezifisches IgG1 und CAS-spezifisches IgE) noch keine Normkurve verfügbar ist, wurde diese in OD (engl. Optical Density; Optische Dichte) 450 nm angegeben.

4.2.7. Analyse der IgG-Glykosylierung

Für die Analyse der N-Glykan-Struktur am Asparagin-297 der murinen Antikörper IgG1 und IgG3 wurde die Firma Genos Glyco (Kroatien) beauftragt. Es wurden jeweils 15 µL der Serum-Proben mit in PBS gelöstem Protein G versetzt und so das IgG gebunden. Dafür wurde die Mischung 1,5 h geschüttelt und im Anschluss siebenmal mit 1,5 mL PBS gewaschen. Das IgG wurde mit 100 µL einer 100 mmol/L Ameisensäure eluiert. Das erhaltene Eluat wurde 2 h in einem Vakuumkonzentrator bei 60 °C getrocknet. Das IgG wurde anschließend in 40 µL 25 mmol/L Ammoniumbicarbonat gelöst und mit 0,2 µg Trypsin („Sequencing Grade Modified Trypsin“, Promega) versetzt. Diese Proben wurden über 18 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Glykopeptide wurden unter Verwendung von C18-Kügelchen aufgereinigt, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 40 µL Reinstwasser erneut gelöst. Für die nachfolgende Nano-LC-ESI-Qq-TOF-Analyse wurden 5 µL jeder Probe verwendet. Die Auftrennung erfolgte hierbei mittels einer C18 nano-LC Säule. Für die Analyse wurden die Daten zunächst mit ProteoWizard msConvert in das .mzXML-Format konvertiert und mit der Software „LaCy Tools“ ausgewertet. Die Peakflächen der Glykopeptide von zweifach und dreifach geladenen Ionen wurden summiert und im Verhältnis zu der Gesamt-Peak-Fläche für jede Subklasse normiert.

4.2.8. Messung des Atemwegswiderstandes

In den Nachkommen wurde zusätzlich der Atemwegswiderstand (R_n) gemessen. Zehn Nachkommen von jeder der drei Gruppen wurden im Anschluss an die Sensibilisierung nach Belgien in das Labor von Prof. Didier Cataldo, University of Liège, versandt. Dort wurde nach dem gleichen Protokoll eine Allergen-Provokation durchgeführt. Es erfolgte eine dreimalige Aerosol-Exposition, um eine Asthma-Exazerbation zu induzieren und einen Tag später die Messung des Atemwegswiderstandes. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus 10 mg/mL Ketamin (Merial) und 1 mg/mL Xylazin (VMD Livestock) anästhesiert und über die Trachea intubiert und beatmet. In aufsteigender Dosierung (0; 1,25; 2,5; 5; 10 und 20 g/L) inhalierten die Mäuse ein Metacholin-Aerosol und der Atemwegswiderstand wurde bestimmt.

4.2.9. Statistische Analyse

Alle Proben wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Während für die parametrischen Daten die einfaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) verwendet wurde, sind die nicht-parametrischen Daten unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests gefolgt vom Dunnet's Test (multipler Vergleichstest) analysiert worden. Die Daten der Atemwegswiderstandsmessung wurden für jede Metacholindosis mittels zweifaktorieller Varianzanalyse verglichen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM: engl. standard error of the mean) dargestellt. Für die Korrelationsanalyse wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient r berechnet und als P -Wert angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit der Software „GraphPad Prism“ (Version 8, GraphPad Software, Inc.).

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Inflammatorisches Profil der OVA- und CAS-allergischen Muttertiere

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, zeigten die OVA- und Casein-exponierten Muttertiere einen allergischen Phänotyp im Gegensatz zu der PBS-Kontrollgruppe. OVA-spezifisches IgG1 und OVA-spezifisches IgE waren in den OVA-allergischen Muttertieren erhöht, während CAS-spezifisches IgG1 und CAS-spezifisches IgE in den CAS-allergischen Muttertieren erhöht waren (Abb. 3A). Die CAS- und OVA-allergischen Mäuse wiesen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe eine Entzündungsreaktion der Bronchien und Alveolen auf, welche sich durch eine erhöhte Konzentration von Entzündungszellen in der BAL darstellte (Abb. 3B). Sowohl die totale Leukozytenzahl als auch die Konzentration von Eosinophilen und Lymphozyten waren in der BAL der allergischen Muttertiere erhöht. Die OVA-allergischen Mäuse zeigten zusätzlich eine erhöhte Konzentration von Makrophagen in der BAL. Die Ergebnisse der BAL-Proben zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der OVA- und der CAS-Gruppe. In dem Lungengewebe der Muttertiere war der Inflammationsscore (Anzahl der Leukozyten pro Quadratmillimeter) in den OVA- und CAS-allergischen Mäusen im Gegensatz zu der PBS-Gruppe erhöht (Abb. 3C,D). Die Ergebnisse der Lungenhistologie zeigten ebenfalls keinen wesentlichen Unterschied zwischen den CAS- und den OVA-allergischen Muttertieren, sodass insgesamt von einem ähnlichen inflammatorischen Profil der zwei allergischen Gruppen gesprochen werden kann.

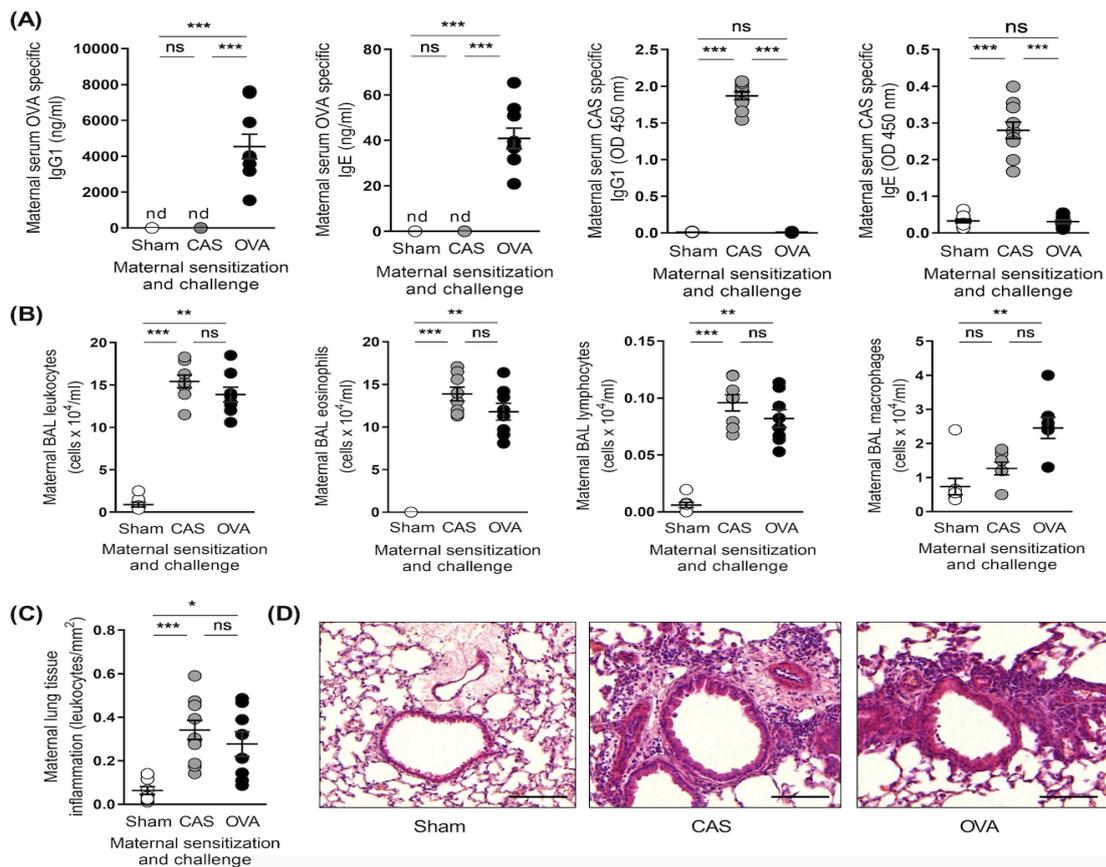


Abbildung 3: Inflammatorisches Profil der Muttertiere. (A) Antikörperkonzentration im Serum: OVA-spezifisches IgG1, OVA-spezifisches IgE, CAS-spezifisches IgG1 und CAS-spezifisches IgE. (B) Konzentration von Leukozyten, Eosinophilen, Lymphozyten und Makrophagen in der BAL. (C) Inflammationsscore in der Lungenhistologie. (D) Beispielhafte Abbildungen der Lungenhistologie aus jeder Gruppe (PBS, CAS und OVA). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm. nd = nicht detektierbar, ns = nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. n ≥ 8 pro Gruppe. Die Signifikanz wird durch * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ oder *** $P < 0,001$ dargestellt. [28]

4.3.2. Inflammatorisches Profil der OVA-allergischen Nachkommen

Die drei Gruppen von Nachkommen (PBS-OVA-Nachkommen, CAS-OVA-Nachkommen und OVA-OVA-Nachkommen) zeigten unterschiedliche Konzentrationen der Antikörper im Serum (Abb. 4A). Die CAS-OVA Nachkommen wiesen eine erhöhte Konzentration des Gesamt-IgG1 und des OVA-spezifischen IgG1 auf. In den OVA-OVA-Nachkommen war das OVA-spezifische IgG1 ebenfalls erhöht, allerdings weniger stark ausgeprägt als in der CAS-OVA-Gruppe. Das Gesamt-IgG1 der OVA-OVA-Nachkommen unterschied sich hingegen nicht signifikant von der Kontrollgruppe (PBS-OVA-Nachkommen). Zusätzlich zeigten die Nachkommen in der OVA-OVA-Gruppe eine verminderte Konzentration von OVA-spezifischem IgE, während sich die CAS-OVA-Gruppe und die Kontrollgruppe dahingehend nicht unterschieden.

Neben den Antikörpern im Serum wurde die BAL hinsichtlich einer Entzündungsreaktion in den Bronchien und Alveolen untersucht. Es konnte eine erhöhte Konzentration von Leukozyten in der BAL nachgewiesen werden, wenn Muttertier und Nachkommen mit dem gleichen Allergen sensibilisiert wurden (OVA-OVA-Gruppe) (Abb. 4B). Die differenzierte Zellzählung ergab signifikant erhöhte Konzentrationen von Eosinophilen, Lymphozyten und Makrophagen in der BAL der OVA-OVA-Nachkommen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Wurden Muttertier und Nachkommen mit unterschiedlichen Allergenen behandelt, zeigten die Nachkommen (CAS-OVA-Gruppe) keinen signifikanten Unterschied in der BAL im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Übereinstimmend mit den erhöhten Konzentrationen an Entzündungszellen in der BAL war in dem Lungen- und Lymphknotengewebe der OVA-OVA-Nachkommen FoxP3 als Marker für regulatorische T-Zellen vermindert (Abb. 4C,D). Dieser Effekt ließ sich wiederum nicht beobachten, wenn Muttertier und Nachkommen mit verschiedenen Allergenen behandelt wurden (CAS-OVA-Nachkommen). Obwohl es Unterschiede in den Antikörperkonzentrationen im Serum, in der differenzierten Zellzählung der BAL und dem FoxP3-Besatz in dem Lungen- und Lymphknotengewebe gab, unterschieden sich die Nachkommen nicht hinsichtlich ihres Inflammationsscores in der Lungenhistologie (Abb. 5A,B). Ebenso zeigte die Messung des Atemwegswiderstandes keinen Unterschied zwischen den drei Gruppen der Nachkommen (Abb. 5C).

Wie in Tabelle 1 dargestellt, wurde in den OVA-allergischen Nachkommen auch die Zytokin-Konzentrationen in der BAL gemessen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (PBS-OVA-Nachkommen) waren in den CAS-OVA-Nachkommen die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α vermindert und die Konzentration von KC erhöht. Die OVA-OVA-Nachkommen zeigten eine wesentlich stärkere Veränderung ihrer Zytokin-Spiegel im Vergleich zu der Kontrollgruppe. In dieser Gruppe waren die Konzentrationen von IL-1 β , IL-4, IL-12p70, Eotaxin, MCP-1 und TNF- α reduziert, während IL-6 und KC erhöhte Spiegel aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nachkommen der OVA-OVA-Gruppe einen deutlich allergischen Phänotyp aufwiesen, welcher sich durch eine erhöhte Konzentration an Entzündungszellen in der BAL und eine Verminderung der regulatorischen T-Zellen im Lungen- und Lymphknotengewebe quantifizieren ließ. Diese Veränderungen konnten in den CAS-OVA-Nachkommen nicht beobachtet werden.

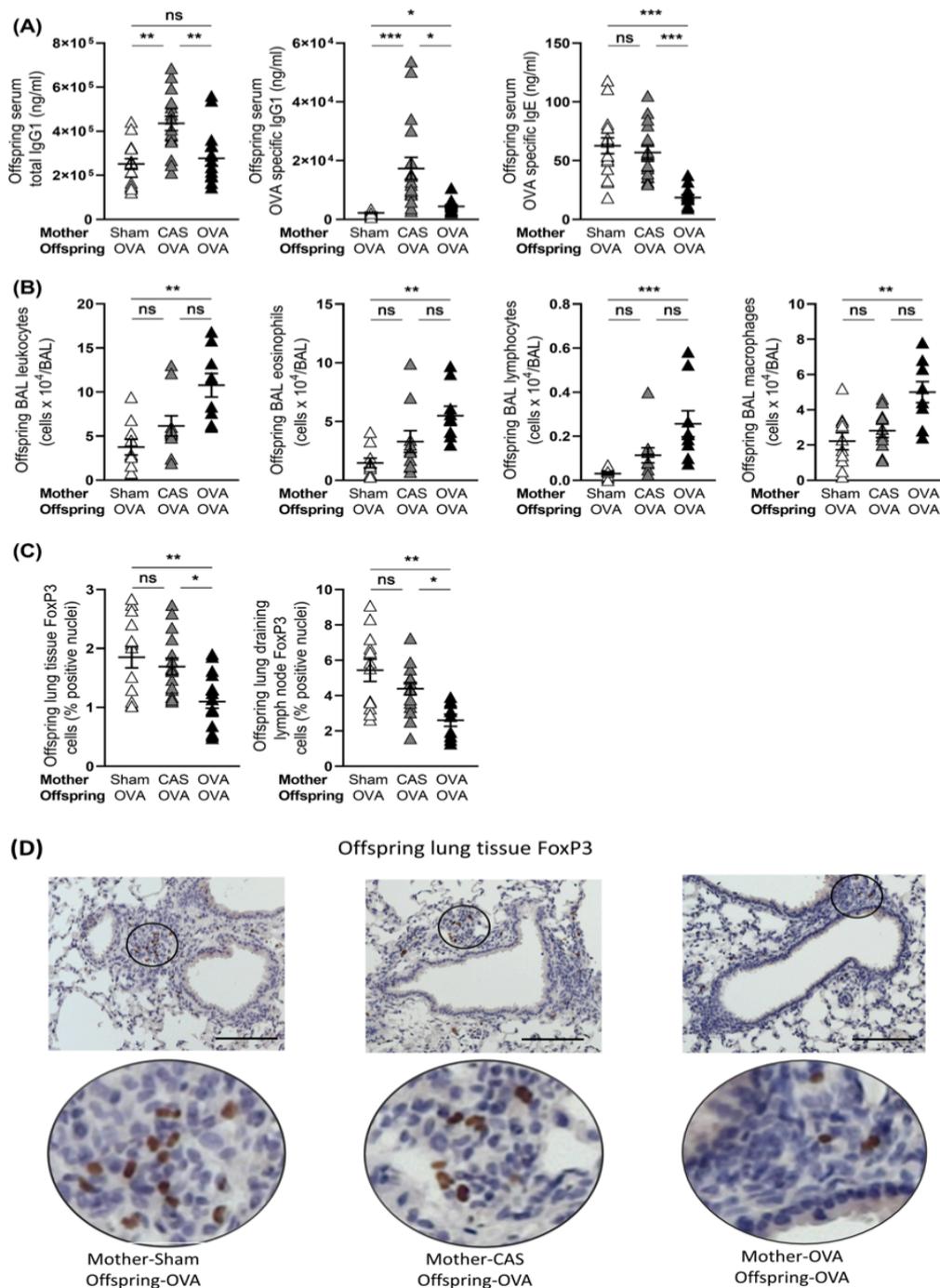


Abbildung 4: Inflammatorisches Profil der Nachkommen (A) Antikörperkonzentration im Serum: Gesamt-IgG1, OVA-spezifisches IgG1 und OVA-spezifisches IgE. (B) Konzentration von Leukozyten, Eosinophilen, Lymphozyten und Makrophagen in der BAL. (C) Quantifizierung von FoxP3 in dem Lungen- und Lymphknotengewebe. (D) Beispielhafte Abbildungen der Lungenimmunhistochemie aus jeder Gruppe (PBS-OVA, CAS-OVA und OVA-OVA). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm. ns = nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. Sham/PBS-OVA: n = 16, CAS-OVA: n = 17, OVA-OVA: n = 15. In jede Gruppe wurden mindestens zwei Nachkommen von mindestens sechs verschiedenen Müttern eingeschlossen. Die Signifikanz wird durch * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ oder *** $P < 0,001$ dargestellt. [28]

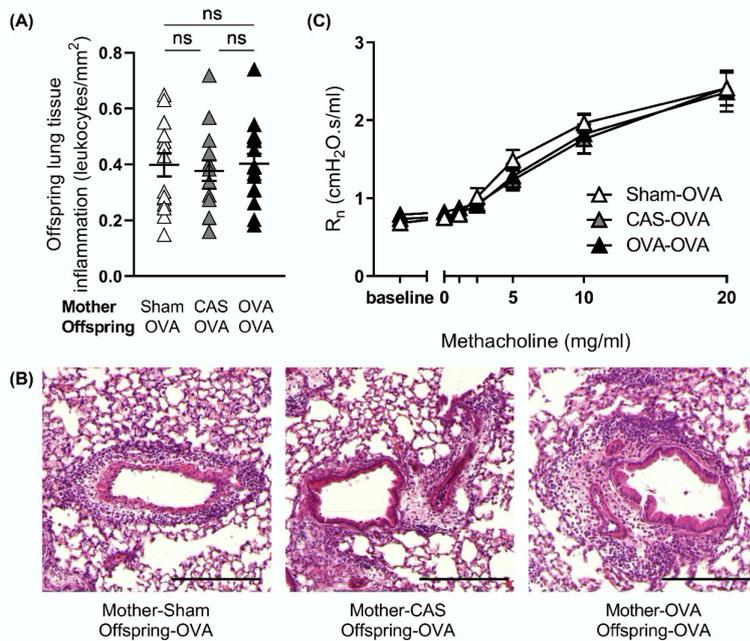


Abbildung 5: Ergebnisse der Lungenhistologie und der Atemwegswiderstandsmessung in den Nachkommen (A) Inflammationscore in der Lungenhistologie; Sham/PBS-OVA: n = 16, CAS-OVA: n = 17 und OVA-OVA: n = 15. ns = nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. (B) Beispielhafte Abbildungen der Lungenhistologie. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (C) Ergebnisse der Atemwegswiderstandsmessung; n = 10 pro Gruppe. [28]

Tabelle 1: Zytokine in der BAL der OVA-allergischen Nachkommen

Zytokin	PBS-OVA		CAS-OVA		OVA-OVA	
	Mittelwert	(SEM)	Mittelwert	(SEM)	Mittelwert	(SEM)
IL-1 β	20,1	(2,0)	13,5	(1,7)* \downarrow	12,4	(1,5)** \downarrow
IL-4	47,7	(9,6)	45,6	(9,2)	19,2	(7,9)* \downarrow
IL-5	94,5	(10,4)	75,5	(10,7)	75,9	(8,8)
IL-6	3,9	(0,9)	9,9	(2,6)	14,1	(4,5)* \uparrow
IL-10	6,5	(1,0)	6,6	(1,1)	5,4	(0,91)
IL-12p40	33,5	(3,2)	41,0	(5,5)	42,0	(5,0)
IL-12p70	6,9	(0,77)	5,0	(0,63)	3,4	(0,73)* \downarrow
IL-13	141,3	(15,0)	115,4	(17,4)	113,1	(10,1)
Eotaxin	105,3	(10,8)	62,0	(12,4)	11,0	(7,4)*** \downarrow
KC	153,3	(20,4)	316,2	(49,4)* \uparrow	335,1	(49,3)** \uparrow
MCP-1	14,6	(2,7)	11,2	(3,0)	6,6	(2,0)* \downarrow
TNF- α	11,0	(1,3)	7,0	(0,87)* \downarrow	5,4	(0,77)*** \downarrow

Gemessen wurde die Konzentration (in pg/ml) von IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, Eotaxin, KC, MCP-1 und TNF- α . Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. PBS-OVA: n = 15, CAS-OVA: n = 18, OVA-OVA: n = 15. Die Signifikanz wird durch * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ oder *** $P < 0,001$ dargestellt. „Pfeil nach unten“ = Konzentration ist signifikant reduziert im Vergleich zu der Kontrollgruppe, „Pfeil nach oben“ = Konzentration ist signifikant erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

4.3.3. IgG1- und IgG3-Glykosylierung der Muttertiere

Obwohl die OVA- und CAS-allergischen Muttertiere einen ähnlichen allergischen Phänotyp zeigten, unterschieden sie sich signifikant in ihrer IgG-Glykosylierung. Es erfolgte eine Analyse des N-Glykans am Asn-297 im IgG1 und IgG3, welches in Abhängigkeit von Galactose und Sialinsäure die pro- oder antiinflammatorischen Eigenschaften des Immunglobulins verstärkt [27] und so die Entwicklung und Asthma-Suszeptibilität des Fetus ebenfalls beeinflussen könnte.

In den OVA-allergischen Muttertieren zeigte die Analyse des IgG1 signifikant mehr proinflammatorisches G0 verglichen mit der CAS-Gruppe (Abb. 6A). Eine Integration von Sialinsäure in das N-Glykan ist mit verstärkten antiinflammatorischen Eigenschaften verbunden und eine verminderte Sialylierung ist mit einem proinflammatorischen Phänotyp assoziiert [27]. In der Analyse des IgG1 der OVA-allergischen Muttertiere sind die antiinflammatorischen, sialylierten Glykane (G1S1, G2S1, G3S1 und G2S2) vermindert. In der IgG3-Analyse zeigte sich bei den OVA-allergischen Mäusen kein Unterschied zu den anderen Gruppen hinsichtlich G0 (Abb. 6B). Das antiinflammatorische G1S1 und G2S1 des IgG3 war jedoch ebenfalls vermindert im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 6B). So kann in der OVA-Gruppe der Muttertiere insgesamt von einem deutlich proinflammatorischen Phänotyp der IgG1- und IgG3-Glykosylierung gesprochen werden.

In den CAS-allergischen Muttertieren unterschied sich in der IgG1-Analyse das G0 nicht von der Kontrollgruppe (Abb. 6A). Dennoch zeigte diese Gruppe an Muttertieren ebenfalls einen reduzierten Anteil an sialyliertem IgG1, allerdings in einer geringeren Ausprägung als in den OVA-allergischen Muttertieren. In der CAS-Gruppe waren lediglich G3S1 und G2S2 signifikant vermindert. G1S1 und G2S1 unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe. Die IgG3-Glykosylierung zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede verglichen zu der PBS-Gruppe (Abb. 6B). Zusammengefasst wiesen die CAS-allergischen Muttertiere ebenfalls eine Tendenz zu einem proinflammatorischen Glykosylierungsprofil auf, allerdings in einem deutlich geringeren Maße als die OVA-allergischen Muttertiere.

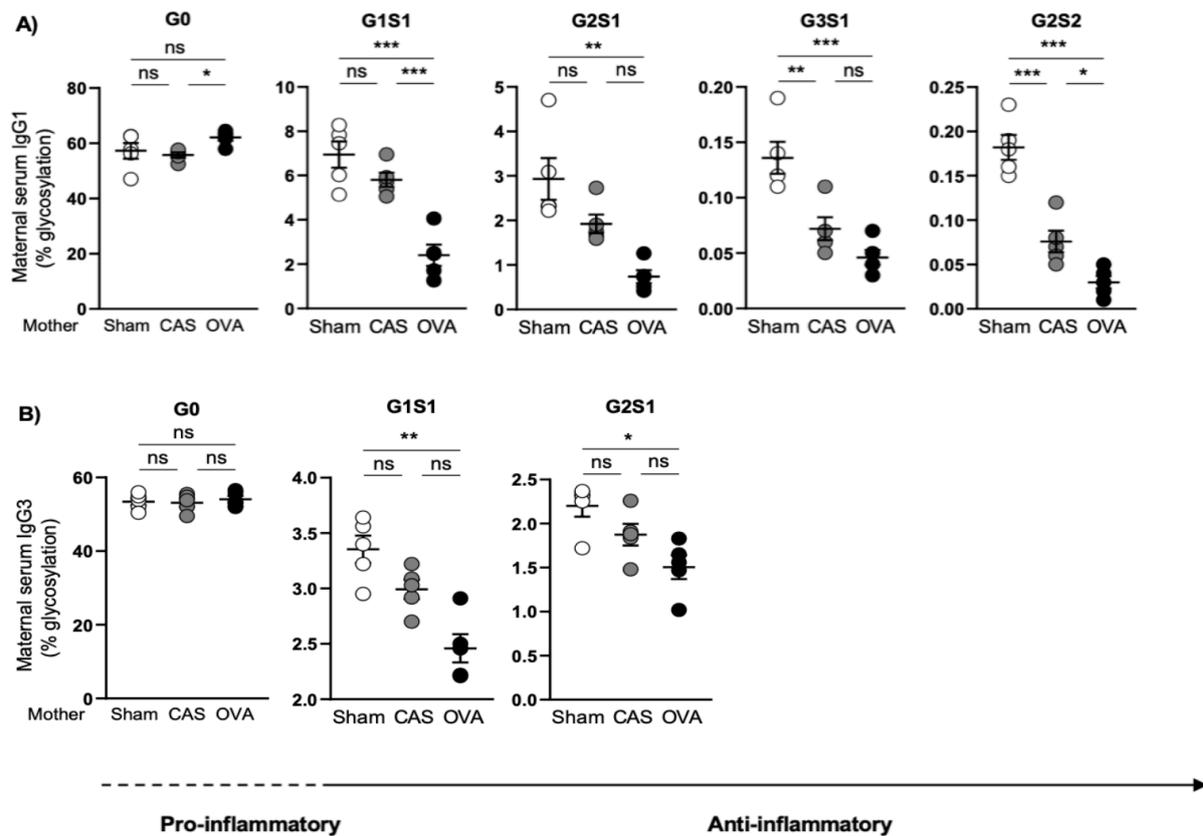


Abbildung 6: Analyse der IgG1- und IgG3-Glykosylierung im Serum der Muttertiere. (A) IgG1-Glykosylierungsprofil. (B) IgG3-Glykosylierungsprofil. ns = nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $n = 5$ pro Gruppe. Die Signifikanz wird durch * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ oder *** $P < 0,001$ dargestellt. [28]

4.3.4. IgG1- und IgG3-Glykosylierung der OVA-allergischen Nachkommen

Die Muttertiere zeigten einen deutlichen Unterschied in ihrer IgG-Glykosylierung im Serum. Das gleiche Phänomen spiegelte sich in ihren Nachkommen wider. Wurden Muttertier und Nachkommen mit dem gleichen Allergen behandelt, war in der IgG1-Analyse der OVA-OVA-Nachkommen das proinflammatorische G0 erhöht und die antiinflammatorischen, sialylierten Glykane (G1S1, G2S1, G3S1 und G2S2) vermindert (Abb. 7A). In der IgG3-Analyse zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich G0, jedoch war der Anteil an antiinflammatorischem G1S1 und G2S1 ebenfalls vermindert (Abb. 7B). Die OVA-allergischen Nachkommen wiesen wie ihre OVA-allergischen Muttertiere ein stark proinflammatorisches Profil in ihrer IgG1- und IgG3-Glykosylierung auf. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Ergebnissen der BAL und der Immunhistochemie, in welchen die Nachkommen ebenfalls einen ausgeprägten allergischen Phänotyp aufwiesen.

Die CAS-OVA-Nachkommen zeigten wie ihre Muttertiere keinen Unterschied in der IgG3-Glykosylierung im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 7B). In der IgG1-Analyse war der Anteil an G0, ebenso wie der Anteil an G2S1 ebenfalls nicht von der PBS-OVA-Gruppe signifikant zu unterscheiden (Abb. 7A). Lediglich G1S1, G3S1 und G2S2 waren in der IgG1-Analyse der CAS-OVA-Nachkommen erhöht. Dies entsprach im Wesentlichen dem Glykosylierungsprofil der CAS-allergischen Muttertiere mit einer Tendenz zum proinflammatorischen Phänotyp, allerdings in einem geringeren Ausmaß als in den OVA-OVA-Nachkommen.

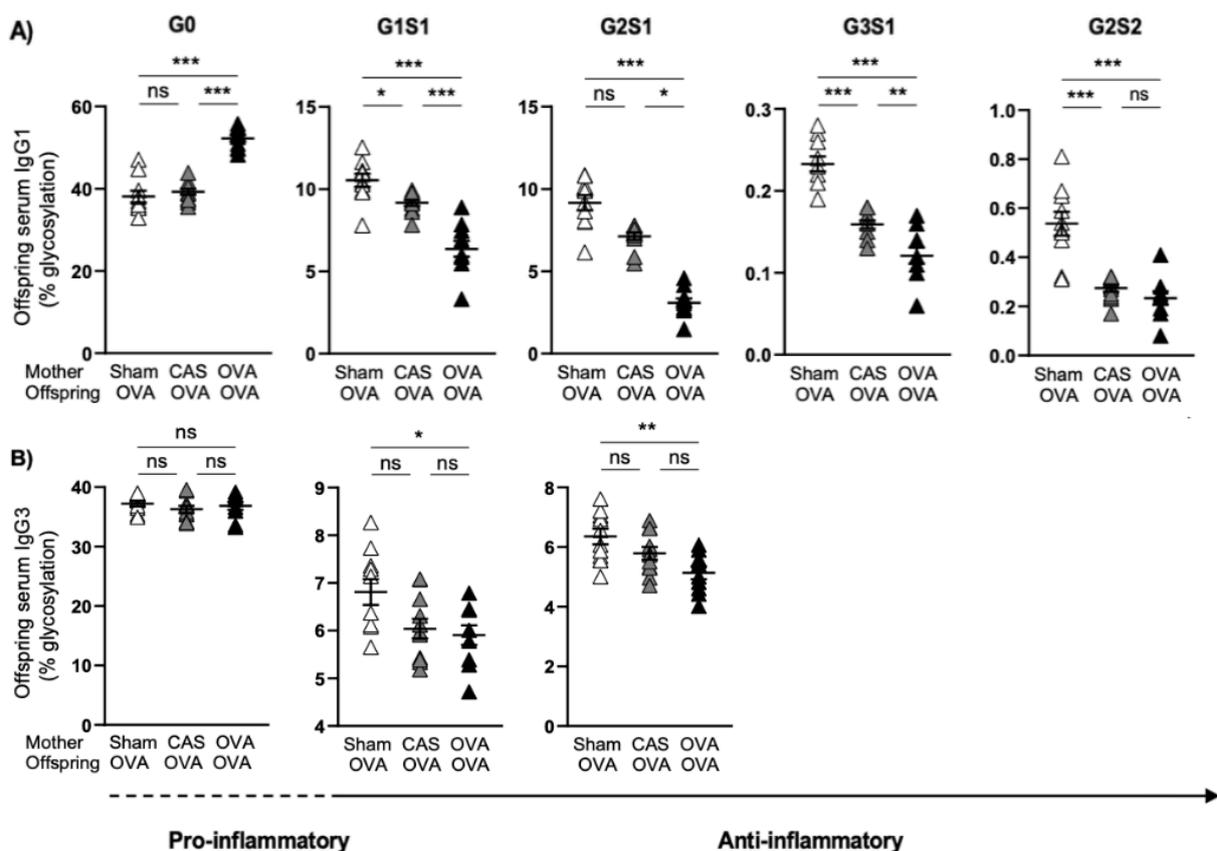


Abbildung 7: Analyse der IgG1- und IgG3-Glykosylierung im Serum der Nachkommen. (A) IgG1-Glykosylierungsprofil. (B) IgG3-Glykosylierungsprofil. ns = nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Sham/PBS-OVA: n = 10, CAS-OVA: n = 11, OVA-OVA: n = 10. Die Signifikanz wird durch * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ oder *** $P < 0,001$ dargestellt. [28]

4.4. Diskussion

4.4.1. Unterschiedlicher Phänotyp der OVA-allergischen Nachkommen

In diesem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass mütterliches Asthma bronchiale mit einer Asthma-Exazerbation während der Schwangerschaft einen Risikofaktor für die Nachkommen darstellt, ebenfalls eine Hyperreagibilität des Bronchialsystems zu entwickeln. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen von klinischen Studien an Menschen, in welchen eine Asthma-Exazerbation während der Schwangerschaft ebenfalls ein Risiko für die Kinder bedeutet [10,11]. Auffällig ist, dass dieses Phänomen in dem Maus-Modell nur dann beobachtet werden konnte, wenn Muttertier und Nachkommen mit dem gleichen Allergen sensibilisiert wurden (OVA-OVA-Gruppe). Diese Nachkommen zeigten eine ausgeprägte Entzündungsreaktion in den Bronchien und Alveolen, gemessen an der erhöhten Konzentration von Leukozyten in der BAL sowie an dem reduzierten Anteil an regulatorischen T-Zellen in der Immunhistochemie. Waren die Mäuse der zwei Generationen zu verschiedenen Allergenen exponiert (CAS-OVA-Gruppe), zeigten die Nachkommen keine verstärkte Lungeninflammation im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Verschiedene Ursachen lassen sich hierfür anführen. Insbesondere die Ergebnisse der IgG-Glykosylierung sind dahingehend sehr interessant und werden im Folgenden als einen möglichen Einflussfaktor auf die Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems diskutiert.

4.4.2. Unterschiede in den Antikörperkonzentrationen

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration im Serum ergab eine erhöhte Konzentration des Gesamt-IgG1 in den CAS-OVA-Nachkommen. OVA-spezifisches IgG1 war ebenfalls in den CAS-OVA-Nachkommen und in einem geringeren Ausmaß auch in den OVA-OVA-Nachkommen erhöht. Das OVA-spezifische IgE hingegen war in den OVA-OVA-Nachkommen, der Gruppe mit der stärksten Entzündungsreaktion in der BAL, signifikant reduziert. Dies erscheint im ersten Moment paradox, da eine allergische Reaktion klassischer Weise mit einem erhöhten IgE-Spiegel einhergeht [33]. Der Grund für die geringere IgG-Konzentration und den reduzierten IgE-Spiegel in den OVA-OVA-Nachkommen im Vergleich zu den CAS-OVA-Nachkommen könnte auf den Zeitpunkt der Messung zurückzuführen sein. Eine allergische Reaktion startet mit einer Antigen-Antikörper-Bindung [33]. Dieser Komplex bindet an die entsprechenden Rezeptoren auf den Zelloberflächen und löst damit eine überschießende Immunantwort

aus [33]. Die OVA-OVA-Nachkommen zeigten einen stark allergischen Phänotyp. Möglicherweise waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme die OVA-spezifischen IgE-Antikörper an zelluläre Oberflächenrezeptoren gebunden und damit der Messung nicht zugänglich [34,35]. Dies würde an den Effektorzellen eine starke Immunantwort auslösen und die inflammatorische Reaktion in der BAL und der Lungenimmunhistochemie erklären können. Zu diesem Zeitpunkt wären die Konzentration der freien IgE-Antikörper im Serum, die im ELISA erfasst werden würden, reduziert. Über den bereits gebundenen Anteil der Antikörper kann man jedoch keine Aussage treffen, da dieser dem Messverfahren nicht zugänglich war.

Die CAS-OVA-Nachkommen zeigten einen unveränderten OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dies stimmt mit den Ergebnissen der BAL überein, welche keine erhöhte Konzentration von Entzündungszellen aufzeigten. Die IgG-Konzentration war in dieser Gruppe erhöht. Dieses Phänomen kann man durch die Ergebnisse des Maus-Modells nicht ausreichend erklären. Die gemessenen Antikörperkonzentrationen sowie alle erhobenen Parameter geben nur die immunologische Situation zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder. In zukünftigen Versuchen wäre es interessant, verschiedene Zeitpunkte miteinander zu vergleichen. Außerdem stellt sich die Frage, ob der allergische Phänotyp der OVA-OVA-Nachkommen auch im Erwachsenenalter anhält. Diese und weitere Fragen gilt es in Zukunft zu untersuchen, um die maternofetale Risikoübertragung besser zu verstehen.

4.4.3. Zytokine in der BAL

Die CAS-OVA-Nachkommen zeigten nur geringe Änderungen in ihren Zytokin-Konzentrationen in der BAL. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der BAL überein, welche keine erhöhten Konzentrationen an Entzündungszellen aufwiesen. Die OVA-OVA-Nachkommen präsentierten sich jedoch nicht nur mit erhöhten Zell-Konzentrationen, sondern auch mit signifikant veränderten Zytokin-Spiegeln in der BAL. Da diese Gruppe auch einen deutlich erhöhten Anteil an proinflammatorischem IgG besitzt, könnte man vermuten, dass die veränderte Glykosylierung des IgG mit den deutlich veränderten Zytokin-Spiegeln in den OVA-OVA-Nachkommen zusammenhängen könnte. Bartsch et al. haben 2018 bereits den Einfluss der IgG-Glykosylierung auf die B- und T-Zell-Antwort untersucht [36]. In ihrem Versuch wurde eine erhöhte IL-6-Sekretion durch asialylierte IgG1-Antikörper induziert und signifikant

durch das Hinzufügen von sialyliertem IgG reduziert [36]. Auch in diesem Maus-Modell war sowohl das IL-6 in der BAL als auch das asialylierte, proinflammatorische IgG im Serum der OVA-OVA-Nachkommen erhöht.

Ausgenommen von IL-6 und KC zeigten die übrigen Zytokine in der BAL der OVA-OVA-Nachkommen entweder einen unveränderten oder sogar einen reduzierten Spiegel im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Unter anderem war auch die Konzentration des Typ-2-Zytokins IL-4, welches klassisch bei einer allergischen Reaktion beteiligt ist [2], reduziert. Auffallend ist, dass man den gleichen Effekt in einem vorangegangenen Maus-Modell beobachten konnte, in welchem die Gruppen mit einem ausgeprägten allergischen Phänotyp ebenfalls reduzierte Zytokin-Spiegel in der BAL aufwiesen [37]. Man kann die reduzierten Zytokin-Konzentrationen in den allergischen OVA-OVA-Nachkommen zum jetzigen Zeitpunkt nicht weiter erklären.

4.4.4. IgG-Glykosylierung als möglicher Einflussfaktor auf die Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems

Während die OVA-OVA-Nachkommen einen stark allergischen Phänotyp aufwiesen, zeigten die CAS-OVA-Nachkommen keine verstärkte Inflammation in der BAL und in der Immunhistochemie. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied zwischen den zwei allergischen Gruppen könnte ein unterschiedliches allergisches Potential der Allergene Casein und Ovalbumin sein, welche bei den Muttertieren verwendet wurden. Wenn die allergische Reaktion auf Ovalbumin in den OVA-Muttertieren stärker auftritt, als die allergische Reaktion auf Casein in den CAS-Muttertieren, könnte man vermuten, dass auch die OVA-OVA-Nachkommen stärker betroffen sind, als die CAS-OVA-Nachkommen. Allerdings zeigten die OVA- und CAS-allergischen Muttertiere keinen Unterschied hinsichtlich ihrer Lungeninflammation, gemessen an der BAL und Lungenhistologie. Eine unterschiedlich starke allergische Reaktion der CAS- und OVA-Muttertiere kann also nicht die unterschiedlichen Ergebnisse in den Nachkommen erklären.

Obwohl sich die CAS- und OVA-allergischen Muttertiere in ihrer inflammatorischen Reaktion der Lunge nicht signifikant unterschieden, ließ sich eine Diskrepanz in ihrer IgG-Glykosylierung feststellen. Die OVA-allergischen Muttertiere zeigten eine deutlich proinflammatorische Glykosylierung des IgG1 und IgG3 gemessen an einem erhöhten

Anteil an proinflammatorischem, agalactosyliertem IgG (G0) und einem verminderten Anteil an antiinflammatorischem, sialyliertem IgG (G1S1, G2S1, G3S1 und G2S2). Die CAS-allergischen Muttertiere wiesen in der Analyse der IgG-Glykosylierung ebenfalls eine Tendenz zu diesem proinflammatorischen Glykosylierungsprofil auf, jedoch in einer deutlich geringeren Ausprägung als die OVA-allergischen Muttertiere. Die Tatsache, dass eine Sensibilisierung der Muttertiere mit Ovalbumin die IgG-Glykosylierung in dem Maus-Modell stärker zu einem proinflammatorischen Phänotyp verlagerte als eine Sensibilisierung mit Casein konnte man in diesem Versuch nicht erklären. Allerdings konnte man feststellen, dass sich das Glykosylierungsprofil der Muttertiere in den Nachkommen widerspiegelte. Die OVA-OVA-Nachkommen wiesen wie die Muttertiere eine deutlich proinflammatorische Glykosylierung des IgG1 und des IgG3 auf, während die CAS-OVA-Nachkommen ebenso wie ihre Muttertiere nur eine Tendenz dahingehend zeigten. Dieser Unterschied könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, weshalb die OVA-OVA-Nachkommen einen allergischen Phänotyp in der BAL und der Immunhistochemie entwickelten und die CAS-OVA-Nachkommen nicht.

Das maternale IgG kann die Plazenta überqueren und direkt in den Blutkreislauf des Fetus gelangen [26]. In Abhängigkeit von seiner Glykosylierung kann das IgG im Fetus pro- oder antiinflammatorisch wirken [27]. Es könnte sein, dass es ebenfalls die Entwicklung des Immunsystems und das Risiko ein allergisches Asthma bronchiale zu entwickeln, beeinflussen kann. IgG entfaltet seine Wirkung durch die Bindung der Fc-Region an Rezeptoren auf den Zelloberflächen [38]. Dabei unterscheidet man Typ1- und Typ2-Fc γ -Rezeptoren [38]. Die Typ1-Fc γ -Rezeptoren wirken vor allem aktivierend [38]. Nur der Subtyp IIb vermittelt ein inhibitorisches Signal [38]. Zu den Typ2-Fc γ -Rezeptoren zählen die C-Typ-Lektin-Rezeptoren z.B. der murine Rezeptor SIGN-R1 [38]. Die Affinität des IgG zu den verschiedenen Rezeptoren hängt maßgeblich von der Glykosylierung des Asn-297 in der Fc-Region ab [38]. Die Integration von Galactose und Sialinsäure in das Glykan bewirkt eine erhöhte Affinität des IgG zu dem SIGN-R1 [38]. Der Rezeptor vermittelt über eine Kaskade eine erhöhte Expression des inhibitorisch wirkenden Fc γ -Rezeptors IIb auf der Zelloberfläche von Makrophagen und B-Zellen [38]. Dies begünstigt eine antiinflammatorische Reaktion [38].

Ein agalactosyliertes Glykan hingegen begünstigt die Affinität zu den aktivierenden Typ1-Fc γ -Rezeptoren, welche die proinflammatorischen Signale unterstützen und unter anderem auch eine Aktivierung des Komplementsystems bewirken können [39,40]. Eine proinflammatorische Glykosylierung des IgG ließ sich in der Gruppe mit dem schwersten allergischen Phänotyp (OVA-OVA-Nachkommen) und den OVA-allergischen Muttertieren beobachten. Es ist durchaus möglich, dass das maternale IgG über den oben beschriebenen Weg auf den Fetus einwirken und ihn so in seiner Entwicklung beeinflussen hätte können. Dabei würde das proinflammatorische IgG des Muttertieres das Immunsystem des Fetus zugunsten eines allergischen Phänotyps prädisponieren. Dieser Vermutung sollte in zukünftigen Versuchen nachgegangen werden. Die Glykan-Analyse des IgG ist sowohl in klinischen Studien mit Menschen als auch in Tierversuchen noch kein Standard-Messparameter. Unter der Berücksichtigung, dass die IgG-Glykosylierung großen Einfluss auf die Entwicklung eines allergischen Asthmas bronchiale haben kann, sollte sie jedoch in zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden.

Es ist weiterhin unbekannt, inwieweit dieser Mechanismus der maternofetalen Risikoübertragung allergen-spezifisch ist. Eine mögliche Ursache für das erhöhte Risiko der OVA-OVA-Nachkommen könnte ein spezifischer Effekt des Ovalbumins sein. Die Muttertiere der OVA-OVA-Nachkommen reagierten allergisch auf Ovalbumin und zeigten in der Analyse der IgG-Glykosylierung einen stark proinflammatorischen Phänotyp. Dies spiegelte sich in den Nachkommen wider und könnte den allergischen Phänotyp der Nachkommen bedingen. Bei der Sensibilisierung der Muttertiere mit Casein konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Dies könnte auf einen spezifischen Effekt des Ovalbumins hinweisen. Es ist ebenfalls möglich, dass dieser Effekt nicht von dem jeweiligen Allergen abhängt, sondern dass die Tatsache entscheidender ist, ob Muttertier und Nachkommen mit dem gleichen Allergen oder verschiedenen Allergenen sensibilisiert werden. Wurden die Nachkommen mit dem gleichen Allergen wie das Muttertier behandelt (OVA-OVA), zeigten sie einen allergischen Phänotyp. Im Gegensatz dazu wiesen die CAS-OVA-Nachkommen, welche mit einem unterschiedlichen Allergen als das Muttertier sensibilisiert wurden, kein erhöhtes Risiko auf. Ob das gleiche oder ein unterschiedliches Allergen in den zwei Generationen verwendet wird, könnte entscheidender sein, als das jeweilige Allergen selbst. Dieser Frage könnte in einem erneut durchgeführten Versuch nachgegangen werden. Zusätzlich sollte eine weitere Gruppe untersucht werden, in welcher die Nachkommen

der Casein-allergischen Muttertiere ebenfalls mit Casein sensibilisiert werden. Würden die CAS-CAS-Nachkommen ebenso wie die CAS-OVA-Nachkommen keinen allergischen Phänotyp entwickeln, könnte dies darauf hinweisen, dass es sich um einen OVA-spezifischen Effekt handelt. Wenn die CAS-CAS-Nachkommen jedoch wie auch die OVA-OVA-Nachkommen einen allergischen Phänotyp zeigen würden, schiene es eine entscheidendere Rolle zu spielen, ob Muttertier und Nachkommen mit dem gleichen Allergen behandelt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass eine Asthma-Exazerbation der Muttertiere während der Schwangerschaft einen Risikofaktor für die Nachkommen darstellt, ebenfalls allergisches Asthma zu entwickeln. Dies ließ sich jedoch nur beobachten, wenn Muttertier und Nachkommen mit dem gleichen Allergen (OVA) sensibilisiert wurden. Die Gruppe, in der die zwei Generationen mit unterschiedlichen Allergenen behandelt wurden, zeigten keinen ausgeprägten allergischen Phänotyp. Ein möglicher Einflussfaktor für das erhöhte Risiko in den OVA-OVA-Nachkommen könnte das IgG sein, welches sowohl bei den OVA-allergischen Muttertieren als auch bei deren Nachkommen eine proinflammatorische Glykosylierung aufwies. Die Analyse des N-Glykans im IgG ist bisher kein Standardparameter. In Hinblick auf die mögliche maternofetale Risikoübertragung durch eine proinflammatorische IgG-Glykosylierung sollte diese jedoch in zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden.

4.5. Literaturverzeichnis

1. Becker AB, Abrams EM. Asthma guidelines: The global initiative for asthma in relation to national guidelines. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2017;17(2):99–103.
2. Lambrecht BN, Hammad H, Fahy J V. The Cytokines of Asthma. *Immunity*. 2019;50(4):975–91.
3. Lei DK, Grammer LC. An overview of allergens. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2019;40(6):362–5.
4. Busse WW. The Relationship of Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation. *Chest*. 2010;138(2):4–10.
5. Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk for childhood asthma: Does mother confer more risk than father? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;158(1):176–81.
6. Lim RH, Kobzik L, Dahl M. Risk for asthma in offspring of asthmatic mothers versus fathers: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10134.
7. Harpsøe MC, Basit S, Bager P, Wohlfahrt J, Benn CS, Nøhr EA, Linneberg A, Jess T. Maternal obesity, gestational weight gain, and risk of asthma and atopic disease in offspring: A study within the Danish National Birth Cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(4):1033–40.
8. Arshad SH, Stevens M, Hide DW. The effect of genetic and environmental factors on the prevalence of allergic disorders at the age of two years. *Clinical and Experimental Allergy*. 1993;23(6):504–11.
9. Smith AL, Paul E, McGee D, Sinniah R, Flom E, Jackson-Humbles D, Harkema J, Racicot KE. Chronic, Elevated Maternal Corticosterone During Pregnancy in the Mouse Increases Allergic Airway Inflammation in Offspring. *Frontiers in Immunology*. 2020;10:3134.
10. Abdullah K, Zhu J, Gershon A, Dell S, To T. Effect of asthma exacerbation during pregnancy in women with asthma: a population-based cohort study. *European Respiratory Journal*. 2020;55(2):1901335.
11. Morten M, Collison A, Murphy VE, Barker D, Oldmeadow C, Attia J, Meredith J, Powell H, Robinson PD, Sly PD, Gibson PG, Mattes J. Managing Asthma in Pregnancy (MAP) trial: FENO levels and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;142(6):1765-1772.e4.
12. Dean B, Calimlim B, Sacco P, Aguilar D, Maykut R, Tinkelman D. Uncontrolled asthma: Assessing quality of life and productivity of children and their caregivers using a cross-sectional Internet-based survey. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2010;8:96.
13. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma – Langfassung, 3. Auflage. Version 1. 2018 [cited: 2020-05-11]. DOI: 10.6101/AZQ/000400. www.asthma.versorgungsleitlinien.de.
14. Conrad ML, Yildirim AÖ, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, Teich R, Renz H, Garn H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical and Experimental Allergy*. 2009;39(8):1246–54.
15. Reddy AT, Lakshmi SP, Reddy RC. Murine Model of Allergen Induced Asthma. *Journal of Visualized Experiments*. 2012;(63):e3771.
16. Rossant J, Cross JC. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(7):538–48.
17. Georgiades P, Ferguson-Smith A, Burton G. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta*. 2002;23(1):3–19.

18. Herz U, Joachim R, Ahrens B, Scheffold A, Radbruch A, Renz H. Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor the development of atopy in the neonate. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2001;124(1–3):193–6.
19. Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, Seib C, Van D, Luger EO, Hutloff A, Hamelmann E. Prenatal allergen exposures prevent allergen-induced sensitization and airway inflammation in young mice. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;67(3):353–61.
20. Hamada K, Suzaki Y, Goldman A, Ning YY, Goldsmith C, Palecanda A, Coull B, Hubeau C, Kobzik L. Allergen-Independent Maternal Transmission of Asthma Susceptibility. *The Journal of Immunology*. 2003;170(4):1683–9.
21. Polte T, Hennig C, Hansen G. Allergy prevention starts before conception: Maternofetal transfer of tolerance protects against the development of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;122(5):1022-1030.e5.
22. Fusaro AE, De Brito CA, Taniguchi EF, Muniz BP, Victor JR, Orii NM, Duarte AJDS, Sato MN. Balance between early life tolerance and sensitization in allergy: Dependence on the timing and intensity of prenatal and postnatal allergen exposure of the mother. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e541-50.
23. Fusaro AE, Brito CA, Victor JR, Rigato PO, Goldoni AL, Duarte AJS, Sato MN. Maternal-fetal interaction: Preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. *Immunology*. 2007;122(1):107–15.
24. Lebold KM, Jacoby DB, Drake MG. Inflammatory mechanisms linking maternal and childhood asthma. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020;1–9.
25. Aaltonen R, Heikkinen T, Hakala K, Laine K, Alanen A. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstetrics and Gynecology*. 2005;106(4):802–7.
26. Fouda GG, Martinez DR, Swamy GK, Permar SR. The Impact of IgG Transplacental Transfer on Early Life Immunity. *ImmunoHorizons*. 2018;2(1):14–25.
27. Epp A, Sullivan KC, Herr AB, Strait RT. Immunoglobulin Glycosylation Effects in Allergy and Immunity. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2016;16(11):79.
28. Sodemann EB, Dähling S, Klopffleisch R, Boiarina E, Cataldo D, Alhasan MM, Yildirim A, Witzernath M, Tabeling C, Conrad ML. Maternal asthma is associated with persistent changes in allergic offspring antibody glycosylation. *Clinical and Experimental Allergy*. 2020;50(4):520–31.
29. Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Takakura D, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Ji S, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y, Furukawa K. Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nature Communications*. 2016;7:11205.
30. Vučković F, Krištic J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, Pučić-Baković M, Štambuk J, Trbojević-Akmačić I, Barrios C, Pavic T, Menni C, Wang Y, Zhou Y, Cui L, Song H, Zeng Q, Guo X, Pons-Estel BA, McKeigue P, Leslie Patrick A, Gornik O, Spector TD, Harjaček M, Alarcon-Riquelme M, Molokhia M, Wang W, Lauc G. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis and Rheumatology*. 2015;67(11):2978–89.
31. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670–3.
32. Oefner CM, Winkler A, Hess C, Lorenz AK, Holecška V, Huxdorf M, Schommartz T, Petzold D, Bitterling J, Schoen AL, Stoehr AD, Vu Van D, Darcan-Nikolaisen Y, Blanchard V, Schmutte I, Laumonnier Y, Ströver HA, Hegazy AN, Eiglmeier S, Schoen CT, Mertes MMM, Loddenkemper C, Löhning M, König P, Petersen A, Luger EO, Collin M, Köhl J, Hutloff A, Hamelmann E, Berger M, Wardemann H, Ehlers M. Tolerance

- induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012;129(6):1647-1655.e13.
33. Stone KD, Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):73–80.
 34. Honma K, Kohno Y, Saito K, Shimojo N, Tsunoo H, Niimi H. Specificities of IgE, IgG and IgA antibodies to ovalbumin: Comparison of binding activities to denatured ovalbumin or ovalbumin fragments of IgE antibodies with those of IgG or IgA antibodies. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1994;103(1):28–35.
 35. Okamoto-Uchida Y, Nakamura R, Matsuzawa Y, Soma M, Kawakami H, Ishii-Watabe A, Nishimaki-Mogami T, Teshima R, Saito Y. Different results of IgE binding- and crosslinking-based allergy tests caused by allergen immobilization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;39(10):1662–6.
 36. Bartsch YC, Rahmöller J, Mertes MMM, Eiglmeier S, Lorenz FKM, Stoehr AD, Braumann D, Lorenz AK, Winkler A, Lilienthal GM, Petry J, Hobusch J, Steinhaus M, Hess C, Holecska V, Schoen CT, Oefner CM, Leliavski A, Blanchard V, Ehlers M. Sialylated autoantigen-reactive IgG antibodies attenuate disease development in autoimmune mouse models of Lupus nephritis and rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1183.
 37. Alhasan MM, Cait AM, Heimesaat MM, Blaut M, Klopffleisch R, Wedel A, Conlon TM, Yildirim A, Sodemann EB, Mohn WW, Bereswill S, Conrad ML. Antibiotic use during pregnancy increases offspring asthma severity in a dose-dependent manner. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;00:1–12.
 38. Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with Fc γ Rs in vivo. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2011;16(1):7–14.
 39. Pincetic A, Bournazos S, DiLillo DJ, Maamary J, Wang TT, Dahan R, Fiebiger BM, Ravetch J V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nature Immunology*. 2014;15(8):707–16.
 40. Malhotra R, Wormald M, Rudd P, Fischer P, Dwek R, Sim R. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*. 1995;1(3):237–43.

5. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung

„Ich, Elisa Sodemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Ist mütterliches, allergisches Asthma bronchiale ein Risikofaktor für die Nachkommen an allergischem Asthma bronchiale zu erkranken?“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen der Promotionsverfahren zum Dr. med.

Publikation: Sodemann EB, Dähling S, Klopffleisch R, Boiarina E, Cataldo D, Alhasan MM, Yildirim AÖ, Witzenrath M, Tabeling C, Conrad ML. Maternal asthma is associated with persistent changes in allergic offspring antibody glycosylation. *Clinical and Experimental Allergy*. 2020;50(4):520–31.

Mein Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit an der experimentellen Planung und Organisation sowie bei der Durchführung des Tierversuchs; Tierpräparation: Gewinnung der Serum-, BAL- und Lungengewebsproben; laborchemische Ermittlung folgender Primärdaten: Konzentration der Antikörper im Serum, Konzentration der Leukozyten sowie der Eosinophile, Lymphozyten und Makrophagen in den BAL-Proben - aus der Analyse dieser Primärdaten gehen jeweils die Graphen in (A) und (B) der Abbildungen 3 und 4 hervor; Auswertung und Interpretation sämtlicher im Tierversuch erhobener Daten mit Unterstützung von Dr. Melanie Conrad; Erstellung der Abbildungen 3 – 6 sowie der darin enthaltenen Graphen; Mitarbeit bei der Verfassung und Revision des Manuskripts

Beitrag weiterer Personen:

Die Ermittlung folgender Primärdaten wurde durchgeführt von:

- FoxP3-Immunhistochemie: Prof. Dr. R. Klopffleisch
- Atemwegswiderstandsmessung: Ekaterina Boiarina und Prof. Dr. D. Cataldo
- Lungenhistologie: M. Alhasan und Dr. A. Ö. Yildirim
- IgG-Glykosylierung: Firma Genos

Unterschrift der Doktorandin

6. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **'ALLERGY'** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 27 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	51,978	14.110	0.076250
2	Journal of Allergy and Clinical Immunology-In Practice	4,196	7.550	0.013090
3	CLINICAL REVIEWS IN ALLERGY & IMMUNOLOGY	3,149	7.328	0.006390
4	ALLERGY	17,873	6.771	0.024250
5	CONTACT DERMATITIS	5,478	5.504	0.003510
6	Allergy Asthma & Immunology Research	1,599	5.026	0.003240
7	CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY	11,312	4.741	0.012900
8	PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY	4,360	4.654	0.006520
9	Clinical and Translational Allergy	987	4.232	0.002890
10	CURRENT ALLERGY AND ASTHMA REPORTS	2,600	3.982	0.005460
11	ALLERGOLOGY INTERNATIONAL	2,061	3.965	0.003820
12	JOURNAL OF INVESTIGATIONAL ALLERGOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY	2,192	3.802	0.002210
13	World Allergy Organization Journal	1,733	3.684	0.003160
14	ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY	7,962	3.560	0.009610
15	Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology	2,844	3.014	0.004150
16	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY	5,054	2.932	0.004420
17	IMMUNOLOGY AND ALLERGY CLINICS OF NORTH AMERICA	1,793	2.788	0.002910

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
18	Allergy Asthma and Clinical Immunology	1,195	2.664	0.002760
19	ALLERGY AND ASTHMA PROCEEDINGS	1,985	2.124	0.002920
20	JOURNAL OF ASTHMA	3,789	2.081	0.005530
21	Postepy Dermatologii i Alergologii	722	1.757	0.001720
22	ASIAN PACIFIC JOURNAL OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY	752	1.747	0.001040
23	ALLERGOLOGIA ET IMMUNOPATHOLOGIA	1,157	1.640	0.001830
24	Iranian Journal of Allergy Asthma and Immunology	715	1.222	0.001120
25	Pediatric Allergy Immunology and Pulmonology	214	0.551	0.000570
26	Revue Francaise d Allergologie	261	0.262	0.000110
27	ALLERGOLOGIE	134	0.150	0.000070

Copyright © 2019 Clarivate Analytics

7. Publikation

Received: 20 September 2019 | Revised: 14 December 2019 | Accepted: 15 December 2019

DOI: 10.1111/cea.13559

ORIGINAL ARTICLE

Experimental Models of Allergic Disease

WILEY

Maternal asthma is associated with persistent changes in allergic offspring antibody glycosylation

Elisa B. Sodemann¹ | Sabrina Dähling² | Robert Klopffleisch³ | Ekaterina Boiarina^{4,5} |
Didier Cataldo^{6,7} | Moumen M. Alhasan¹ | Ali Ö. Yildirim⁸ | Martin Witzentrath^{4,5} |
Christoph Tabeling^{4,5,9} | Melanie L. Conrad^{1,10} 

¹Institute of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Institute of Systems Immunology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

³Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

⁴Department of Infectious Diseases and Respiratory Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

⁵Division of Pulmonary Inflammation, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

⁶Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA Research Center, University of Liège, Liège, Belgium

⁷Department of Respiratory Diseases, CHU Liège, Liège, Belgium

⁸Comprehensive Pneumology Center (CPC), Institute of Lung Biology and Disease, Member of the German Center for Lung Research (DZL), Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

⁹Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

¹⁰Department of Internal Medicine, Division of Psychosomatic Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Correspondence

Melanie Conrad, Institute of Microbiology, Infectious Diseases and Immunology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany.
Email: conradml@gmail.com

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/

Abstract

Background: Maternal asthma during pregnancy is considered an environmental risk factor for asthma development in children. Immunoglobulin G (IgG) antibodies that are transferred from the mother to the fetus are known to act in a pro- or anti-inflammatory manner depending on their glycosylation status.

Objective: Using a mouse model, we examined how maternal allergic airway inflammation during pregnancy influenced offspring experimental asthma severity, as well as maternal and offspring serum IgG antibody glycosylation patterns. Additionally, the effects of maternal and offspring exposure to the same or different allergens were investigated.

Methods: Female mice were either sham sensitized or sensitized to casein (CAS) or ovalbumin (OVA) before mating. Subsequently, allergic lung inflammation was induced in pregnant dams via aerosol allergen challenge (sham, CAS or OVA). After weaning, pups were subjected to an experimental asthma protocol using OVA. Asn-297 IgG glycosylation was analysed in maternal and offspring serum.

Results: When mothers and offspring were sensitized to the same allergen (OVA-OVA), offspring had more severe experimental asthma. This was evidenced by altered antibody concentrations, increased bronchoalveolar lavage inflammatory cell influx and decreased lung tissue and lung draining lymph node regulatory T cell percentages. When mothers and offspring were sensitized to different allergens (CAS-OVA), this phenotype was no longer observed. Additionally, maternal serum from allergic mothers had significantly higher levels of pro-inflammatory IgG1, shown by decreased galactosylation and sialylation at the Asn-297 glycosylation site. Similar glycosylation patterns were observed in the serum of adult allergic offspring from allergic mothers.

Conclusions and Clinical Relevance: We observed a strong association between maternal experimental asthma during pregnancy, increased offspring airway inflammation and pro-inflammatory IgG glycosylation patterns in mothers and offspring. IgG

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Clinical & Experimental Allergy* published by John Wiley & Sons Ltd

Award Number: CO-1058/3-1 and SFB-TR84 C3 and C6

glycosylation is not a standard measurement in the clinical setting, and we argue that it may be an important parameter to include in future clinical studies.

KEYWORDS

allergic airway inflammation, asthma risk, IgG glycosylation, maternal asthma, pregnancy, sialylation

1 | INTRODUCTION

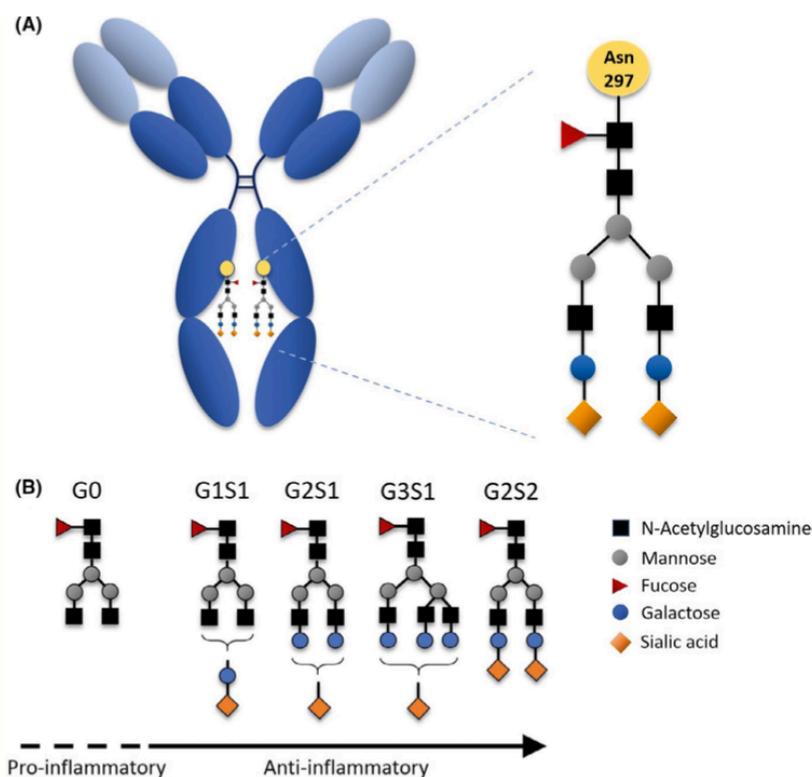
Asthma is a chronic obstructive airway disease characterized by airway inflammation and hyperreactivity leading to recurring episodes of respiratory symptoms including cough and shortness of breath. More than 300 million people around the world suffer from asthma, and its incidence is increasing in many countries, especially among children.^{1,2} Though parental history plays a major role in asthma development in children, genetics alone cannot explain why asthma frequency has been increasing over the past decades.³ In fact, exogenous risk factors during pregnancy and early life are described to play a crucial role in asthma pathogenesis.⁴ Supporting this, retrospective human studies indicate that maternal asthma represents a stronger risk factor than paternal asthma.⁵⁻⁷ Moreover, mouse models demonstrate that maternal asthma exacerbation during pregnancy results in increased asthma severity in the offspring.⁸⁻¹⁰ However, the underlying mechanisms that contribute to this phenomenon remain incompletely understood.

During pregnancy and breastfeeding, transfer of maternal immunoglobulin G (IgG) antibodies protects the offspring from

pathogens, while the humoral immune response is still inefficient. Importantly, IgG antibodies can act either pro- or anti-inflammatory, depending on complex N-glycans attached to the asparagine (Asn)-297 residue on the fragment crystallizable (Fc) region.¹¹ Structurally, this N-glycan consists of a core containing four N-acetylglucosamine residues and three mannose molecules, shown in Figure 1A. Integration of galactose and sialic acid residues on these branched carbohydrate chains alters the structure of the antibody, changing antibody receptor binding properties and increasing the anti-inflammatory properties of the molecule,^{12,13} shown in Figure 1B.

IgG glycosylation patterns have been correlated with disease severity in humans and serve as a therapeutic target. For instance, in autoimmune diseases, exacerbations are characterized by an increased frequency of agalactosylated IgG (G0) and a decreased frequency of sialic acid.¹⁴⁻¹⁶ This imbalance of IgG glycosylation can be therapeutically compensated by administration of high dose intravenous immunoglobulin (IVIg), which leads to an increase in anti-inflammatory sialylated antibodies.¹⁷ Importantly, in allergen-specific

FIGURE 1 Schematic of IgG1 glycosylation. A, Illustration of an IgG molecule showing the two Asn-297 N-linked glycosylation sites in the Fc region of the antibody. The core component of the glycan molecule consists of four N-acetylglucosamine residues (black) and three branched mannose molecules (grey). This core structure can be modified by the addition of a fucose (red), or galactose (blue) and sialic acid (orange). The inset shows a fucosylated, galactosylated and sialylated N-glycan (G2S2). B, Representation of the different Asn-297 glycosylation structures reported in this study. All structures contain a core fucose. Pro-inflammatory agalactosylated glycan: G0. Anti-inflammatory galactose and sialic acid containing glycans: G1S1, G2S1, G3S1, G2S2



immunotherapy, successful tolerance induction is associated with generation of sialylated antigen-specific IgG.^{18,19}

IgG glycosylation is known to be influenced by the environment¹¹ and thus directly reflects the physiological status of an individual. In the case of maternal asthma during pregnancy, since the developing fetus is exposed to transferred IgG from the mother, it is important to consider both IgG concentrations and glycosylation status. Upon transfer to the fetus or neonate, these pro- or anti-inflammatory signals could strongly influence immune system development and predispose the offspring to inflammation or allergy susceptibility. Studies have shown that the levels of galactosylated and sialylated serum IgG increase during pregnancy and decrease postpartum.²⁰ However, to our knowledge, this is the first study examining IgG glycosylation in relation to maternal asthma during pregnancy and offspring asthma susceptibility.

Here, we demonstrate that asthma exacerbation during pregnancy alters maternal serum IgG1 and IgG3 glycosylation patterns towards a pro-inflammatory phenotype. We further show that these maternal IgG antibody glycosylation patterns persisted in adult allergic offspring and were associated with increased inflammatory responses in offspring experimental asthma.

2 | METHODS

2.1 | Animals

Eight-week-old female BALB/c mice were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed four animals per cage in a 12/12-h light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. All animal experiments were approved by local authorities and were performed in accordance with German and international guidelines.

2.2 | Experimental design

2.2.1 | Allergen sensitization and challenge—Dams

Using an adjuvant-free, experimental asthma protocol,²¹ 8-week-old female BALB/c mice were subcutaneously sensitized once weekly for three weeks (maternal age 8, 9 and 10 weeks) with either 10 µg casein (CAS) (Merck) or 10 µg ovalbumin (OVA) (grade VI, Merck) in 200 µL phosphate-buffered saline (PBS). Controls were sham sensitized with PBS (Figure 2A,B). After a two-week rest period, 12-week-old sensitized females were mated with non-sensitized, male BALB/c mice, and visualization of a mucous plug was considered gestation day (G)0. On G6, G8, G10, G12, G14 and G16 pregnant mice were exposed for 20 minutes to an aerosol of either 1% CAS or 1% OVA to elicit the asthma phenotype during pregnancy. Control pregnant mice were sham exposed to PBS aerosol. Pups were born and weaned at 21 days of age. Since taking blood can have a substantial impact on mouse physiology,²² and we did not want to interfere with the pregnant mice or the possible offspring outcome, we chose maternal recall challenge as a method to evaluate maternal allergic airway inflammation. Ten days after offspring weaning, the maternal asthma phenotype was assessed by exposing dams to an aerosol recall challenge of PBS, CAS or OVA, respectively (20 minutes per day for 3 days) (Figure 2A,B).

2.2.2 | Allergen sensitization and challenge—Offspring

At 21 days of age, offspring were weaned from their mothers and immediately sensitized using an adjuvant-free, experimental asthma protocol. Specifically, at 21, 28 and 35 days of age, all female offspring were subcutaneously sensitized with 10 µg OVA (grade VI, Merck) in 200 µL PBS. At 46, 47 and 48 days of age,

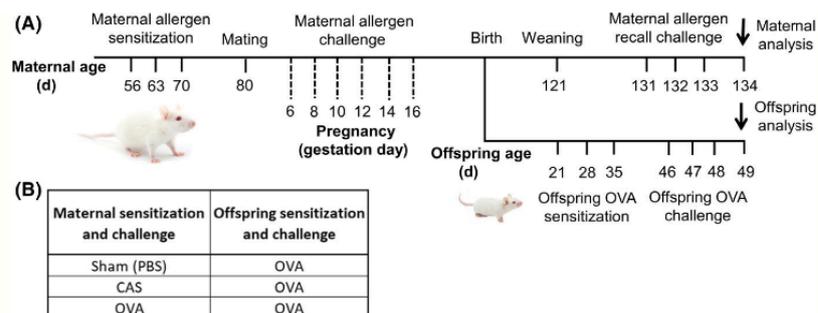


FIGURE 2 Protocol for testing the effect of maternal asthma during pregnancy on offspring asthma risk. This model allows comparison of mothers and offspring that are allergic to different allergens (CAS/OVA) or the same allergen (OVA/OVA). A, *Maternal treatment*: Before mating, female mice were subcutaneously sensitized with either casein (CAS) or ovalbumin (OVA) at 56, 63 and 70 d of age. Control female mice were sham-sensitized with phosphate-buffered saline (PBS). After mating, pregnant mice were aerosol challenged with the respective allergen (CAS or OVA) or control (PBS) every second day from gestation day (G) 6 to G16. Pups were born, and 10 d after weaning, the maternal asthma phenotype was assessed by exposing dams to an aerosol recall challenge of PBS, CAS or OVA, respectively. *Offspring treatment*: At 21, 28 and 35 d of age, offspring were subcutaneously sensitized to OVA. Offspring were aerosol challenged with OVA at 46, 47 and 48 d of age, and analysis was performed 24 h after the last challenge on offspring day 49. B, Summary of the allergens used for maternal and offspring experimental asthma sensitization and challenge

the asthma phenotype was induced by exposing the offspring for 20 minutes to a 1% OVA aerosol (Figure 2A,B). In each group, 2 or more offspring from a minimum of 6 mothers were used.

2.3 | Airway reactivity

Twenty four hours after the last challenge, offspring airway reactivity was measured in 10 mice from each group. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of 10 mg/mL ketamine (Merial) and 1 mg/mL xylazine (VMD Livestock). A 20-gauge polyethylene catheter was inserted into the trachea, and mice were ventilated with a flexiVent small animal ventilator® (SCIREQ) as previously described.²³ Lung function was assessed at baseline and following increasing doses of aerosolized methacholine (0, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 g/L) using a 3-sec broadband signal to measure input impedance from 1 to 20.5 Hz and to calculate constant-phase model parameters. Newtonian resistance (Rn) was the main parameter measured during the challenge.

2.4 | Bronchoalveolar lavage (BAL) and differential cell counts

Blood samples were taken from the orbital sinus of terminally anaesthetized mice, and serum was stored at -80°C . Using a tracheal cannula on euthanized mice, BAL was performed once using 1 mL PBS containing $1 \times$ cComplete protease inhibitor cocktail (Roche). BAL supernatant was stored at -80°C , and total leucocytes were counted with a Neubauer chamber. Cytospin preparations were stained with Diff-Quick (Merz & Dade), and standard morphological criteria were used to identify cell types. Two hundred cells were counted per cytospin by a researcher blinded to the sample names.

2.5 | Lung collection and histology

Immediately after BAL, lungs were fixed with 4% formalin and then embedded in paraffin. Using a method previously described,²⁴ 4- μm PAS-stained lung sections were microscopically analysed using the new Computer Assisted Stereological Toolbox (newCAST, Visiopharm) by readers blinded to the study groups. For quantification of inflammation, the software randomly selected 100 frames of a coronal lung section (40x objective) and superimposed these frames by grid of points. Point intercepts on leucocytes were considered a point of inflammation (PI). Total PI for each lung was collected and normalized to the surface area measured.

2.6 | Immunohistochemistry

After deparaffinization and rehydration, 4- μm paraffin-embedded lung tissue sections were washed in Tris-buffered saline, followed by

blocking of endogenous peroxidase via incubation with 3% H_2O_2 in methanol for 30 minutes at room temperature. After incubation with 5% normal serum, the samples were incubated with anti-FoxP3 primary antibody (Clone: FJK-16 – eBioscience) overnight at 4°C . The slides were washed and then incubated for 1 hour at room temperature with biotinylated goat anti-rat secondary antibody (Vector Laboratories). Signal was detected using a liquid DAB + Substrate-Chromogen System (Agilent) at room temperature.

2.7 | Antibody quantification

Serum levels of OVA-specific IgE and IgG1 were measured in both dams and pups by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Nunc MaxiSorp flat-bottom 96-well plates (Sigma-Aldrich) were coated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OVA, diluted in NaHCO_3 buffer and incubated overnight at 4°C . Plates were washed and blocked with PBS-1%BSA buffer for 2 hours at room temperature. After washing, serum samples were added and incubated overnight at 4°C . Plates were then washed and incubated with either biotinylated rat anti-mouse IgE (Pharmingen, USA) or biotinylated goat anti-mouse IgG1 (Sigma-Aldrich) at room temperature for 2 hours. Plates were incubated with streptavidin-peroxidase for 30 minutes, developed with POD substrate (Sigma-Aldrich), and the reaction stopped with 2M sulphuric acid. Colour development was read with a microplate reader (Bio-Rad) at 450 nm. OVA antibody titres of the sample were calculated by comparison with standards. For total IgG1 measurement, a similar protocol was used with the exception that the plates were coated with 0.5 mg/mL rat anti-mouse IgG1. CAS-specific IgE and IgG1 were measured in mothers by the same procedure as the OVA-specific ELISAs, with the exception that plates were coated with 20 mg/mL CAS, and OD 450 nm was reported.

2.8 | Antibody glycosylation analysis

Subclass-specific mouse IgG N-glycosylation analysis was performed as described previously.²⁵ Briefly, IgG was captured from 15 μL of murine serum using protein G affinity beads in PBS. Proteins interacted with the beads while being shaken for 1.5 hours, after which the beads were washed seven times with 1.5 mL PBS. IgG was eluted with 100 μL of 100 mmol/L formic acid, and eluates were dried for 2 hours in a vacuum concentrator at 60°C . Lyophilized IgG was dissolved in 40 μL 25 mmol/L ammonium bicarbonate, and 0.2 μg of sequencing grade trypsin (Promega) was added. Samples were incubated for 18 h at 37°C . Obtained glycopeptides were desalted on C_{18} beads, dried in a vacuum centrifuge and redissolved in 40 μL of ultrapure water. For nano-LC-ESI-Qq-TOF analysis, five microlitres of sample was injected and separation was achieved on a C_{18} nano-LC column. For data analysis, files were first converted to.mzXML format using ProteoWizard msConvert and processed with LaCy Tools software. Glycopeptide peak areas of doubly and triply charged ions were summed and normalized by total area for each subclass detected.

2.8.1 | Glycan abbreviations

The IgG Asn-297 N-linked glycosylation structures discussed in this study are shown in Figure 1B.

2.9 | Statistical analysis

All samples were tested for normal distribution using a Shapiro-Wilk normality test. Parametric data were analysed using one-way ANOVA and non-parametric data with a Kruskal-Wallis test, followed by Dunnett's multiple comparisons test (all groups compared with each other). For bronchial responsiveness, airway resistances measured for each concentration of methacholine were analysed using two-way ANOVA. Data are presented as mean \pm SEM. For correlation analysis, Pearson's *r* was calculated and reported with the *P* value. Calculations were performed with GraphPad Prism 8 software.

3 | RESULTS

3.1 | Dams previously challenged during pregnancy showed distinct allergic airway inflammation upon recall allergen challenge

As expected, dams that were recall challenged with CAS or OVA after their offspring were weaned, displayed a clear allergic phenotype compared to control dams (sham recall challenged with PBS). This was demonstrated by allergen-specific antibody titres in the CAS- and OVA-challenged groups (Figure 3A). Regarding allergic airway inflammation, both CAS and OVA allergic dams displayed increased numbers of leucocytes in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid when compared to controls (Figure 3B). The BAL contained significantly increased numbers of eosinophils and lymphocytes in the allergic groups; OVA allergic mothers additionally exhibited increased numbers of macrophages. Histological quantification of lung tissue inflammation revealed similar profiles for both CAS and OVA allergic groups, both of which had a significantly increased number of lung tissue leucocytes compared to control dams (Figure 3C,D).

3.2 | Maternal allergen type influences the asthma phenotype in allergic offspring

To test the influence of maternal allergic airway inflammation during pregnancy on experimental asthma in the offspring, pups from allergic (CAS or OVA) or sham-treated dams were weaned at 21 days of age and all offspring were subjected to an adjuvant-free OVA asthma protocol (Figure 2A,B). Employing groups in which mothers and offspring were allergic to either the same allergen (OVA-OVA) or the different allergens (CAS-OVA) additionally allowed us to test how the maternal allergen type influenced offspring asthma susceptibility. Indeed, similarities or differences in allergen between mother and

offspring were associated with differential antibody concentrations in allergic pups. Considering maternal CAS allergy, OVA allergic offspring from these dams (CAS-OVA) showed significantly increased levels of total IgG1 and OVA-specific IgG1 in the serum when compared with OVA allergic offspring from sham-treated mothers (sham-OVA). OVA allergic offspring from OVA allergic mothers (OVA-OVA) had increased OVA-specific IgG1 and decreased OVA-specific IgE compared to sham-OVA offspring (Figure 4A).

Next, we assessed the effect of maternal allergy during pregnancy on airway inflammation in the allergic pups. When mothers and offspring were sensitized to the same allergen (OVA-OVA), an increase in inflammatory cell influx into the offspring BAL was observed. This effect was shown to be compartment-specific, as leucocyte numbers in lung tissue were comparable between groups (Figure S1A,B). OVA-OVA offspring BAL contained an increased number of leucocytes compared to sham-OVA offspring, which was comprised predominantly of eosinophils, and to a lesser extent lymphocytes and macrophages (Figure 4B). Interestingly, when mothers and offspring were sensitized to different allergens (CAS-OVA), there were no differences in the offspring BAL when compared with the sham-OVA group.

FoxP3 is a marker of T regulatory (Treg) cells, and allergic asthma patients are known to have decreased sputum and blood Treg cell numbers.^{26,27} In our study, immunohistochemical staining revealed that when mothers and offspring were both sensitized to the same allergen, OVA-OVA offspring showed significantly less Treg cells in the lung tissue and lung draining lymph nodes compared to the sham-OVA group (Figure 4C,D). This is in accordance with the increased eosinophilic cell influx in the BAL of OVA-OVA offspring. In contrast, when mothers and offspring were sensitized to different allergens (CAS-OVA), no differences in FoxP3 frequency were observed compared to sham-OVA offspring. Although we observed clear differences in allergic airway inflammation parameters in OVA-OVA compared with sham-OVA offspring, these were not correlated with changes in airway reactivity (Figure S1C).

In summary, maternal allergic airway inflammation during pregnancy influenced the offspring experimental asthma phenotype in an allergen-dependent manner. When mothers and offspring were sensitized to the same allergen, airway inflammation in OVA-OVA offspring was more severe. This was evidenced by altered antibody concentrations, increased BAL inflammatory cell influx and decreased lung tissue and lung draining lymph node FoxP3 cell frequency. When mothers and offspring were sensitized to different allergens (CAS-OVA), these differences were no longer apparent compared to the sham-OVA offspring group.

3.3 | Maternal allergic airway inflammation during pregnancy is associated with changes in maternal serum IgG1 and IgG3 glycosylation that persist in adult allergic offspring

It is established that glycosylation patterns influence the inflammatory properties of IgG antibodies, and altered antibody glycosylation patterns are commonly observed in inflammatory diseases.^{28,29} For

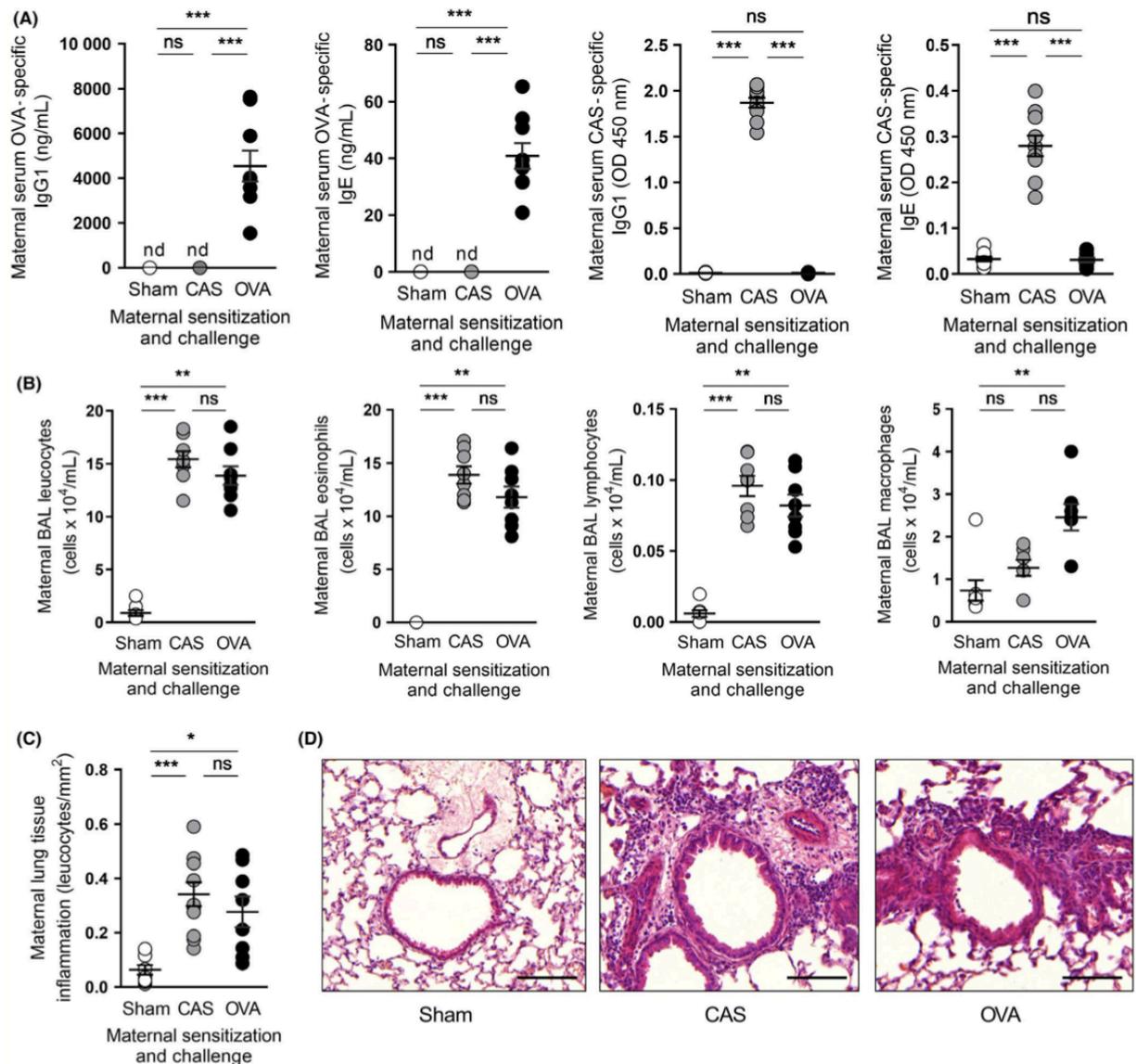
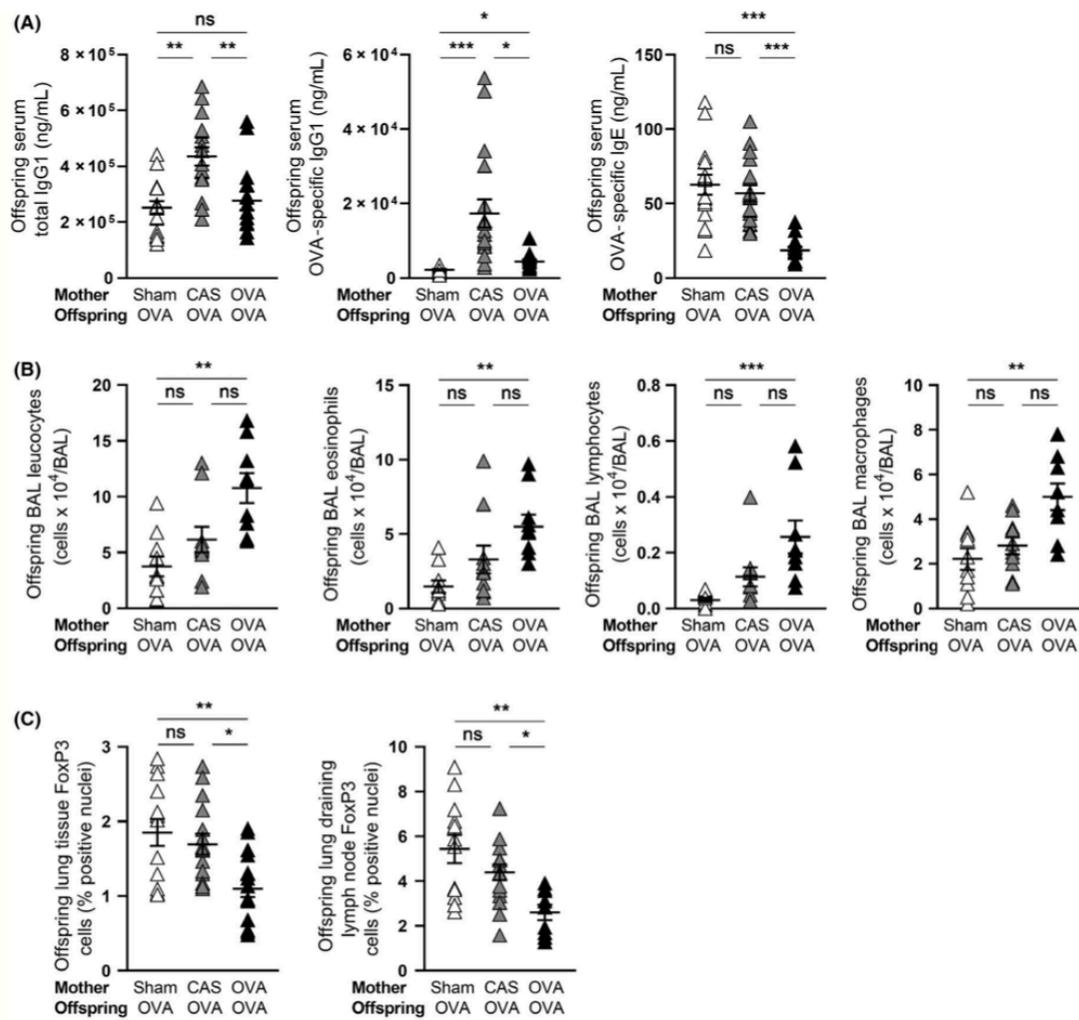
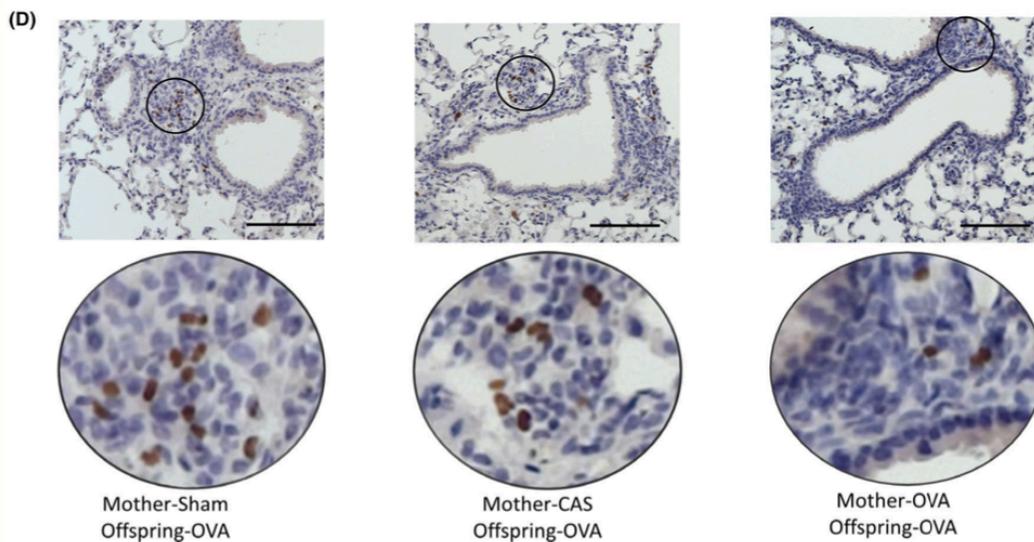


FIGURE 3 Recall allergen challenge of sensitized dams generates robust allergic airway inflammation that is similar in OVA and CAS allergic groups. Pregnant mice were sensitized with either PBS (sham), CAS or OVA before mating, then challenged during pregnancy with PBS, CAS or OVA, respectively. After the offspring were weaned, dams were recall challenged with PBS or the respective allergen. A, Maternal serum OVA-specific IgG1, OVA-specific IgE, CAS-specific IgG1, CAS-specific IgE. B, Maternal BAL numbers of leucocytes, eosinophils, lymphocytes and macrophages. C, Quantification of maternal lung inflammation. D, Lung histology images from control, CAS and OVA allergic mothers. Scale bar = 100µm. nd = not detectable, ns = not significant. Means ± SEM are shown, sham (n ≥ 8), CAS (n ≥ 8), OVA (n ≥ 8). Results represent two independently performed experiments. Significance is represented by *P < .05, **P < .01, ***P < .001, ANOVA or Kruskal-Wallis with Dunnett's multiple comparisons test

FIGURE 4 Increased lung inflammation is observed in OVA allergic offspring from OVA allergic dams. Graphs show OVA allergic offspring from sham-treated dams or dams with allergic airway inflammation to either CAS or OVA during pregnancy. A, Total serum IgG1, OVA-specific IgG1 and OVA-specific IgE. B, Differential cell counts in the BAL: leucocytes, eosinophils, lymphocytes and macrophages. C, Quantification of lung tissue and lung draining lymph node FoxP3 staining from OVA allergic offspring. D, Representative images of offspring lung tissue immunohistochemistry—OVA allergic offspring from sham-treated and allergic mothers. Scale bar = 100 µm. Means ± SEM are shown, sham-OVA (n = 16), CAS-OVA (n = 17), OVA-OVA (n = 15). In each group, a minimum of 2 offspring from at least 6 different mothers were included. Results represent two independently performed experiments. Significance is represented by *P < .05, **P < .01, ***P < .001, ANOVA or Kruskal-Wallis with Dunnett's multiple comparisons test



Offspring lung tissue FoxP3



this reason, we next examined Asn-297 IgG antibody glycosylation in both maternal and offspring sera as a possible mediator for the increased airway inflammation observed in our OVA-OVA offspring. In OVA allergic mothers, analysis of IgG1 glycosylation patterns revealed significantly increased levels of pro-inflammatory G0 compared to CAS allergic dams (Figure 5A). Analysis of the offspring of these mothers revealed an amplification of this effect, with OVA-OVA offspring having significantly increased levels of G0 compared to both sham-OVA and CAS-OVA offspring (Figure 5B).

The addition of sialic acid to the IgG Asn-297 region is strongly anti-inflammatory, and reduced sialylation is associated with a pro-inflammatory phenotype.³⁰ In our study, analysis of maternal sialylation revealed that OVA allergic dams had significantly decreased percentages of IgG1 sialic acid residues, including G1S1, G2S1, G3S1 and G2S2 compared to the sham-sensitized group (Figure 5A). Though a similar trend was apparent in IgG1 sialylation in CAS allergic dams, only G3S1 and G2S2 were significant. Examination of the offspring IgG1 revealed that these sialic acid reductions were mirrored and amplified in adult allergic offspring. The strongest decreases were observed when mother and offspring were sensitized to the same allergen (OVA-OVA) with

G1S1, G2S1, G3S1 and G2S2 being significantly reduced compared to sham-OVA offspring. When mother and offspring were sensitized to different allergens (CAS-OVA), decreases in offspring IgG1 sialylation were also observed, but to a lesser extent (Figure 5B).

In addition to IgG1, IgG3 antibodies also showed altered glycosylation patterns. Though there were no differences in pro-inflammatory G0 between any of the groups, anti-inflammatory sialylation (G1S1 and G2S1) was significantly decreased in OVA mothers and their OVA allergic offspring. It is notable that no differences were observed in CAS mothers or CAS-OVA offspring when compared to sham-exposed mothers or sham-OVA offspring, respectively (Figure 6A,B).

3.4 | Maternal serum IgG1 glycosylation percentages are strongly correlated with IgG1 glycosylation percentages in adult allergic offspring

To better assess the relationship between maternal and offspring IgG glycosylation patterns, we next calculated Pearson correlation coefficients for IgG1 and IgG3 glycosylation subtypes. As shown in

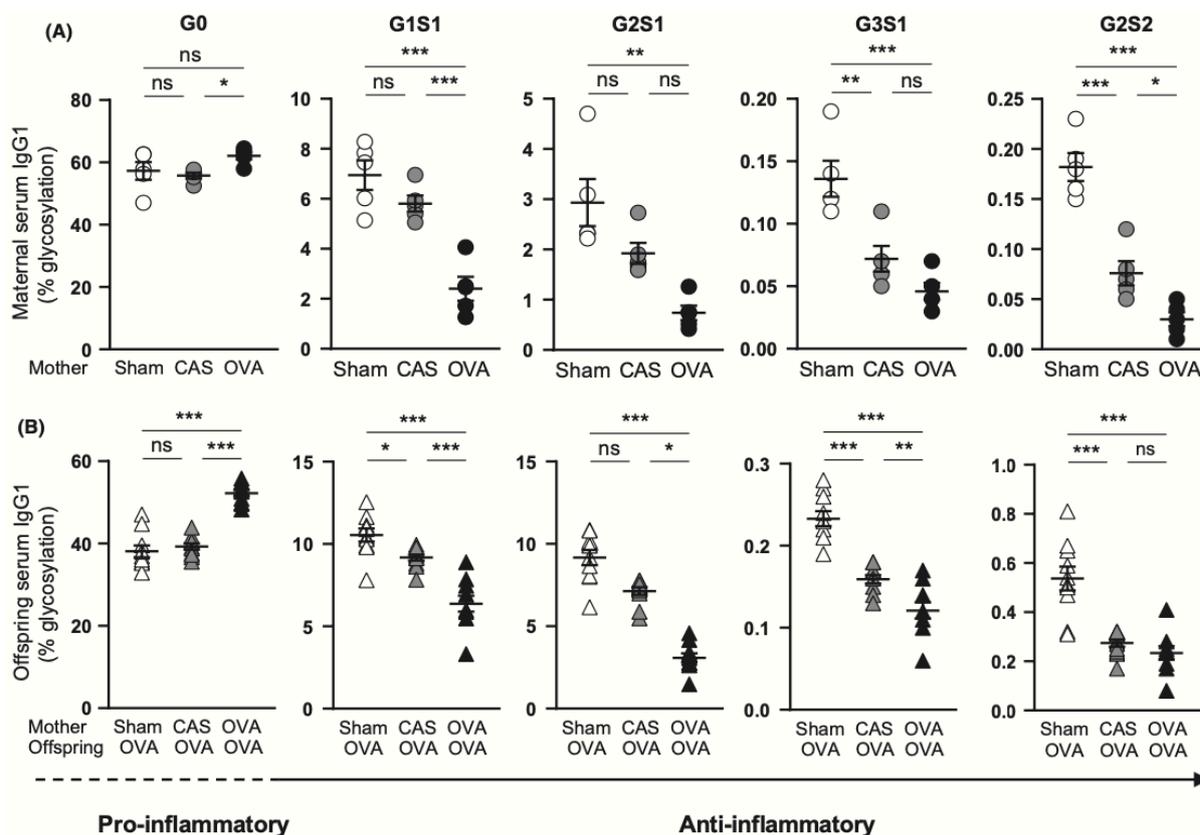


FIGURE 5 Serum IgG1 antibodies from allergic mothers and their adult allergic offspring have significantly increased pro-inflammatory (agalactosylated) and reduced anti-inflammatory (sialylated) glycans. A, Asn-297 glycosylation of maternal serum IgG1 antibodies from sham-treated, as well as CAS and OVA allergic mothers. B, Asn-297 glycosylation of serum IgG1 antibodies from OVA allergic offspring derived from sham-treated, CAS or OVA allergic mothers. Means ± SEM are shown: maternal sham (n = 5), maternal CAS (n = 5), maternal OVA (n = 5), sham-OVA offspring (n = 10), CAS-OVA offspring (n = 11) and OVA-OVA offspring (n = 10). Results represent two independently performed experiments. Significance is represented by **P* < .05, ***P* < .01, ****P* < .001, ANOVA or Kruskal-Wallis with Dunnett's multiple comparisons tests

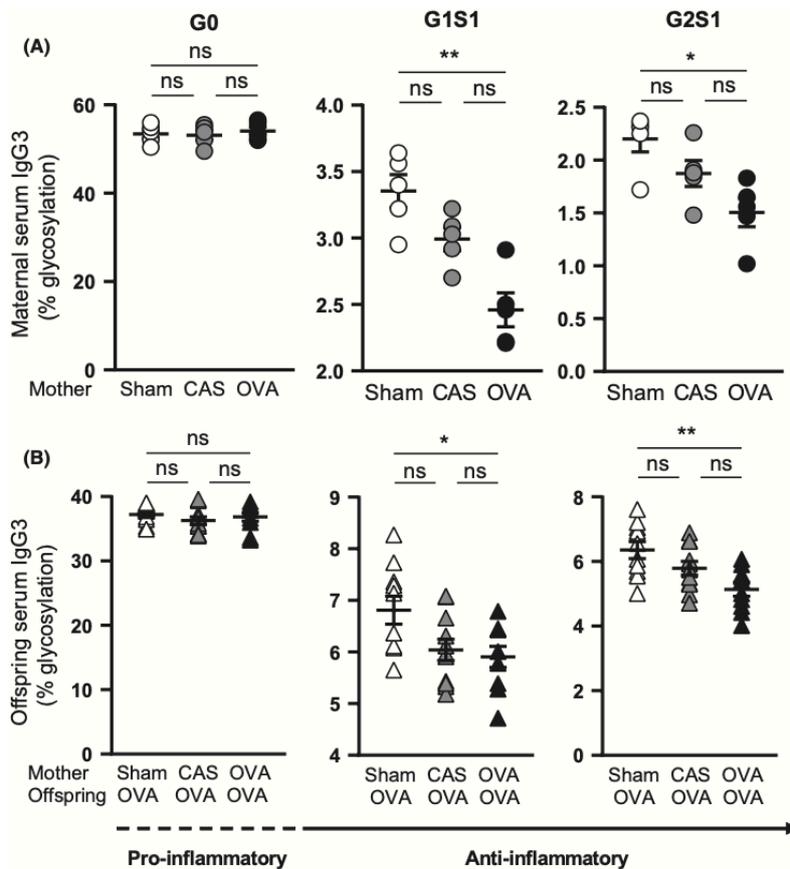


FIGURE 6 Serum IgG3 antibodies from OVA allergic mothers and their adult OVA allergic offspring have significantly reduced anti-inflammatory (sialylated) glycans. A, Asn-297 glycosylation of maternal serum IgG3 antibodies from sham-treated, as well as CAS and OVA allergic mothers. B, Asn-297 glycosylation of serum from OVA allergic offspring derived from sham-treated, CAS or OVA allergic mothers. Means \pm SEM are shown: maternal sham ($n = 5$), maternal CAS ($n = 5$), maternal OVA ($n = 5$), sham-OVA offspring ($n = 10$), CAS-OVA offspring ($n = 11$) and OVA-OVA offspring ($n = 10$). Results represent two independently performed experiments. Significance is represented by * $P < .05$, ** $P < .01$, ANOVA or Kruskal-Wallis with Dunnett's multiple comparisons test

Figure 7A, maternal and offspring IgG1-G0 percentages were significantly correlated, with a moderate r of 0.43. Supporting our hypothesis further, in all sialylated IgG1 groups, mothers and offspring were significantly and strongly correlated, with r ranging from 0.74 to 0.89. Contrarily, measurement of IgG3 correlation between mothers and offspring revealed that only IgG3-G1S1 was significant with a moderate r of 0.37 (Figure 7B). These data indicate that aglycosylated and sialylated IgG1 percentages are strongly correlated between mothers and their adult allergic offspring.

In summary, analysis of IgG1 Asn-297 glycosylation patterns revealed that 1) allergic dams have increased pro-inflammatory (G0) and decreased anti-inflammatory (sialic acid) glycan structures in the Fc region compared to sham controls, 2) the imbalance of pro- and anti-inflammatory IgG is aggravated in OVA allergic mothers compared with CAS allergic mothers, and 3) the IgG1 glycosylation patterns found in the mothers persisted in adult allergic offspring.

4 | DISCUSSION

Using a mouse model, we demonstrate here that maternal allergic airway inflammation during pregnancy is associated with an increased airway inflammation in the offspring. Further, the extent of this response was clearly associated with mothers and offspring

being sensitized to the same allergen (OVA-OVA). In contrast to CAS-OVA offspring, OVA-OVA offspring had significantly increased allergic airway inflammation and decreased numbers of pulmonary Treg cells compared to sham-OVA offspring. Glycosylation patterns in OVA mothers and their OVA allergic offspring were also significantly more pro-inflammatory than in the CAS-OVA or sham-OVA group.

Analysis of the humoral immune response revealed that CAS-OVA offspring had significantly increased levels of total IgG1, and both CAS-OVA and OVA-OVA had significantly increased OVA-specific IgG1 in the serum, compared to sham-OVA allergic offspring. OVA-specific serum IgE, however, was significantly decreased in OVA-OVA offspring. While decreased allergen-specific IgE titres may initially seem counterintuitive for an asthma risk model, this is likely because both mother and offspring were sensitized to the same allergen. Supporting this, Jarrett and Hall showed in rats that maternal sensitization with OVA before pregnancy resulted in suppression of OVA-specific IgE and enhanced production of IgG in OVA-sensitized pups. The effect was allergen-specific as maternal immunization with keyhole limpet haemocyanin did not suppress IgE in the offspring.³¹ As the underlying mechanisms of offspring IgE suppression are not fully understood, our model provides an excellent opportunity to further study this phenomenon.

An additional puzzling aspect of our study was the question of how maternal allergy led to differential allergen-specific effects

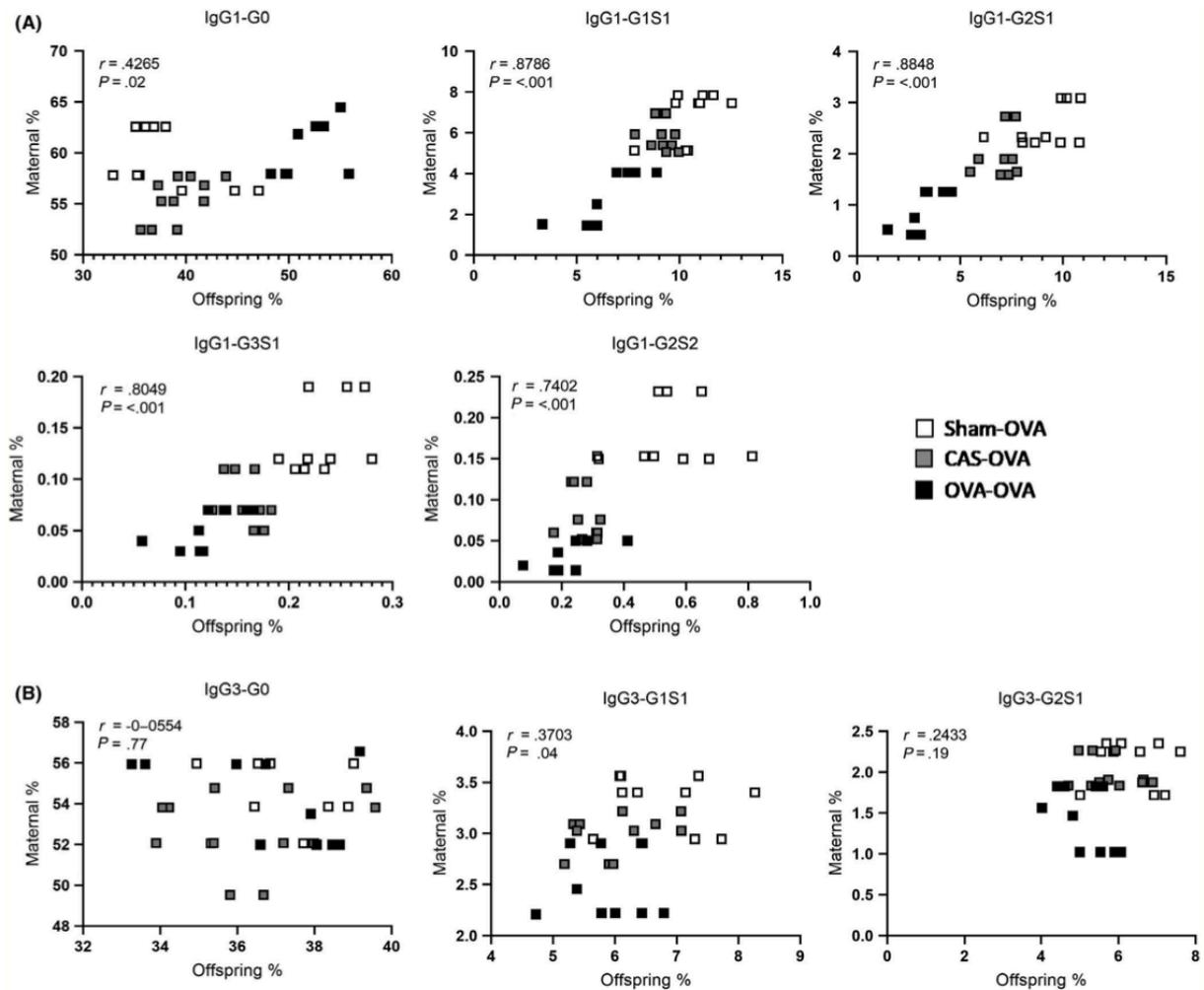


FIGURE 7 Maternal serum Asn-297 IgG1 glycosylation percentages are strongly correlated with adult allergic offspring IgG1 glycosylation percentages. Correlation analysis showing A) correlation between maternal and adult allergic offspring IgG1 glycosylation percentages and B) correlation between maternal and adult allergic offspring IgG3 glycosylation percentages. Sham-OVA offspring ($n = 10$), CAS-OVA offspring ($n = 11$), OVA-OVA offspring ($n = 10$) compared with their respective mothers. Correlation is given in Pearson's r

in the offspring. We propose for the first time that IgG antibody glycosylation is an important additional factor that could substantially contribute to distinct aspects of the asthma phenotype. Glycosylation is a critical posttranslational protein modification, and it has been described that N-linked glycans in the Fc region influence antibody effector functions. The addition of sialic acid residues onto these glycan chains generates IgG molecules that bind mouse Icam-3 grabbing non-integrin-related 1 (SIGNR1), which actively induces an anti-inflammatory cascade.³⁰ Illustrating this, successful allergen-specific immunotherapy in allergic patients is correlated with increased IgG sialylation.^{19,32} In our model of maternal transmission of asthma risk, the group with the most severe airway inflammation (OVA-OVA offspring) had significantly increased agalactosylated IgG1 levels as well as decreased sialic acid residues on both IgG1 and IgG3 molecules, indicating a strong pro-inflammatory status.

The CAS-OVA offspring, which showed a trend towards increased asthma severity, also had decreased IgG1 and IgG3 sialylation, though to a much lesser extent than the OVA-OVA offspring. Thus, maternal allergic airway inflammation during pregnancy was associated with decreased frequencies of protective IgG antibodies in the offspring.

Finally, to explore the relationship between mother and offspring, we also examined serum IgG glycosylation in asthmatic dams which were recall challenged to allergen. Maternal IgG1 serum glycosylation patterns strongly correlated with the patterns observed in allergic offspring. This indicates that maternal IgG antibodies may play a role in offspring allergy development, and highlights the importance of measuring antibody glycosylation in addition to concentration in allergy studies. Our results highlight a key role for IgG glycosylation in the transgenerational transmission

of offspring asthma risk that warrants further investigation. Since the current study measured IgG glycosylation in recall challenged mothers and adult allergic offspring, future studies will include analyses of mothers and offspring at several gestational and neonatal time points. Our newly developed mouse model provides a resource to understand in more detail how maternal IgG glycosylation during pregnancy influences offspring immune system development and subsequent susceptibility to inflammatory diseases such as asthma later in life.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the staff at the animal research facility of the Charité - Universitätsmedizin Berlin. Additionally, we would also like to sincerely thank Maria Daniltchenko, Petra Moschansky, Petra Buße, Christine Hollauer and Maximilian Pankla for their technical assistance. The present study is part of the doctoral thesis of Elisa B. Sodemann and Ekaterina Boiarina. Christoph Tabeling is a participant in the BIH-Charité Clinician Scientist Program funded by the Charité - Universitätsmedizin Berlin, and the Berlin Institute of Health. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to Melanie L. Conrad (CO 1058/3-1) and to Martin Witzenth (SFB-TR84 C3 and C6).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Melanie L. Conrad  <https://orcid.org/0000-0002-8811-5536>

REFERENCES

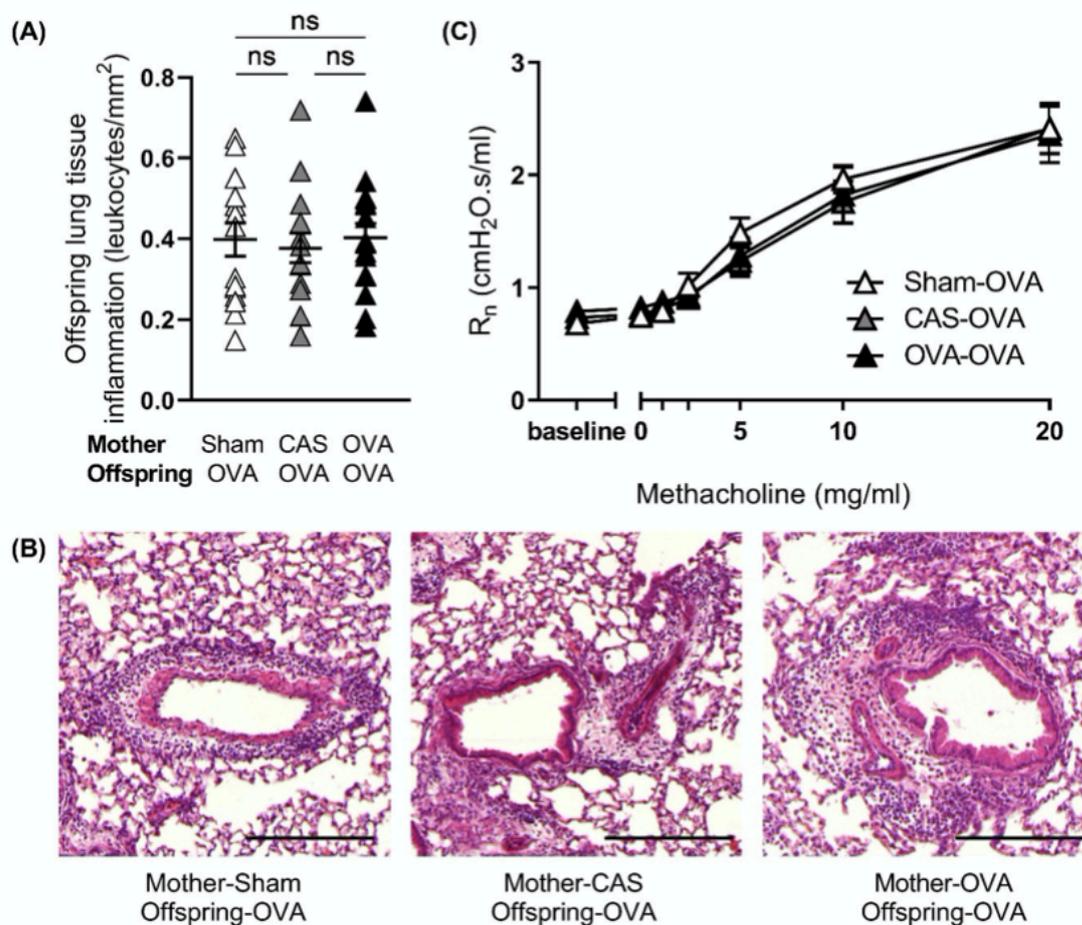
- Becker AB, Abrams EM. Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2017.
- Gatford KL, Wooldrige AL, Kind KL, Bischof R, Clifton VL. Pre-birth origins of allergy and asthma. *J Reprod Immunol*. 2017;123:88-93.
- Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002;347(12):911-920.
- Robijn AL, Murphy VE, Gibson PG. Recent developments in asthma in pregnancy. *Curr Opin Pulm Med*. 2019;25(1):11-17.
- Mirzakhani H, Carey VJ, Zeiger R, et al. Impact of parental asthma, prenatal maternal asthma control, and vitamin D status on risk of asthma and recurrent wheeze in 3-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 2018;49(4):419-429.
- Lim RH, Kobzik L, Dahl M. Risk for asthma in offspring of asthmatic mothers versus fathers: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10134.
- Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(1):176-181.
- Hamada K, Suzaki Y, Goldman A, et al. Allergen-independent maternal transmission of asthma susceptibility. *J Immunol*. 2003;170(4):1683-1689.
- Fedulov AV, Kobzik L. Allergy risk is mediated by dendritic cells with congenital epigenetic changes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(3):285-292.
- Hubeau C, Apostolou I, Kobzik L. Adoptively transferred allergen-specific T cells cause maternal transmission of asthma risk. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1931-1939.
- de Haan N, Falck D, Wuhrer M. Monitoring of Immunoglobulin N- and O-glycosylation in Health and Disease. *Glycobiology*. 2019. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz048>
- Ahmed AA, Giddens J, Pincetic A, et al. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. *J Mol Biol*. 2014;426(18):3166-3179.
- Jennewein MF, Alter G. The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. *Trends Immunol*. 2017;38(5):358-372.
- Wuhrer M, Stavenhagen K, Koeleman CA, et al. Skewed Fc glycosylation profiles of anti-proteinase 3 immunoglobulin G1 autoantibodies from granulomatosis with polyangiitis patients show low levels of bisection, galactosylation, and sialylation. *J Proteome Res*. 2015;14(4):1657-1665.
- Kemma MJ, Plomp R, van Paassen P, et al. Galactosylation and Sialylation Levels of IgG Predict Relapse in Patients With PR3-ANCA Associated Vasculitis. *EBioMedicine*. 2017;17:108-118.
- Vuckovic F, Kristic J, Gudelj I, et al. Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(11):2978-2989.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*. 2006;313(5787):670-673.
- Oefner CM, Winkler A, Hess C, et al. Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(6):1647-55 e13.
- Schwab I, Mihai S, Seeling M, Kasperkiewicz M, Ludwig RJ, Nimmerjahn F. Broad requirement for terminal sialic acid residues and FcγRIIB for the preventive and therapeutic activity of intravenous immunoglobulins in vivo. *Eur J Immunol*. 2014;44(5):1444-1453.
- de Haan N, Reiding KR, Driessen G, van der Burg M, Wuhrer M. Changes in Healthy Human IgG Fc-Glycosylation after Birth and during Early Childhood. *J Proteome Res*. 2016;15(6):1853-1861.
- Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(8):1246-1254.
- Teilmann AC, Nygaard Madsen A, Holst B, Hau J, Rozell B, Abelson KS. Physiological and pathological impact of blood sampling by retro-bulbar sinus puncture and facial vein phlebotomy in laboratory mice. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e113225.
- Paulissen G, El Hour M, Rocks N, et al. Control of allergen-induced inflammation and hyperresponsiveness by the metalloproteinase ADAMTS-12. *J Immunol*. 2012;189(8):4135-4143.
- John-Schuster G, Hager K, Conlon TM, et al. Cigarette smoke-induced iBALT mediates macrophage activation in a B cell-dependent manner in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(9):L692-706.
- Zaytseva OO, Jansen BC, Hanic M, et al. MlgGGly (mouse IgG glycosylation analysis) - a high-throughput method for studying Fc-linked IgG N-glycosylation in mice with nanoUPLC-ESI-MS. *Sci Rep*. 2018;8(1):13688.
- Hamzaoui A, Ammar J, Hamzaoui K. Regulatory T cells in induced sputum of asthmatic children: association with inflammatory cytokines. *Multidiscip Respir Med*. 2010;5(1):22-30.
- Mamessier E, Nieves A, Lorec AM, et al. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy*. 2008;63(9):1202-1210.
- Seeling M, Bruckner C, Nimmerjahn F. Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(10):621-630.
- Alter G, Ottenhoff THM, Joosten SA. Antibody glycosylation in inflammation, disease and vaccination. *Semin Immunol*. 2018;39:102-110.
- Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16(1):7-14.

31. Jarrett E, Hall E. Selective suppression of IgE antibody responsiveness by maternal influence. *Nature*. 1979;280(5718):145-147.
32. Collin M, Ehlers M. The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. *Exp Dermatol*. 2013;22(8):511-514.

How to cite this article: Sodemann EB, Dähling S, Klopffleisch R, et al. Maternal asthma is associated with persistent changes in allergic offspring antibody glycosylation. *Clin Exp Allergy*. 2020;50:520-531. <https://doi.org/10.1111/cea.13559>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.



Supplementary Figure 1: Maternal experimental asthma during pregnancy does not influence allergic offspring lung tissue inflammation or airway reactivity.

Graphs show OVA allergic offspring from sham treated dams or dams with allergic airway inflammation to either CAS or OVA during pregnancy. (A) Allergic offspring lung tissue inflammation. Sham-OVA ($n=16$), CAS-OVA ($n=17$), OVA-OVA ($n=15$). (B) Representative images of allergic offspring lung histology. Scale bar = 100 μm. (C) Allergic offspring airway reactivity data ($n=10$ /group). Results represent two independently performed experiments. Means \pm SEM are shown. ns = not significant, lung tissue inflammation: ANOVA or Kruskal-Wallis with Dunnett's multiple comparisons test. Airway reactivity data were compared for each dose of methacholine using a two-way ANOVA.

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Sodemann EB, Dähling S, Klopffleisch R, Boiarina E, Cataldo D, Alhasan MM, Yildirim A, Witzenrath M, Tabeling C, Conrad ML. Maternal asthma is associated with persistent changes in allergic offspring antibody glycosylation. *Clinical and Experimental Allergy*. 2020;50(4):520–531.

Alhasan MM, Cait AM, Heimesaat MM, Blaut M, Klopffleisch R, Wedel A, Conlon TM, Yildirim AÖ, Sodemann EB, Mohn WW, Bereswill S, Conrad ML. Antibiotic use during pregnancy increases offspring asthma severity in a dose-dependent manner. *Allergy*. 2020;00:1-12.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Dr. Melanie Conrad für die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit der Promotion. Sie hat mich in jeder Phase tatkräftig unterstützt und stand mir bei jedem Problem hilfsbereit zur Seite. Außerdem möchte ich mich bei PD Dr. Markus Heimesaat sowie bei allen an dieser Arbeit beteiligten Personen bedanken. Ihre Beteiligung bei der Durchführung des Tierversuchs sowie die produktiven Gespräche und Anregungen unterstützten und inspirierten mich auf diesem Weg. Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mutter und meinem Lebensgefährten, danke ich für ihre Geduld und Ermutigungen während des gesamten Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.