

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von Geschlecht, Alter und Stamm für die  
allergische Immunantwort im Mausmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Gerstenberg

aus Offenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Worm

2. Prof. Dr. med. H. Renz

3. Prof. Dr. med. D. Groneberg

Datum der Promotion: 20.11.2009

Meinen Eltern

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
1.1	<b>Allergie und Atopie</b>	<b>8</b>
1.1.1	Schlüsselzellen der humoralen allergischen Immunantwort	8
1.1.2	Effektorzellen der lokalen allergischen Reaktion	9
1.2	<b>Epidemiologie</b>	<b>10</b>
1.2.1	Geschlechtsspezifische Inzidenzen von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis	11
1.2.1.1	Allergisches Asthma und allergische Rhinokonjunktivitis	11
1.2.1.2	Atopische Dermatitis	12
1.2.2	Geschlechtsspezifische Inzidenzen von Autoimmunerkrankungen	12
1.3	<b>Sexualhormone</b>	<b>13</b>
1.3.1	Überblick über Synthese und Sekretion der Geschlechtshormone	13
1.3.2	Einfluss von Estrogen auf das Immunsystem	15
1.3.2.1	Estrogen und die B-Zelle	16
1.3.2.2	Estrogen und die T-Zelle	17
1.3.2.3	Estrogen und weitere Effektorzellen der allergischen Immunantwort	17
1.3.3	Einfluss von Testosteron auf das Immunsystem	18
1.3.3.1	Testosteron und die B- und T-Zellen	18
1.3.3.2	Testosteron und weitere Effektorzellen der allergischen Immunantwort	18
1.4	<b>Allergien im Mausmodell</b>	<b>18</b>
1.4.1	Ovalbumin-induzierte allergische Immunantwort bei der Maus	19
1.4.2	Bedeutung des Mausstammes für die Ausprägung der allergischen Immunantwort: <i>high-responder</i> – <i>low-responder</i>	20
1.4.3	Mausmodelle für die lokale kutane allergische Immunantwort	20
<b>2</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
3.1	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>

<b>3.2 Versuchstiere .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Tierhaltung .....	23
3.2.2 Versuchsaufbau und Versuchstiere .....	23
<b>3.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials und Protokolle .....</b>	<b>25</b>
3.3.1 Anästhesie und Tötung .....	25
3.3.2 Serum .....	25
3.3.3 <i>Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay</i> (ELISA) .....	26
3.3.4 <i>Radio-Immunsorbent-Assay</i> (RIA) .....	28
3.3.5 Milzpräparation und Einzelzellsuspension .....	28
3.3.6 <i>Enzyme-linked-immunospot-assay</i> (ELISPOT) .....	29
3.3.7 Milzzellkultur.....	29
3.3.8 <i>FlowCytomix</i> -Analysen.....	30
3.3.9 <i>Ear-swelling</i> .....	30
3.3.10 Histologie .....	31
<b>3.4 Statistik.....</b>	<b>31</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der systemischen     allergischen Immunantwort bei adulten BALB/c-Mäusen .....</b>	<b>33</b>
4.1.1 Immunglobuline.....	33
<b>4.2 Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der systemischen     allergischen Immunantwort bei BALB/c-Mäusen .....</b>	<b>34</b>
4.2.1 Immunglobuline.....	34
4.2.2 OVA-IgE-sezernierende Zellen in der Milz .....	35
4.2.3 Anzahl der Leukozyten pro Milz .....	36
4.2.4 Zytokinantwort.....	36
<b>4.3 Vergleich der systemischen allergischen Immunantwort zwischen nicht-     operierten und gonadektomierten 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.....</b>	<b>37</b>
4.3.1 Immunglobuline.....	37
4.3.2 Anzahl der Leukozyten pro Milz .....	39

4.3.3	Zytokinantwort.....	39
<b>4.4</b>	<b>Serumestradiolkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5</b>	<b>Stammspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen.....</b>	<b>45</b>
4.5.1	Immunglobuline.....	45
4.5.2	Anzahl der Leukozyten pro Milz .....	46
<b>4.6</b>	<b>Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei C57BL/6-Mäusen.....</b>	<b>47</b>
4.6.1	Immunglobuline.....	47
4.6.2	Anzahl der Leukozyten in der Milz .....	48
<b>4.7</b>	<b>Serumestradiolkonzentrationen bei 10- und 17-Wochen-alten C57BL/6-Mäusen .....</b>	<b>49</b>
<b>4.8</b>	<b>Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der lokalen allergischen Immunantwort bei C57BL/6-Mäusen.....</b>	<b>49</b>
4.8.1	<i>Ear-swelling</i> .....	49
4.8.2	Histologie .....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss des Geschlechts auf die systemische allergische Immunantwort bei BALB/c-Mäusen .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss von Geschlecht und Alter auf die systemische allergische Immunantwort bei BALB/c-Mäusen .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss der Gonadektomie auf die systemische allergische Immunantwort bei BALB/c-Mäusen .....</b>	<b>60</b>
<b>5.4</b>	<b>Einfluss des Stammes auf die systemische allergische Immunantwort bei C57BL/6-Mäusen.....</b>	<b>68</b>
<b>5.5</b>	<b>Einfluss von Geschlecht und Alter auf die systemische allergische Immunantwort bei C57BL/6 Mäusen.....</b>	<b>69</b>

<b>5.6 Einfluss von Geschlecht und Alter auf die lokale allergische Immunantwort bei C57BL/6 Mäusen.....</b>	<b>70</b>
<b>5.7 Schwierigkeiten des Mausmodells.....</b>	<b>71</b>
<b>5.8 Weiterführende Ausblicke.....</b>	<b>71</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>A ANHANG.....</b>	<b>75</b>
<b>A.1 Abkürzungen.....</b>	<b>75</b>
<b>A.2 Geräte.....</b>	<b>77</b>
<b>A.3 Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>78</b>
<b>A.4 Software.....</b>	<b>78</b>
<b>A.5 Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>79</b>
<b>A.6 Antikörper und sekundäre Reagenzien.....</b>	<b>80</b>
<b>A.7 Puffer und Lösungen.....</b>	<b>80</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
<b>8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>87</b>
<b>9 DANKSAGUNG.....</b>	<b>88</b>
<b>10 LEBENSLAUF.....</b>	<b>90</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Allergie und Atopie

Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis sind unter anderem durch eine erhöhte Bereitschaft gekennzeichnet, auf Antigene mit hohen Immunglobulin E (IgE)-Serumkonzentrationen zu reagieren. Zum atopischen Formenkreis gehören das allergische Asthma, die allergische Rhinokonjunktivitis und die atopische Dermatitis (AD). Neben endogenen Faktoren, wie einer genetischen Disposition, beeinflussen zahlreiche exogene Faktoren die Pathogenese des jeweiligen Krankheitsbildes. Klinisch zeigen sich zum Beispiel eine Hyperreaktivität von Haut und Schleimhaut, wobei auffällt, dass die Reaktionen auch an nicht direkt exponierten Körperregionen in Erscheinung treten. Daher auch die griechische Bezeichnung „Atopie“, Ortlosigkeit, als Überbegriff für Erkrankungen mit diesen Merkmalen.

Im Folgenden soll neben einem kurzen Überblick über die molekularen Mechanismen der allergischen Reaktion (Kap. 1.1.1, 1.1.2) auf epidemiologische Auffälligkeiten der häufigsten atopischen Erkrankungen eingegangen werden (Kap. 1.2). Von besonderem Interesse sind dabei die geschlechts- und altersspezifischen Unterschiede.

### 1.1.1 Schlüsselzellen der humoralen allergischen Immunantwort

Für die Ausbildung der humoralen allergischen IgE-Immunantwort sind die Interaktion von T- und B-Zellen sowie der Klassenwechsel der B-Zelle zur IgE sezernierenden Plasmazelle entscheidende Schritte.

Beim Erstkontakt wird das Antigen von antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und prozessiert. In Form von Peptidfragmenten wird es an den Histokompatibilitätskomplex der Klasse II gekoppelt und an der Oberfläche präsentiert. Der Kontakt des antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR) mit diesem Komplex führt zur T-Zell-Aktivierung und zur T-Zell-Differenzierung naiver  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen ( $T_H0$ ) in antigen-spezifische, aktivierte  $T_H2$ -Zellen. Die Mechanismen, die die T-Zell-Differenzierung hin zu einer  $T_H2$ -Antwort bahnen, sind nicht vollständig aufgeklärt. Da aber T-Zellen zwischen eigen und fremd unterscheiden können, werden sie für die Allergie zu Schlüsselzellen, indem sie ein eigentlich harmloses Umweltantigen nicht tolerieren und mit dem entsprechenden Zytokinmilieu maßgeblich das weitere Geschehen orchestrieren. Im Gegensatz zu den  $T_H1$ -Zellen, die unter anderem mittels

Interferon  $\gamma$  (IFN) die zelluläre Immunantwort steuern, sezernieren  $T_H2$ -Zellen Interleukine (IL) wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die die humorale Immunantwort begünstigen.

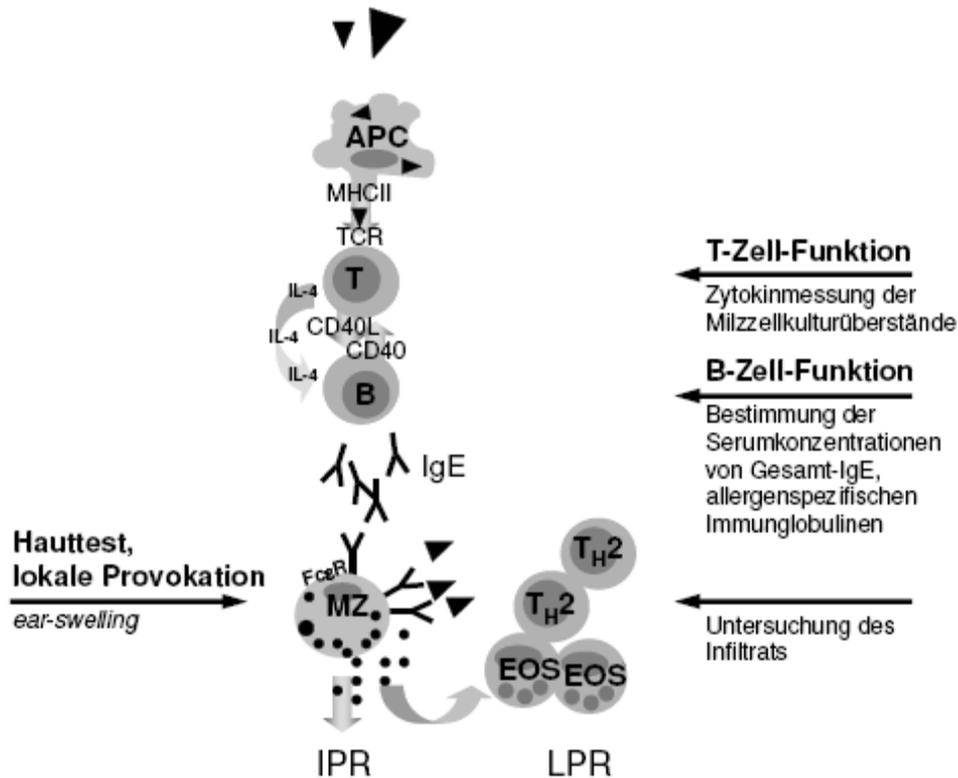
IL-4 und IL-13 sowie der Oberflächenmarker CD40-Ligand sind die wichtigsten Signalmoleküle für die B-Zell-Proliferation und -Differenzierung zu IgE-sezernierenden Plasmazellen [1]. In der naiven B-Zelle, die IgM und IgD exprimiert, findet der Klassenwechsel zur IgE exprimierenden Zelle direkt von IgM zu IgE oder sequenziell über IgG<sub>4</sub> statt [2, 3].

### 1.1.2 Effektorzellen der lokalen allergischen Reaktion

Zirkulierendes antigen-spezifisches IgE bindet primär an seine hochaffinen Rezeptoren (Fc $\epsilon$ -RI) auf Mastzellen, basophilen Granulozyten und Langerhans-Zellen. Vor allem Mastzellen sind in der zweiphasigen allergischen Immunantwort die Effektorzellen. Das über Fc $\epsilon$ -RI fixierte IgE bindet polyvalentes Antigen. Die Bindung resultiert in einer Quervernetzung zweier Fc $\epsilon$ -RI-Moleküle auf der Zellmembran der Mastzellen. Es erfolgt eine Degranulation mit Freisetzung von Histamin, Prostaglandinen und anderen präformierten Mediatoren.

Die innerhalb von Sekunden einsetzende akute Phase (*immediate phase reaction*, IPR) ist gekennzeichnet durch die gefäßdilatierenden und permeabilitätssteigernden lokalen und systemischen Wirkungen, die sich als klinische Symptome der Sofort-Typ-Allergie (Allergie-Typ I) nach Coombs und Gell 1963 zeigen. Die späte Phase (*late phase reaction*, LPR) entwickelt sich innerhalb von 8 bis 12 Stunden und erreicht ihr Maximum nach ungefähr 24 Stunden. Sie wird verursacht durch die Neusynthese und Freisetzung von Mediatoren wie Leukotrienen, Zytokinen und Chemokinen der aktivierten Mastzellen, die die Entzündung aufrechterhalten und weitere Entzündungszellen rekrutieren. Vor allem  $T_H2$ -Zellen und eosinophile Granulozyten verstärken die lokale Schwellung und führen unter anderem zu einer weiteren Kontraktion der glatten Muskulatur. Bei allergischem Asthma tritt dies klinisch als erhöhte Atemwegsreaktivität selbst auf unspezifische Bronchokonstriktoren wie Histamin und Methacholin in Erscheinung und wird messbar. Das durch aktivierte Mastzellen,  $T_H2$ -Zellen und Eosinophile unterhaltene Zytokinmilieu führt darüber hinaus zur Chronifizierung des Prozesses.

Die nachfolgende Abbildung zeigt zusammenfassend die verschiedenen Interaktionsschritte der allergischen Immunantwort schematisch und illustriert Analysemöglichkeiten im Rahmen einer experimentellen Untersuchung.



**Abb. 1: Schema der Allergie vom Sofort-Typ, Angriffspunkte für Untersuchungen auf zellulärer Ebene und klinisches Erscheinungsbild.**

Erstellt nach [1] und modifiziert nach [4]. MZ = Mastzelle, EOS = Eosinophiler Granulozyt

## 1.2 Epidemiologie

Die insgesamt steigende Prävalenz atopischer Erkrankungen in den westlichen Industrienationen hat innerhalb der letzten Jahrzehnte dazu geführt, dass das allergische Asthma, die allergische Rhinokonjunktivitis und die AD mittlerweile zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter gezählt werden müssen.

Daneben ist bei näherer Untersuchung der epidemiologischen Daten aufgefallen, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung atopischer Erkrankungen hat [5-7].

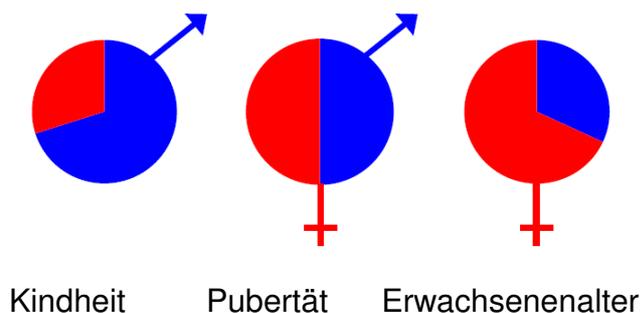
## 1.2.1 Geschlechtsspezifische Inzidenzen von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis

### 1.2.1.1 Allergisches Asthma und allergische Rhinokonjunktivitis

Alleine an Asthma bronchiale erkranken in Deutschland bis zu 10 % der Jugendlichen und 5 % der Erwachsenen. Die direkten und indirekten Kosten durch diese etwa 6 Millionen Patienten wird auf ungefähr 3 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [8]. Die Angaben zur Prävalenz der allergischen Rhinokonjunktivitis variieren stark, wobei von 3 bis 30 % ausgegangen werden kann und eine finnische Studie eine Verdreifachung der Prävalenzen von 1977 bis 1991 zeigt [9].

Die Pubertät markiert einen Umkehrpunkt in der geschlechtsspezifischen Inzidenz des allergischen Asthmas und der allergischen Rhinokonjunktivitis. Bis zur Pubertät sind Jungen häufiger betroffen [7]. Sie zeigen eine höhere Sensibilisierung (Pricktest-Reaktivität) und es werden höhere Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen gemessen [6, 10]. Ab dem jungen Erwachsenenalter steigt bei den Frauen die Inzidenz des allergischen Asthmas [11].

Die folgende Abbildung stellt die geschlechtsspezifischen Änderungen der Inzidenz in Abhängigkeit vom Alter grafisch dar. Die Pubertät zeigt sich als Wendepunkt bei der Erkrankungshäufigkeit.



**Abb. 2: Geschlechtsspezifische Inzidenz von Asthma im Lebensverlauf.**

Erstellt nach [10, 12], Kindheit 0-14 Jahre, Pubertät 15-19 Jahre, Erwachsenenalter 20-50 Jahre.

Klinisch zeigt sich darüber hinaus, dass die Prognose der betroffenen Mädchen bei überwiegend persistierender und progredienter Symptomatik schlechter ist als bei den Jungen [13].

Die Pubertät als Wendepunkt in der Inzidenz allergischer Erkrankungen und gleichzeitig als Periode intensivster, hormoneller Veränderungen legt nahe, dass die

Geschlechtshormone pathogenetisch bedeutsam sein könnten. Vor allem das weibliche Geschlechtshormon Estrogen scheint die Krankheitsentstehung zu begünstigen.

Dafür spricht auch die klinische Beobachtung, dass die Pricktest-Reaktivität der Frauen in Abhängigkeit vom Zyklus schwankt, mit stärkster Ausprägung in der Luteal- und Follikularphase, den Zeitpunkten des höchsten Estrogenspiegels [14]. Bei allergischem Asthma geben ein Drittel der Betroffenen eine Verschlechterung der Symptomatik während oder kurz vor der Menstruation an [15, 16]. Postmenopausale Estrogengabe resultiert in einem dosisabhängig gesteigerten Risiko für das Neuauftreten von Asthma im Erwachsenenalter (*adult-onset*) [17, 18].

#### 1.2.1.2 Atopische Dermatitis

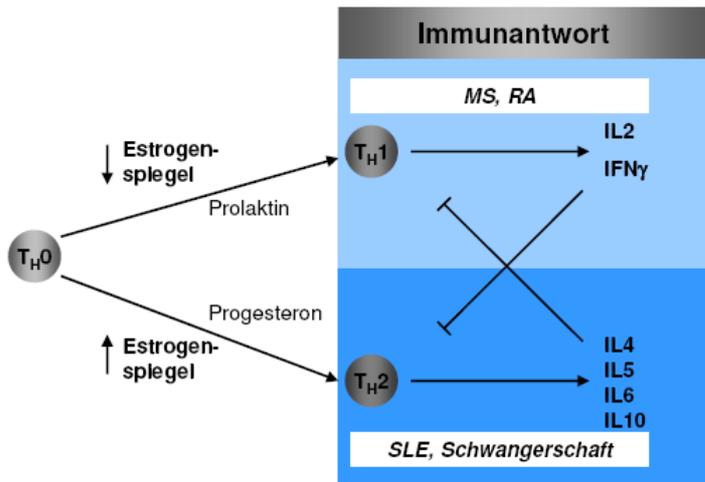
In Querschnittsstudien hat sich gezeigt, dass weniger als 3 % der Kinder, die vor 1960 geboren sind, an AD erkrankt sind [19]. Dieser Anteil ist in den Geburtenjahrgängen zwischen 1970 und 1980 auf 12 % angestiegen. In den letzten Jahren hat sich die Inzidenz weiter auf 15 % erhöht. Im Gegensatz zum allergischen Asthma und zur Rhinokonjunktivitis sind von der AD vor und nach der Pubertät mehr Frauen betroffen [10].

#### 1.2.2 Geschlechtsspezifische Inzidenzen von Autoimmunerkrankungen

Auch bei anderen Erkrankungen des Immunsystems lassen sich geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Erkrankungshäufigkeit finden. An dieser Stelle sei kurz auf die Autoimmunerkrankungen verwiesen. Schon früh ist bei diesen Erkrankungen, die sich unter anderem durch eine entgleiste humorale Immunantwort mit der Bildung von Autoantikörpern auszeichnen, eine Häufung von Frauen unter den Patienten aufgefallen. Bei Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) besteht das Patientenkollektiv zu 89 % aus Frauen. Ebenso sind bis zu 95 % der Patienten, die unter Hashimoto-Thyreoiditis oder dem Sjögren Syndrom leiden weiblich [20].

Ein Zusammenhang zwischen Serumkonzentrationen der Sexualhormone und Erkrankungshäufigkeit lässt sich insbesondere beim SLE herstellen. Hier korrelieren physiologische Schwankungen des Estrogenspiegels mit zu- und abnehmender Erkrankungshäufigkeit [21]. In der Kindheit sind zweieinhalb mal mehr Mädchen als Jungen betroffen – ein Verhältnis, das sich mit Beginn der Pubertät steigert, so dass schließlich 10 mal mehr Frauen betroffen sind. Mit Einsetzen der Menopause geht das Verhältnis wieder auf 2,5:1 zurück.

Whitacre *et al.* [22] beschreiben eine dosisabhängige Wirkung von Estrogen auf die T-Zell-Antwort. Wie in Abbildung 3 gezeigt, werden  $T_H2$ -vermittelte Autoimmunerkrankungen, bei denen die humorale Immunantwort entgleist, durch hohe Estrogenspiegel getriggert. SLE ist ein Beispiel für diesen Mechanismus. Niedrige Estrogenspiegel zeigen sich eher bei  $T_H1$ -gesteuerten, zellvermittelten Immunantworten, wie Multipler Sklerose (MS) und Rheumatoider Arthritis (RA).



**Abb. 3: Dosisabhängiger Einfluss von Estrogen auf die Immunantwort.**  
Modifiziert nach [22].

Durch neuentdeckte T-Zell-Subpopulationen wie den  $T_{reg}^-$  und  $T_H17$ -Zellen muss dieses Bild ergänzt werden. So zeigen einige Studien eine pathogenetische Bedeutung von  $T_H17$  für die Entstehung von Erkrankungen wie RA, die als primär  $T_H1$ -vermittelt galten [23]. Es finden sich erste Hinweise, dass  $T_H17$ -Zellen mit IL-17, ihrem Hauptzytokin auch eine Rolle bei  $T_H2$ -vermittelten Erkrankungen spielen [24].

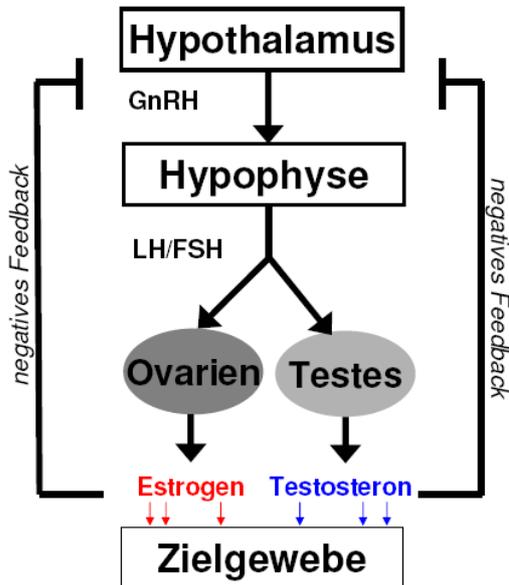
### 1.3 Sexualhormone

Ausgehend von der Überlegung, dass die mit der Pubertät einsetzende Hormonproduktion die Inzidenzen und somit die Pathogenese sowohl autoimmuner als auch allergischer Erkrankungen beeinflusst, werden im Folgenden die weiblichen und männlichen Sexualhormone näher betrachtet.

#### 1.3.1 Überblick über Synthese und Sekretion der Geschlechtshormone

Die Sekretion der Sexualhormone ist vorwiegend über den Regelkreis Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden (*Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis*, HPG-Achse) reguliert

und unterliegt einem negativen Feedback-Mechanismus. Abbildung 4 zeigt schematisch die Regulationsmechanismen der gonadalen Sekretion der Sexualhormone Estrogen und Testosteron.



**Abb. 4: Regulation der Sexualhormonsekretion.**

Bei geringen Serumkonzentrationen gonadaler Hormone werden im Hypothalamus vermehrt Releasing Hormone (RH), in diesem Fall *gonadotropin-releasing* Hormone (GnRH), freigesetzt. GnRH stimuliert wiederum die Sekretion von gonadotropen Hormonen aus der Hypophyse, dem follikel-stimulierenden Hormon (FSH) und dem luteinisierenden Hormon (LH). Über den Blutkreislauf gelangen FSH und LH an den Hauptort der Estrogensynthese bei der Frau, den Ovarien. Bei Männern gelangen sie zu den Testes. In beiden Fällen wird die Biosynthese und Sekretion der jeweiligen Hormone stimuliert. Hohe Serumkonzentrationen der Sexualhormone hingegen provozieren die Ausschüttung von Statinen, die die Hypophysenaktivität hemmen.

Sexualhormone sind Steroidhormone, die im Organismus endokrine, parakrine und autokrine Wirkungen entfalten. Von den weiblichen Geschlechtshormonen ist  $17\beta$ -Estradiol (E2) das wirksamste Estrogen. Die beiden weiteren Estrogene sind, nach abnehmender biologischer Aktivität geordnet, Estron und Estriol. Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) sind Androgene und zählen zu den männlichen Sexualhormonen. DHT besitzt eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor und ist potenter als Testosteron. Testosteron fungiert oft als Prohormon, kann aber je nach

Zielgewebe auch direkt seine Wirkung entfalten. Die Testes produzieren nach der Pubertät in der Regel 7000 µg und die Ovarien 300 µg Testosteron pro Tag. Beim Mann werden davon nur ein Vierhundertstel, also etwa 17,5 µg in Estradiol umgewandelt, während bei der Frau die Hälfte des Testosterons, etwa 150 µg, enzymatisch in Estradiol weiterverarbeitet wird. Cytochrom P<sub>450</sub>19 ist das hierfür verantwortliche Enzym, das sehr unterschiedliche Aktivitäten bei Männern und Frauen aufweist und das gewebsspezifisch unterschiedlich exprimiert wird [25].

Wichtige Syntheseschritte der Sexualhormone und die enzymatische Umwandlung von Androgenen in Estrogene werden in der folgenden Abbildung gezeigt.

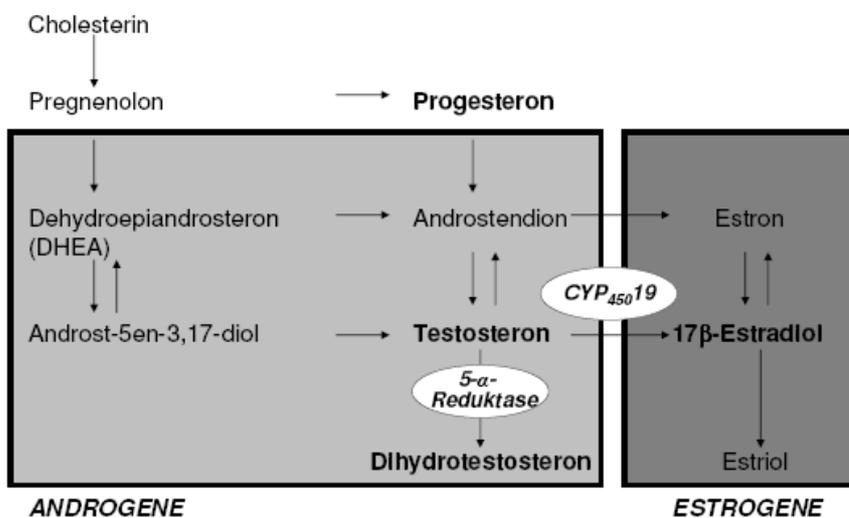


Abb. 5: Steroidhormone - Synthese der Sexualhormone.

Die Höhe der zirkulierenden Hormone erlaubt es nicht, Aussagen über deren Gesamtwirkung im Organismus zu treffen. Die Zielgewebe stellen häufig ihr spezifisches Hormonmilieu selbst her – angefangen bei unterschiedlicher Enzymaktivität bis hin zu Proteinen, die als Ko-Aktivatoren oder -Repressoren bekannt sind und die Bindung von Estrogen oder Testosteron an das Hormon-bindende-Element oder spezifische Transkriptionsstellen auf der DNA beeinflussen [25].

### 1.3.2 Einfluss von Estrogen auf das Immunsystem

Für das Verständnis der Wirkweise von Estrogenen im Zielgewebe ist deren Rezeptorinteraktion wichtig.

Bei den Estrogenrezeptoren werden 2 Subtypen unterschieden: der Estrogenrezeptor *alpha* (ER $\alpha$ ) und der Estrogenrezeptor *beta* (ER $\beta$ ). In einigen Geweben werden die

beiden Rezeptoren im gleichen Verhältnis zueinander ko-exprimiert, in anderen überwiegt ER $\alpha$  über ER $\beta$  oder umgekehrt. Jeder Subtyp übermittelt *in vivo* einerseits für sich spezifische andererseits auch ähnliche Signale wie der jeweils andere [26].

Vor allem mit Hilfe von Rezeptor-*knock-out*-Mäusen, ER $\alpha$ -*knock-out*, ER $\beta$ -*knock-out*, ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -*knock-out* lässt sich der Estrogeneinfluss auf das Immunsystem, speziell auf die B-Zell-Entwicklung analysieren.

#### 1.3.2.1 Estrogen und die B-Zelle

ER $\beta$  ist in B-Zellen in allen Entwicklungsstadien aufzufinden. ER $\alpha$  ist hingegen in B-Zellen der frühen Stadien im Knochenmark nicht nachweisbar, aber in der Milz in reifen B-Zellen nach stattgefundenem Immunglobulin-Klassenwechsel zu finden [27].

Estrogen kann als lipophiles Steroidhormon frei durch die Zellmembran diffundieren und mit Rezeptoren in der Zellmembran, im Zytoplasma oder Zellkern interagieren.

Der schnelle, nicht-genomische Weg erfolgt über Estrogenrezeptoren, die mittels Adapterproteinen in oder in unmittelbarer Nähe der Zellmembran gehalten werden. Es erfolgt eine G-Protein gekoppelte, zelluläre Antwort innerhalb weniger Sekunden bis Minuten [28-30]. Beim klassischen, genomischen Weg hingegen fungieren Komplexe aus Ligand und zytoplasmatischem oder nukleärem Rezeptor in erster Linie als Transkriptionsfaktor und erkennen Estrogen-responsive-Gene auf der DNA [31]. In B-Zellen reguliert Estrogen die Genexpression, unter anderem von CD22, SHP-1 und BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), hoch. CD22 und SHP-1 sind Proteine mit hemmender Wirkung auf B-Zell-Rezeptor (BCR)-vermittelte Signalkaskaden. Durch verminderte BCR-Kreuzvernetzung ist die Deletion autoreaktiver B-Zellen in der Sensitivität vermindert. BCL-2 ist ein anti-apoptotisch wirkendes Protein. So entgehen autoreaktive B-Zellen einerseits der Deletion und andererseits ist zusätzlich ihr Überleben verlängert [32]. Diese Tatsache spricht vor allem für ein gehäuftes Auftreten von Autoimmunerkrankungen bei Frauen im reproduktiven Alter.

*In vitro* Studien zeigen, dass E2 die IgM- und IgG-Produktion in humanen peripheren Blutzellen steigert [33, 34] und insgesamt zu einer polyklonalen B-Zell-Aktivierung führt. Lamason *et al.* [35] stellen in einer tierexperimentellen Studie fest, dass Geschlecht und Alter die Expression von Genen der Immunantwort in Milzzellen beeinflussen. Bei 3- bis 4-Wochen-alten, prä-pubertären Mäusen zeigen sich weder geschlechtsspezifische Unterschiede im Bereich der erworbenen noch im Bereich der angeborenen Immunität. Im Alter von 6 bis 9 Wochen, mit Einsetzen der Geschlechtsreife, deuten sich erste

Unterschiede an, die bei adulten Mäusen signifikant werden. Bei adulten Weibchen ist die Expression der Gene, die bei der erworbenen Immunität eine Rolle spielen, deutlich hochreguliert, während bei Männchen Gene der angeborenen Immunität hochreguliert sind. So liegt die Proteinbiosynthese der Immunglobuline bei den adulten Weibchen deutlich höher als bei den Männchen. Vor allem die Serumkonzentrationen der IgG-Subtypen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub> sind bei den Weibchen messbar höher als bei den Männchen.

#### 1.3.2.2 Estrogen und die T-Zelle

Die T-Zell-Reifung im Thymus ist im Kindesalter rasant und nimmt mit Beginn der Pubertät unter dem Einfluss der Sexualhormone ab. Bei Mäusen resultiert aus der exogenen Zufuhr von Estrogenen eine Involution des Thymus, die Zellularität und Organgewicht gleichermaßen betrifft [13, 36]. ER $\alpha$  wurde sowohl in stromalen wie auch in hämatopoetischen Thymozyten gefunden, während ER $\beta$  bisher noch nicht detektiert wurde [36]. Zu entdifferenzierten T-Zellen sind wenige Angaben bezüglich der Rezeptoren in der Literatur zu finden.

Wie in Abbildung 3 beschrieben, wird Estrogen ein dosisabhängiger Effekt auf die T-Zell-Differenzierung zugesprochen.

#### 1.3.2.3 Estrogen und weitere Effektorzellen der allergischen Immunantwort

Auf der Ebene der Effektorzellen zeigt Estrogen eine steigernde Wirkung auf die Mastzelldegranulation [37] und die Freisetzung der Mediatoren von eosinophilen Granulozyten [38]. So lässt sich im Gewebe von Patienten mit nasaler Polyposis mittels immunhistochemischer Färbung nachweisen, dass Mastzellen Estrogen- und Progesteronrezeptoren aufweisen, wobei die Gesamtzahl der rezeptorpositiven Zellen unabhängig von Geschlecht und Alter sind [39]. Physiologische Konzentrationen von E2 induzieren bereits eine Mastzelldegranulation und verstärken die IgE-abhängige Synthese und Sekretion des Leukotriens C4 (LTC<sub>4</sub>). Dieser Mediator führt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur in den Bronchien und Gefäßen, erhöht die Permeabilität kleiner Gefäße und steigert die Schleimproduktion in Atemwegen und Gastrointestinaltrakt. Zaitso *et al.* [40] schlussfolgern daraus, dass E2 die antigenabhängige Freisetzung von Mediatoren aus Effektorzellen der Allergie des Sofort-Typs schon bei geringeren Antigenmengen begünstigt. Der bereits erwähnte klinisch beobachtete Zusammenhang einer zyklusabhängigen Verschlechterung der

Symptomatik von allergischem Asthma sowie das gehäufte Neuauftreten von Asthma mit Beginn einer Estrogentherapie in der Menopause (Kap. 1.2.1.1) finden vor diesem Hintergrund eine Bestätigung.

### 1.3.3 Einfluss von Testosteron auf das Immunsystem

Der intrazelluläre Androgenrezeptor (AR) gehört wie der Estrogenrezeptor zur Familie der nukleären Steroidrezeptoren, die nach Ligandenbindung als Transkriptionsfaktoren fungieren. Auch beim AR ist eine membrangebundene Form beschrieben worden, die nach Aktivierung über einen nicht-genomischen Weg zu einem schnellen Kalziumeinstrom ( $\text{Ca}^{2+}$ -Influx) führt [41].

#### 1.3.3.1 Testosteron und die B- und T-Zellen

Der AR wird in Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark exprimiert, nicht jedoch in peripheren B-Zellen. Ebenso liegt bei T-Zellen eine entwicklungsabhängige Regulation der Expression der Rezeptoren vor [42]. In Thymozyten sind sie nachweisbar, während sie in entdifferenzierten Zellen nicht zu finden sind. Die aktivierende Wirkung von Androgenen auf die zelluläre Immunantwort, vor allem die zytotoxischen T-Zellen, ist daher vermutlich vor allem während der Reifung der Thymozyten wirksam [43]. Einige Studien zeigen jedoch, dass auch in entdifferenzierten murinen T-Zellen aus der Milz membranassoziierte AR nachweisbar sind, die über einen nicht-genomischen Signalweg zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx führen [41, 44, 45]. Testosteron kann demnach auf verschiedenen Ebenen langfristig oder auch innerhalb von Sekunden auf Signalwege und Zytokinantwort Einfluss nehmen.

#### 1.3.3.2 Testosteron und weitere Effektorzellen der allergischen Immunantwort

Im Gegensatz zu Estrogen vermindert Testosteron die Freisetzung der Mediatoren aus eosinophilen Granulozyten [38] und verhindert die Mastzelldegranulation [37]. Des Weiteren erweist sich Testosteron als starker Inhibitor von histamin-vermittelten Wirkungen [46].

## 1.4 Allergien im Mausmodell

In den vergangenen Jahren wurde nach geeigneten Modellen gesucht, um die Pathogenese von allergischen Erkrankungen als Folge eines komplexen Zusammenspiels von endogenen und exogenen Faktoren, zu analysieren.

Mausmodelle haben sich dabei als ein wichtiger Schritt erwiesen, um die pathophysiologischen Zusammenhänge zu untersuchen.

Für den Lebens- und Hormonzyklus der Maus gilt, dass die Geschlechtsreife in der fünften bis neunten Lebenswoche eintritt [35]. Bei den Weibchen erfolgt die Ovulation nach Eintritt der Geschlechtsreife spontan bis 3 Stunden nach Beginn des Östrus. Der Zyklus dauert ungefähr 6 bis 9 Tage und wird in die Phasen Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus unterteilt. Die höchsten Estrogenwerte werden im Östrus gemessen. Zur Ausschaltung der gonadalen Hormonsynthese und zur Untersuchung des Einflusses der Sexualhormone auf verschiedene Pathologien werden Mäuse ovar- und orchektomiert.

Gleichzeitig lassen sich im Mausmodell verschiedene Sensibilisierungsprotokolle etablieren und allergische Reaktionen vom Sofort-Typ auf unterschiedliche Allergene auslösen. Bei der Analyse der allergen-spezifischen Immunglobuline bei der Maus gilt zu beachten, dass der sequenzielle Klassenwechsel von IgM zu IgE nicht wie beim Menschen über IgG<sub>4</sub> sondern über IgG<sub>1</sub> abläuft [2].

#### 1.4.1 Ovalbumin-induzierte allergische Immunantwort bei der Maus

In Mausmodellen wurde Ovalbumin (OVA), das Hühnereiweiß, als Modell-Allergen eingeführt und in der Regel gekoppelt an das Adjuvans Aluminiumhydroxid Al(OH)<sub>3</sub> (Alum) systemisch appliziert. Alum ist bekannt für seine T<sub>H</sub>2-induzierende Wirkung [47]. Erste geschlechtsspezifische Unterschiede in der allergischen Immunantwort haben Astorquiza *et al.* [48] im Jahr 1991 aufgezeigt. Nach dreifacher intrakutaner Immunisierung mit 100 µg OVA/Alum ist das mittels passiver kutaner Anaphylaxie gemessene spezifische IgE bei männlichen Mäusen niedriger als bei Weibchen.

Unter den exogenen Faktoren, die die allergische Reaktion beeinflussen, sind vor allem die Art der Allergenexposition (Route, Dosis, Zeitachse) und Variationen, die die Beschaffenheit des Allergens betreffen, entscheidend.

Bei BALB/c-Mäusen, die mit *Shistosoma mansoni egg antigen* sensibilisiert werden, zeigen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Ausprägung der humoralen Immunantwort [49]. Im Gegensatz dazu zeigen Studien mit OVA als Antigen in Asthma-Modellen, dass bei BALB/c-Weibchen OVA-IgE- und Gesamt-IgE-Konzentrationen höher sind. Auch die Lungeninfiltrate sind zellreicher und das Infiltrat der bronchoalveolären Lavage weist eine höhere Anzahl an eosinophilen Granulozyten auf [50, 51].

#### 1.4.2 Bedeutung des Mausstammes für die Ausprägung der allergischen Immunantwort: *high-responder* – *low-responder*

Zu den endogenen Faktoren gehören genetisch determinierte Einflussgrößen, die im menschlichen Organismus eine große Rolle für die Entstehung von Allergien spielen. Ebenso ist bei Mäusen die Ausbildung und Ausprägung der allergischen Erkrankung stark vom Mausstamm und dem entsprechenden genetischen Hintergrund abhängig. Entsprechend der Höhe der allergen-spezifischen IgE/IgG<sub>1</sub>-Antworten, des Ausmaßes der Hautreaktion auf intrakutane Provokation und der Ausprägung der Entzündung der Atemwege in einem Asthma-Modell, wurden Mausstämme in *high*-, *intermediate*- und *low-responder* eingeteilt [47]. BALB/c-Mäuse fallen in die Gruppe der *high-responder*, da dieser Mausstamm bezüglich der 3 oben genannten Parameter positiv reagiert. Während die kutane Reaktion auch bei C57BL/6-Mäusen gut provozierbar ist, ist das Lungeninfiltrat wesentlich geringer ausgeprägt und die spezifischen IgE-Konzentrationen sind kaum messbar [52]. C57BL/6-Mäuse sind somit *intermediate-responder* bezüglich der spezifischen Immunreaktion auf OVA im Asthma-Modell.

Dass diese Einteilung wiederum stark vom gewählten Allergen abhängig ist, zeigt sich auch bei diesem Schema. So reagieren beide Stämme gegensätzlich auf die Hausstaubmilbe als Allergen. Der BALB/c-Stamm zeigt sich als *low-responder* während der C57BL/6-Stamm als *high-responder* auf die Provokation reagiert [47, 53].

#### 1.4.3 Mausmodelle für die lokale kutane allergische Immunantwort

In Mausmodellen für allergische Erkrankungen sind verschiedene Protokolle für den Nachweis der allergen-spezifischen kutanen Hypersensibilität etabliert worden. Bei der Provokation der aktiven kutanen Hypersensibilität (*immediate cutaneous hypersensitivity*, ICHS) wird das Allergen intrakutan in die Bauchhaut des sensibilisierten Tieres appliziert, oder beim *ear-swelling*, einer Sonderform der ICHS, in die Haut eines Ohres. Ähnlich der Technik, die seit über 50 Jahren bei der passiven kutanen Anaphylaxie zur Messung der biologischen Aktivität von antigen-spezifischem IgE etabliert ist [54], erfolgt im erstem Fall die Auswertung meist anhand der Quaddelbildung und dem Ausmaß der Extravasation des zuvor intravenös injizierten blauen Farbstoffs Evan's Blue [55, 56]. Die Ohrschwellung wird hingegen mit einem abgefederten Stempel-Messgerät gemessen.

Bisherige Analysen der ICHS, einschließlich des *ear-swelling* auf intrakutan-appliziertes OVA bei BALB/c-Mäusen konzentrieren sich auf den Pathomechanismus und sind entweder bei adulten Weibchen oder Männchen durchgeführt worden.

Bei der biphasisch erfolgenden Schwellung und Infiltration des Gewebes zeigt sich, dass die IPR mit einem ersten Schwellungsmaximum abhängig vom Protokoll 1 bis 6 Stunden nach Injektion auftritt und sich eine LPR nach 1 bis 2 Tagen entwickelt. Die Bedeutung der Mastzellen für beide Phasen der allergischen Reaktion zeigt sich in Versuchen mit mastzell-defizienten Mäusen, in denen sich keine IPR auslösen lässt. Die LPR ist auslösbar, fällt jedoch insgesamt geringer aus. Antagonisierung von IL-4 hat ebenfalls zu einer signifikanten Minderung der IPR geführt [57].

Das Ausmaß der LPR, das vor allem durch das Einströmen von aktivierten Entzündungszellen wie T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Monozyten entsteht, ist abhängig von der Anwesenheit antigen-spezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen und von IL-5 [58]. Entsprechend zeigt sich bei mit OVA-spezifischem IgE passiv immunisierten Mäusen nur die IPR. Erst bei zusätzlichem Zelltransfer von aktivierten T-Zellen aus OVA-sensibilisierten Mäusen zeigt sich auch hier die LPR [59]. Bei transgenen Mäusen, bei denen permanent erhöhte Serumkonzentrationen von anti-OVA-IgE nachweisbar sind, reicht bereits ein Applikationsvolumen von 1 µg OVA zur Provokation der biphasischen Ohrschwellung aus [60].

## 2 ZIELE DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, geschlechtsspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei adulten BALB/c-Mäusen zu untersuchen. Daneben waren wir an der Analyse der Altersabhängigkeit dieser Ergebnisse interessiert.

Ein weiteres Ziel war es, durch prä-pubertäre Gonadektomie den Einfluss der Sexualhormone Estrogen und Testosteron zu analysieren. Neben den Serumkonzentrationen von allergen-spezifischem IgE und Gesamt-IgE als Ausdruck der humoralen Immunantwort wurde zusätzlich das Zytokinmilieu analysiert, das den Klassenwechsel der Immunglobuline beeinflusst.

Darüber hinaus wollten wir die Bedeutung des Mausstammes für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der allergischen Immunantwort überprüfen. Dafür wurde als Vergleichsmausstamm der C57BL/6-Stamm gewählt, der sich in bisherigen Studien als *low*-, beziehungsweise *intermediate-responder* auf das Modell-Allergen OVA gezeigt hatte.

Neben der systemisch allergischen Immunantwort wurde bei diesem Mausstamm zusätzlich die lokale kutane Provokation durchgeführt und in Bezug auf alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede analysiert.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit eingesetzten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software, Chemikalien und Reagenzien, Antikörper und sekundäre Reagenzien, Puffer, Lösungen finden sich aufgelistet im Anhang A.2 - A.7.

### 3.2 Versuchstiere

#### 3.2.1 Tierhaltung

Die Durchführung aller Tierversuche erfolgte nach der Genehmigung durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSI) in der Tierhaltung im *Center for Cardiovascular Research* in Berlin. Die Tiere wurden hier unter speziell pathogenfreien und standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 %, einem 12 h-Tag/Nacht-Rhythmus in *individual ventilated*-Polykarbonatkäfigen gehalten. Die Tiere wurden wöchentlich umgesetzt. Sie erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

#### 3.2.2 Versuchsaufbau und Versuchstiere

Für die Untersuchungen zum Einfluss des Geschlechts auf die systemisch allergische Immunantwort (Versuchsreihe 1) wurden initial Mausgruppen zu je 5 Weibchen und Männchen im Alter von 12 Wochen des BALB/c-Stammes gewählt und beim BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung, bestellt.

Die systemische Sensibilisierung erfolgte bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Mausversuchen nach folgendem Schema: An den Tagen 1, 14 und 21 erfolgten intraperitoneale (i.p.) Injektionen von 10 µg OVA/Alum. Dabei wurde OVA im Verhältnis 1:2 in Alum emulgiert und in PBS gelöst. Ein Volumen von 100 µl wurde jedem Tier injiziert.

Die retrobulbäre Serumgewinnung erfolgte in der Versuchsreihe 1 am Tag 28 (Abb. 6). Die Mäuse hatten zu diesem Zeitpunkt ein Alter von 16 Wochen erreicht.

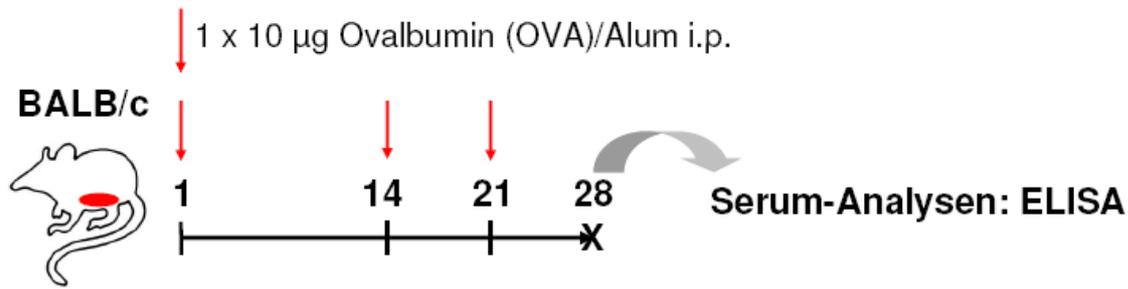
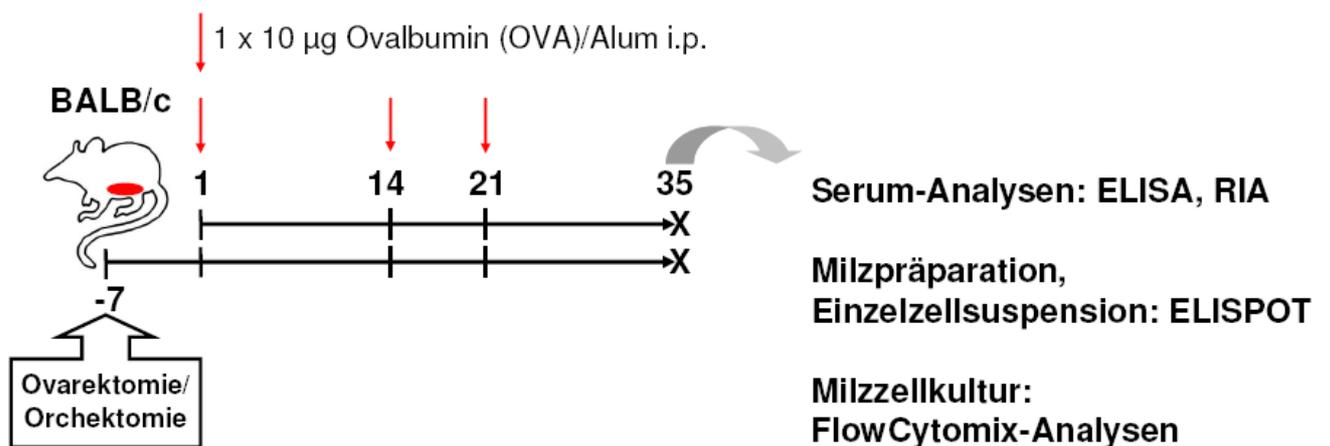


Abb. 6: Versuchsaufbau und -protokoll (Versuchsreihe 1).

Zur Untersuchung des Alters und der gonadalen Geschlechtshormone Estrogen und Testosteron (Versuchsreihe 2) wurden insgesamt 40 5-Wochen-alte BALB/c-Mäuse bei *Charles River Laboratories* in Frankreich bestellt. Je 10 Weibchen und Männchen wurden im Rahmen der angebotenen chirurgischen Dienstleistungen in der vierten Lebenswoche gonadektomiert.

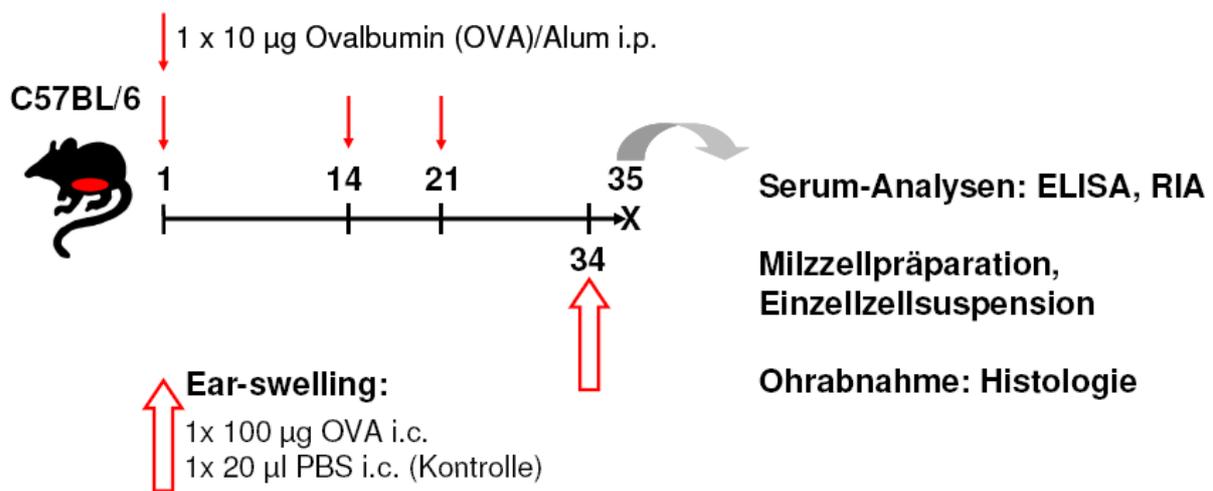
Die systemische Sensibilisierung erfolgte nach dem oben erwähnten Protokoll. Die Serumgewinnung, Milzpräparation und das Anlegen der Milzzellkulturen erfolgten am Tag 35 (Abb. 7). Die Mäuse hatten zu diesem Zeitpunkt ein Alter von 10 Wochen erreicht.

Die systemische allergische Immunantwort wurde mittels ELISA (*Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*), ELISPOT (*Enzyme-Linked-Immunospot-Assay*) und *FlowCytomix*-Analysen gemessen. Die Messung der Serumestradiolkonzentrationen erfolgte mittels RIA (*Radio-Immunsorbent-Assay*).



**Abb. 7: Versuchsaufbau und -protokoll (Versuchsreihe 2).**

Zur vergleichenden Fragestellung nach dem Einfluss des Mausstammes (Versuchsreihe 3) wurden je 6 12-Wochen-alte und je 10 5-Wochen-alte Weibchen und Männchen des C57BL/6-Stammes von *Charles River Laboratories* geliefert. Am Tag 34 wurde zusätzlich die lokale Immunantwort mit der *ear-swelling*-Methode gemessen und am Tötungstag wurde für weiterführende histologische Analysen das Ohrgewebe konserviert (Abb. 8). Am Tag 35, im Alter von 10 beziehungsweise 17 Wochen, erfolgten Serumgewinnung und Milzzellpräparation.



**Abb. 8: Versuchsaufbau und -protokoll (Versuchsreihe 3).**

### 3.3 Gewinnung des Untersuchungsmaterials und Protokolle

#### 3.3.1 Anästhesie und Tötung

Am Tag 35 wurde eine Injektionsnarkose als Kombination aus Ketamin und Xylazin in 0,9 % Natriumchloridlösung durchgeführt. Intraperitoneal wurden 10 µl/g pro Körpergewicht injiziert. Die Tötung erfolgte nach retrobulbärer Blutentnahme durch zervikale Dislokation.

#### 3.3.2 Serum

Durch Öffnen des retrobulbären Venenplexus konnte das Blut in einem 1,5 ml Schnappdeckelverschlussgefäß gesammelt werden. Es wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 6000 rpm

wurde das Serum vom Blutkuchen getrennt, in ein neues Verschlussgefäß pipettiert und nach erneuter Zentrifugation in Aliquoten von bis zu 100 µl bei -80 °C gelagert.

### 3.3.3 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung der verschiedenen Immunglobulinkonzentrationen in den Mäuseseren wurde ein *Sandwich*-ELISA durchgeführt. Alle Protokolle beinhalteten die gleichen Arbeitsschritte bestehend aus dem Coaten, Blocken, Auftragen der Standards und Proben, Detektion, Enzymreaktion und Entwicklung. Sie variierten jedoch je nach gesuchtem Immunglobulin, vor allem in den Antikörpern (AK) und Puffern, sowie den Inkubationszeiten. Zwischen den Arbeitsschritten wurden ungebundene Moleküle durch wiederholtes Waschen mit PBS mittels eines Mikrotiterplattenwaschgerätes von der Platte entfernt.

#### **Tab. 1: Coating-Antikörper/Coating-Proteine**

Tabelle geordnet nach zu bestimmendem Immunglobulin, Coating-AK, -Protein gegebenenfalls mit Angabe des Klons, Konzentrations- und Volumenangaben pro *well*.

Immunglobulin	Coating-AK/-Protein	Arbeitsverdünnung	Volumen
<b>Gesamt IgE</b>	Anti-Maus IgE (Klon EM95.3)	1:720	50 µl
<b>OVA-IgE</b>	Anti-Maus IgE mAB (Klon R35-72)	1:250	100 µl
<b>OVA-IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub></b>	OVA-Stock	1:200	100 µl

Da sich die Immunglobulinkonzentrationen untereinander und abhängig von Alter und Stamm der Mäuse stark unterschieden, wurde vorher mittels einer Verdünnungsreihe die richtige Probenverdünnung austitriert. Im Anschluss wurden auf eine neue Platte die Standards in einer Verdünnungsreihe mit 8 Schritten und die Proben mit 5 Verdünnungsschritten aufgetragen.

**Tab. 2: Standards und Serumproben**

Tabelle geordnet nach zu bestimmendem Immunglobulin, Standard gegebenenfalls mit Angabe des Klons, Seren mit Angabe von Stamm und Alter in Wochen (Wo), Angaben der jeweiligen ersten Arbeitsverdünnung und der folgenden Verdünnungsreihe in Abhängigkeit von Mausstamm und Alter.

Immunglobulin	Standard und Seren		1. Arbeitsverdünnung	Verdünnungsschritte
<b>Gesamt-IgE</b>	Standard	Purified Mouse IgE, (Klon C38-2)	1:500	1:6
	Seren	BALB/c, 16 Wo	1:50	1:4
		BALB/c, 10 Wo	1:10	1:5
		C57BL/6, 10 + 17 Wo	1:4	1:2
<b>OVA-IgE</b>	Standard	gepooltes Serum der OVA-sensibilisierten Mäuse	1:2	1:2
	Seren	BALB/c, 16 Wo	1:2	1:4
		BALB/c, 10 Wo	1:5	1:2
		C57BL/6, 10 + 17 Wo	1:2	1:2
<b>OVA-IgG<sub>1</sub></b>	Standard	gepooltes Serum der OVA-sensibilisierten Mäuse	1:100	1:10
	Seren	BALB/c, 16 Wo	1:1000	1:10
		BALB/c, 10 Wo	1:2000	1:10
		C57BL/6, 17 Wo	1:2000	1:6
		C57BL/6, 10 Wo	1:4000	1:6
<b>OVA-IgG<sub>2a</sub></b>	Standard	gepooltes Serum der OVA-sensibilisierten Mäuse	1:2	1:4
	Seren	BALB/c, 10 + 16 Wo	unverdünnt	1:6
		C57BL/6, 10 + 17 Wo	1:2	1:5

**Tab. 3: Indikator-Antigen/-Antikörper**

Tabelle geordnet nach zu bestimmendem Immunglobulin, Indikator-Ag/-AK mit Angabe des Klons, Konzentrations- und Volumenangaben pro *well*.

Immunglobulin	Indikator-Ag/-AK	Arbeitsverdünnung	Volumen
<b>Gesamt-IgE</b>	IgE-Biotin (Klon 84 1-C)	1:500	50 µl
<b>OVA-IgE</b>	Biotin-konjugiertes OVA	1:400	100 µl
<b>OVA-IgG<sub>1</sub></b>	Biotin-Conjugated Rat Anti-Mouse IgG <sub>1</sub> (Klon A85-1)	1:1000	50 µl
<b>OVA-IgG<sub>2a</sub></b>	Biotin-Conjugated Rat Anti-Mouse IgG <sub>2a</sub> (Klon R19-15)	1:1000	50 µl

Die Überprüfung der ELISA erfolgte durch 3 Kontrollen, bei denen jeweils entweder Serum (Blankwert), die Coatingsubstanz oder der Indikatorantikörper weggelassen wurde.

Das Programm „*Revelation*“ ermittelte unter Abzug des Blankwertes die Standardkurven und entsprechenden Konzentrationen. Die Konzentrationen der Proben konnten im linearen Bereich der sigmoid verlaufenden Standardkurve ermittelt werden. Bei Gesamt-IgE erfolgte die Messung anhand des lieferbaren Standards unter der Angabe von ng/ml. Bei OVA-IgE und OVA-IgG<sub>1</sub> erfolgte die Messung anhand des Serumpools von OVA-sensibilisierten BALB/c-Mäusen unter der Angabe von LU/ml (*labor units*). Der 1. Standard wurde mit 100 gleichgesetzt.

#### 3.3.4 *Radio-Immunsorbent-Assay* (RIA)

Freundlicherweise führte Prof. Dr. W. Rohde vom Institut für experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin, den RIA zur Bestimmung der Serumestradiolkonzentrationen durch. Der Estradiol-Kit wurde entsprechend der Herstellerempfehlung verwendet.

#### 3.3.5 Milzpräparation und Einzelzellsuspension

Zur Entnahme der Milz wurde bei den Mäusen die Bauchhaut mit 70 % Ethanol eingesprüht, Haut und Peritoneum vorsichtig aufgeschnitten und die Milz mittels anatomischer Pinzette stumpf vom Omentum getrennt.

Alle Zellisoliations- und Zellkultivierungsschritte wurden steril unter einer keimfreien Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung (*flow bench*) unter Verwendung von sterilen Kulturgefäßen, Nährlösungen, Arbeitsgeräten und mit Latexhandschuhen durchgeführt. Um die Zellen aus den zusammenhängenden Zellverbänden zu vereinzeln, wurden die Milzen durch grob- bis feinmaschige Netze gedrückt, die Suspensionen jeweils mehrfach resuspendiert und zentrifugiert. Der Zellkuchen wurde anschließend vorsichtig aufgeklopft und in 2,5 ml 1xRBC-Lysis-Puffer zur Lyse der enthaltenen Erythrozyten inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden Aliquote für die Zellzählung mittels Zellzählgerät abgenommen.

### 3.3.6 *Enzyme-linked-immunospot-assay* (ELISPOT)

Die Durchführung des ELISPOT erfolgte in Kooperation mit Verena Fokuhl am DRFZ. Der ELISPOT beruht auf den Arbeitsschritten des ELISA. Er unterscheidet sich jedoch vor allem dadurch, dass statt der Seren Einzelzellsuspensionen verschiedener lymphatischer Organe – in unserer Untersuchung die Milz – aufgetragen werden. Außerdem erfolgt die Entwicklung in einem Agarose-Entwicklungspuffer, der das Substrat lokal fixiert. Es kommt somit nicht zu einem generalisierten Farbumschlag, sondern es erscheinen Spots an den Stellen im *well*, an denen sich die antikörpersezernierenden Zellen befinden.

### 3.3.7 Milzzellkultur

Nach der Zellaufreinigung wurden die in Kompletmedium aufgenommenen Zellen unter standardisierten Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre sowie 100 % Luftfeuchtigkeit in 48-*well*-Zellkulturplatten kultiviert. Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden verschiedene Stimulierungsarten durchgeführt und die Zellen entweder 2 oder 4 Tage lang kultiviert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Überstände gewonnen. Sie wurden nach der 15minütigen Zentrifugation bei 300 g abpipettiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Kultivierung für 48 Stunden folgte dabei in einer 24-*well*-Platte mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) und Calcium Ionophore (IONO) nach folgendem Schema:

**Tab. 4: Stimulationsschema der Milzzellkultur mit PMA/IONO über 48 Stunden.**

Volumenangaben und Angabe der Arbeitskonzentration pro *well*, als Kontrolle diente jeweils ein *well* ohne Zugabe von PMA/IONO.

Gesamtvolumen 2000µl/ <i>well</i>	Zellen 2x10 <sup>6</sup> Zellen/ <i>well</i>	Medium	PMA/IONO		Arbeits- konzentration
<b>unstimuliert</b>	1000 µl	1000 µl	-		
<b>stimuliert</b>	1000 µl	800 µl	200 µl	PMA	2 ng/ml
				IONO	2x10 <sup>-7</sup> M

Die antigen-spezifische Stimulierung und Kultivierung über 4 Tage erfolgte mit OVA. Als kostimulatorisches Signal zur Aktivierung spezifischer T-Zellen wurde anti-CD28 (αCD28) eingesetzt.

**Tab. 5: Stimulationsschema der Milzzellkultur antigen-spezifisch mit OVA/ αCD28 über 4 Tage.**

Volumenangaben und Angabe der Arbeitskonzentration pro *well*, als Kontrolle diente jeweils ein *well* ohne Zugabe von OVA/ αCD28.

Gesamtvolumen 2000 µl/ <i>well</i>	Zellen 2x10 <sup>6</sup> Zellen/ <i>well</i>	Medium (RPMI 1640)	OVA/αCD28		Arbeits- konzentration
<b>unstimuliert</b>	1000 µl	1000 µl	-		
<b>stimuliert</b>	1000 µl	800 µl	200 µl	Ovalbumin	250 µg/ml
				anti-CD28	5 µg/ml

### 3.3.8 FlowCytomix-Analysen

Die Zytokinbestimmung in den Überständen der Zellkulturen erfolgte mittels *Flow Cytometry Based Fluorescent Bead Immunoassay*. Die Konzentrationen von IL-1α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFNγ, TNFα und GM-CSF wurden nach Anleitung des Herstellers gemessen.

### 3.3.9 Ear-swelling

Bei den mit Ketamin/Xylazin narkotisierten Mäusen wurde an beiden Ohren innen am Ohrläppchen mit einer Markierung eine Fläche für den Messstempel abgegrenzt. An dieser Stelle erfolgte eine erste Messung mit dem abgefederten Messgerät.



**Abb. 9: Foto des eingesetzten abgefederten Messgerätes.**

Danach wurden 100 µg OVA, gelöst in 20 µl PBS, ins Zentrum dieser Fläche intrakutan injiziert. In das andere Ohr wurde als Kontrolle das entsprechende Volumen an PBS appliziert. Die Ohrdicke wurde 1, 2, 4 und 6 Stunden nach der Applikation gemessen. Die Messungen erfolgten unter einer Isofluran-Dampfinhalationsnarkose. Vor der Ohrabnahme am Folgetag erfolgte die letzte Messung. Gegen die Austrocknung der Augen wurde Panthenol-Augensalbe aufgetragen. Drei Messungen pro Ohr und pro Maus wurden gemittelt.

### 3.3.10 Histologie

24 Stunden nach der ersten Injektion wurden die Ohren mit 70 % Ethanol eingesprüht, mit einer feinen Pinzette am äußeren Rand gefasst und an der Haut-Knorpel-Grenze unterhalb der Markierung abgeschnitten. Die Einbettung erfolgte blasenfrei in mit Einbettmedium halb gefüllte Vinyleinbetttschalen. Diese wurden aufgefüllt und dann langsam in flüssigen Stickstoff gesenkt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80 °C. Am Kryostaten wurden Schnitte einer Dicke von 5 µm angefertigt und auf Objektträgern 10 Minuten in 100 %igem Acetonbad fixiert, weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bei -80 °C aufbewahrt. Die Färbung erfolgte mit Papanicolau bei einer Verdünnung von 1:2 mit etwa 70 µl pro Schnitt für eine Dauer von 30 Sekunden. Eosin-Phloxin wirkte im Anschluss 1 bis 2 Minuten unverdünnt bei 60 µl pro Schnitt ein. Das abschließende Eindeckeln erfolgte unter Zugabe des Eindeckmediums. Die fertigen Schnitte wurden unter einem Zeiss-Mikroskop mit dem Programm *Axio Vision* bearbeitet und bei Durchlicht fotografiert.

### 3.4 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Excel (Microsoft Office XP Paket). Die Angaben der Ergebnisse erfolgen als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung. Das Statistikprogramm SPSS (*Statistical Package for the Social*

*Sciences*) Version 12.0 diene zur Berechnung statistischer Signifikanzen. Zum Gruppenvergleich bei unabhängigen Stichproben und kleiner Stichprobengröße wurde der nichtparametrische „Mann-Whitney-U-Test“ herangezogen. Als statistisch signifikant werden Ergebnisse mit einem  $p$ -Wert  $<0,05$ ,  $<0,01$  beziehungsweise  $<0,001$  ausgewiesen.

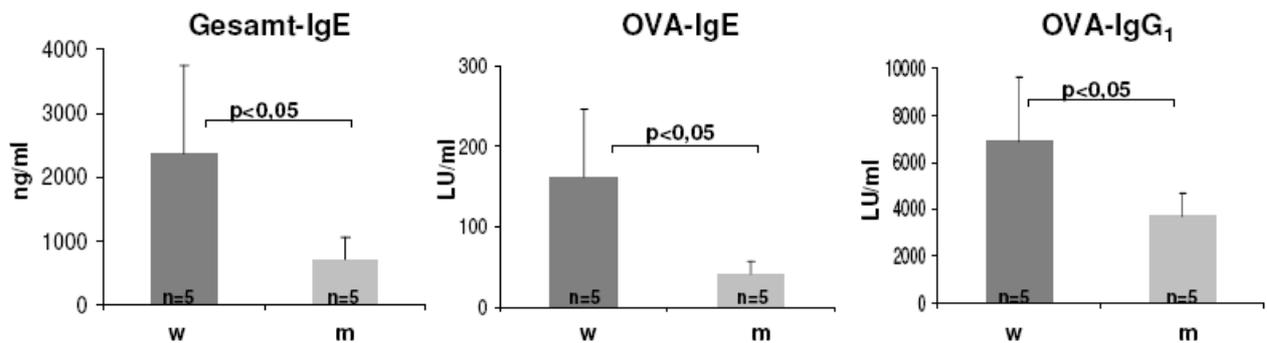
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei adulten BALB/c-Mäusen

#### 4.1.1 Immunglobuline

Um den Einfluss des Geschlechts auf die Ausprägung der humoralen allergischen Immunantwort zu untersuchen, wurden adulte weibliche und männliche BALB/c-Mäuse systemisch mit OVA sensibilisiert. Die Messung der Serumkonzentrationen von Gesamt- und von OVA-spezifischem IgE der Versuchstiere erfolgte am Tag 28 mittels ELISA (Kap. 3.2.2, Versuchsreihe 1). 16-Wochen-alte weibliche BALB/c-Mäuse wiesen signifikant höhere Gesamt-IgE-, OVA-IgE- und OVA-IgG<sub>1</sub>-Konzentrationen auf als die gleichaltrigen Männchen (Abb. 10).

In einer vorhergehenden Versuchsreihe ließ sich zeigen, dass in Seren von nicht-sensibilisierten Tieren, erwartungsgemäß keine OVA-spezifischen Immunglobulinkonzentrationen messbar waren (nicht gezeigte Ergebnisse).



**Abb. 10: Gesamt-IgE-, OVA-IgE- und OVA-IgG<sub>1</sub>-Serumkonzentrationen bei 16-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.**

ELISA-Messungen der Serumkonzentrationen von Gesamt-IgE, OVA-IgE und OVA-IgG<sub>1</sub> bei 16-Wochen-alten BALB/c-Mäusen, Vergleich zwischen Weibchen (w, n=5) und Männchen (m, n=5), (Versuchsreihe 1).

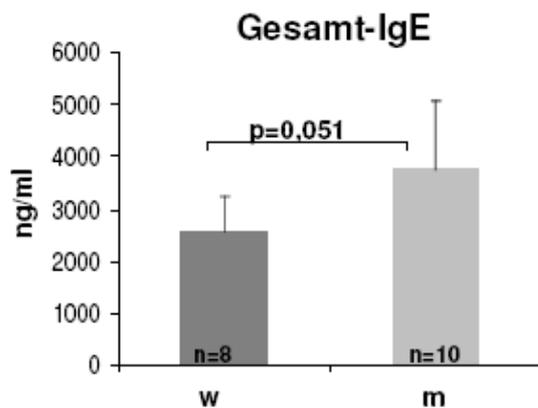
OVA-IgG<sub>2a</sub>, als Marker einer T<sub>H</sub>1-getriggerten Immunantwort, war bei diesen Mausgruppen mittels ELISA nicht detektierbar (nicht gezeigte Ergebnisse).

## 4.2 Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei BALB/c-Mäusen

Zur besseren Übersicht werden Ergebnisse der 10-Wochen-alten BALB/c-Weibchen und -Männchen unter dem Aspekt des geschlechtsspezifischen Unterschieds an dieser Stelle dargestellt. Teilweise finden sich die Resultate erneut unter Kapitel 4.3, da der Versuch parallel zur Untersuchung des Einflusses der Gonadektomie lief und die nicht-operierten Weibchen und Männchen Tiere als Vergleichsgruppe dienten (Versuchsreihe 2).

### 4.2.1 Immunglobuline

Die bei adulten BALB/c-Mäusen gezeigten geschlechtsspezifischen Unterschiede der humoralen allergischen Immunantwort (Kap. 4.1) waren bei der jüngeren Altersgruppe nicht reproduzierbar. Vielmehr lag bei Gesamt-IgE eine umgekehrte Tendenz vor. Männchen zeigten im Alter von 10 Wochen höhere Serumkonzentrationen. Eine statistische Signifikanz wurde hierbei knapp verfehlt ( $p=0,051$ ).

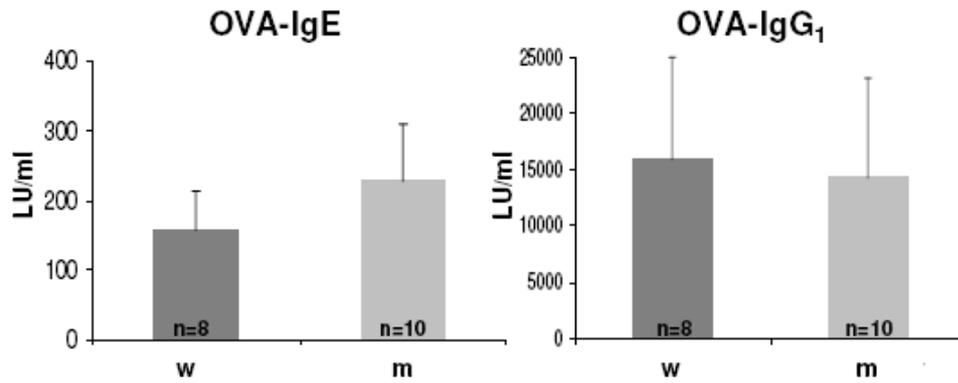


**Abb. 11: Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.**

ELISA-Messungen der Serumkonzentrationen von Gesamt-IgE bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen, Vergleich zwischen Weibchen (w, n=8) und Männchen (m, n=10), (Versuchsreihe 2).

Bei den Serumkonzentrationen von OVA-IgE und OVA-IgG<sub>1</sub> zeigte sich eine Angleichung der geschlechtsspezifischen Unterschiede. Weder eine deutliche Tendenz zu höheren Immunglobulinkonzentrationen von Männchen wie bei Gesamt-IgE noch ein signifikanter Unterschied zugunsten der Weibchen wie bei OVA-IgE bei den adulten BALB/c-Mäusen (Kap. 4.1) konnte nachgewiesen werden (links in Abb. 12).

Bei OVA-IgG<sub>1</sub>, das die Intensität des Immunglobulinklassenwechsels verdeutlicht, zeigten sich auffallend hohe interindividuelle Schwankungen (rechts in Abb. 12).



**Abb. 12: OVA-IgE- und OVA-IgG<sub>1</sub>-Serumkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.** ELISA-Messungen der Serumkonzentrationen von OVA-IgE und OVA-IgG<sub>1</sub> bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen, Vergleich zwischen Weibchen (w, n=8), und Männchen (m, n=10), (Versuchsreihe 2).

Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung der geschlechts- und altersspezifischen Unterschiede der humoralen allergischen Immunantwort.

**Tab. 6: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses von Alter auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede der humoralen allergischen Immunantwort im BALB/c-Stamm.**

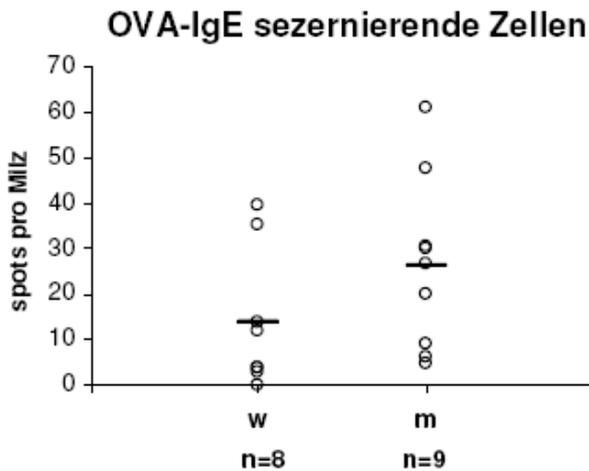
\* p<0,05

↓↓ = nicht detektierbar

Mausstamm	Alter in Wochen	Gesamt-IgE	OVA-IgE	OVA-IgG <sub>1</sub>	OVA-IgG <sub>2a</sub>
BALB/c 	10	♀ ≤ ♂	♀ = ♂	♀ = ♂	
	16	♀ > ♂ *	♀ > ♂ *	♀ > ♂ *	↓↓

#### 4.2.2 OVA-IgE-sezernierende Zellen in der Milz

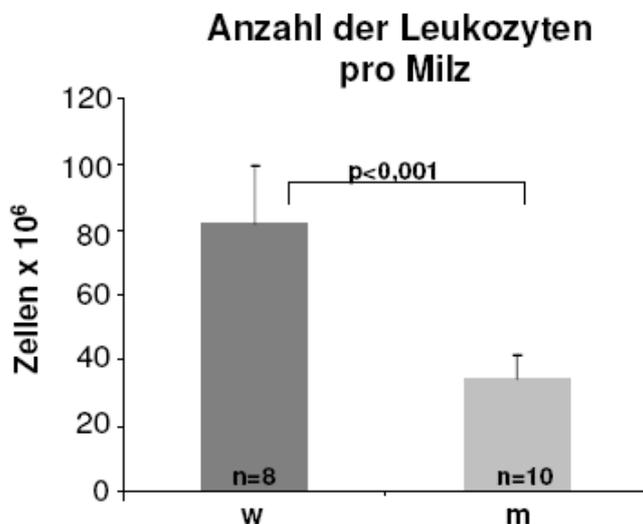
Auf zellulärer Ebene zeigte sich bei der Anzahl der OVA-IgE-sezernierenden Zellen in der Milz kein Unterschied zwischen 10-Wochen-alten Weibchen und Männchen.



**Abb. 13: Anzahl der OVA-IgE-sezernierenden Zellen in der Milz, 10-Wochen-alten BALB/c-Mäuse.** ELISPOT-Messungen der OVA-IgE-sezernierenden Zellen der Milz, Vergleich zwischen Weibchen (w, n=8) und Männchen (m, n=9), Einzelwertdarstellung mit Mittelwertangabe, (Versuchsreihe 2).

#### 4.2.3 Anzahl der Leukozyten pro Milz

Bei der Zellzählung der Leukozyten im Rahmen der Anfertigung der Einzelzellsuspensionen zeigte sich, dass Milzen der BALB/c-Weibchen signifikant zellreicher waren als die der Männchen.



**Abb. 14: Anzahl der Leukozyten pro Milz, 10-Wochen-alten BALB/c-Mäuse.** Zellzählung der Einzelzellsuspensionen der Milzen, Vergleich zwischen Weibchen (w, n=8) und Männchen (m, n=10), Darstellung als Mittelwert der Zellzahl x 10<sup>6</sup> + SD, (Versuchsreihe 2).

#### 4.2.4 Zytokinantwort

Um die Immunglobulinproduktion beeinflussende T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurden die Milzzellen nach der Aufreinigung in Kultur genommen. Die Kultivierung für 48 Stunden erfolgte mit PMA/IONO bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  pro well (Tab. 4). Diese

Stimulationsart wurde als Positiv-Kontrolle gewählt und wird beispielhaft an den Ergebnissen für IL-2 (Abb. 22) gezeigt werden.

Die antigen-spezifische Stimulierung und Kultivierung über 4 Tage erfolgte mit 250 µg/ml OVA in Verbindung mit αCD28, einem kostimulatorischem Signal zur Aktivierung spezifischer T-Zellen (Tab. 5).

Nach OVA-spezifischer Stimulation zeigten sich in den Überständen der Milzzellkulturen der 10-Wochen-alten BALB/c-Weibchen tendenziell höhere Konzentrationen von IL-4 und IL-10 gegenüber gleichaltrigen Männchen. Die in der *Flow Cytometry* gemessenen Konzentrationsunterschiede verfehlten das Signifikanzniveau mit  $p=0,055$  bei IL-4 (Abb. 19) und  $p=0,054$  bei IL-10 jeweils knapp (Abb. 20). Bei IL-5 ließ sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied ausmachen (Abb. 20).

Weder bei IFN $\gamma$  noch bei IL-2 ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den 10-Wochen-alten Weibchen und Männchen ausmachen. Abbildungen und Ergebnisdarstellung werden ausführlicher im Kapitel 4.3.3 dargestellt.

Weder bei IL-17 (Abb. 24) noch bei den anderen in der *Flow Cytometry* gemessenen Zytokinen zeigten sich signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede (Tab. 7).

### **4.3 Vergleich der systemischen allergischen Immunantwort zwischen nicht-operierten und gonadektomierten 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen**

Um den Einfluss der Geschlechtshormone zu untersuchen, wurden 3- bis 4-Wochen-alte Mäuse vor Erreichen der Geschlechtsreife gonadektomiert.

Die Sensibilisierung der gonadektomierten Gruppen und der gleichaltrigen Vergleichsgruppen auf OVA wurde in der fünften Lebenswoche begonnen. Die Messung der allergischen Immunantwort erfolgte mittels ELISA, ELISPOT und *FlowCytomix*-Analysen am Tag 35 (Versuchsreihe 2).

#### **4.3.1 Immunglobuline**

Bei den zum Analysezeitpunkt 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen zeigte sich kein Unterschied zwischen den gonadektomierten Mäusen und den nicht-operierten Vergleichsgruppen. Die Serumkonzentrationen von Gesamt-IgE und den OVA-spezifischen-Immunglobulinen wichen nicht signifikant von den Vergleichsgruppen ab (Abb. 15, 16, 17).

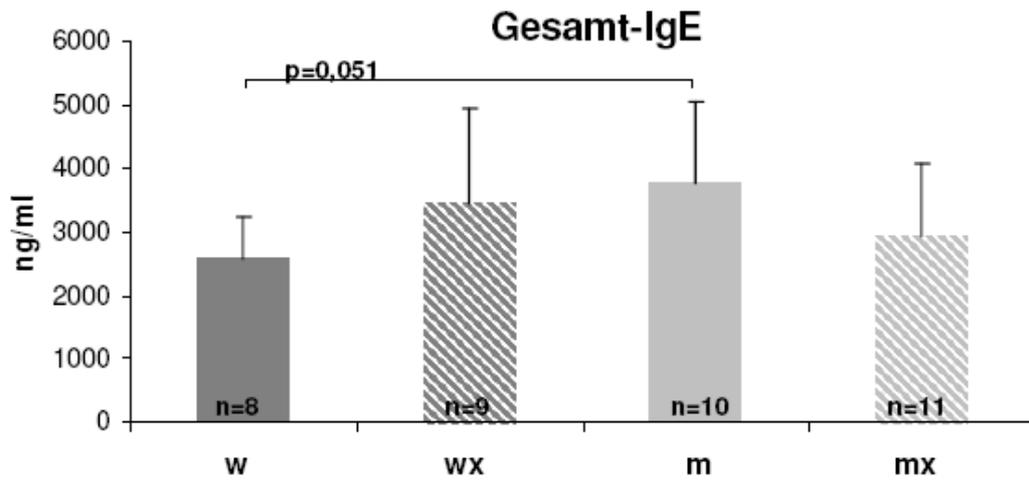


Abb. 15: Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.

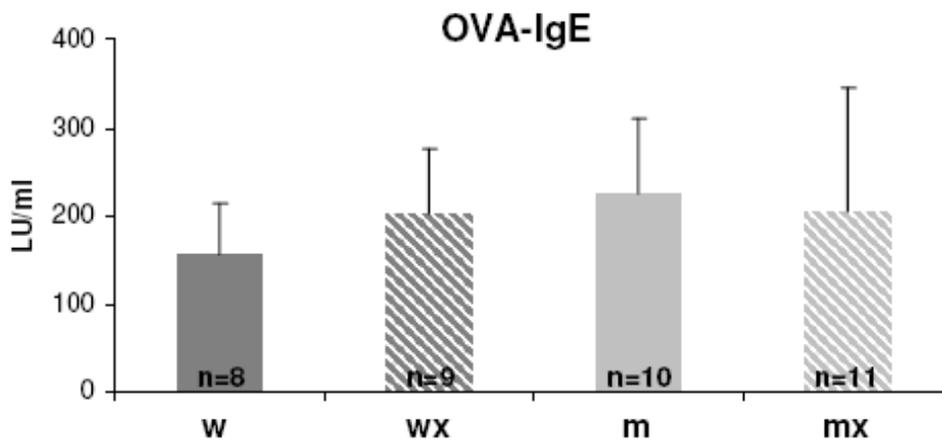


Abb. 16: OVA-IgE Konzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.

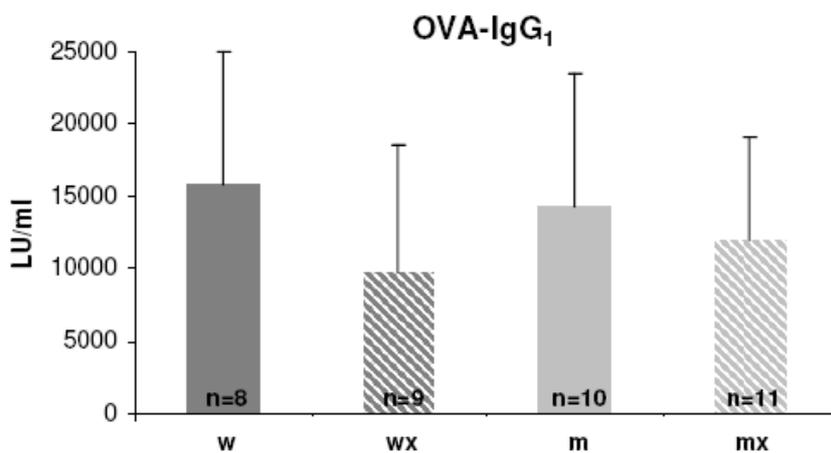
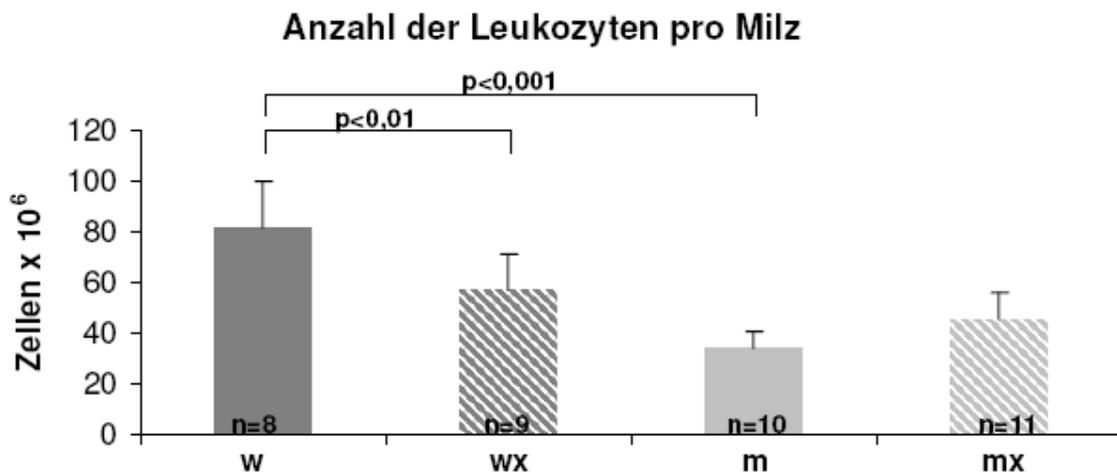


Abb. 17: OVA-IgG<sub>1</sub> Konzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.

(Abb. 15, 16, 17): ELISA-Messungen der Serumkonzentrationen von Gesamt-IgE, OVA-IgE und OVA-IgG<sub>1</sub> bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen, Vergleich zwischen Weibchen (w, n=8), ovariectomierten Weibchen (wx, n=9), Männchen (m, n=10) und orchectomierten Männchen (mx, n=11), Darstellung als Mittelwert + SD, (Versuchsreihe 2).

#### 4.3.2 Anzahl der Leukozyten pro Milz

Bei der Zellzählung zeigte sich, dass die Anzahl der Leukozyten pro Milz bei nicht-operierten Weibchen signifikant höher war als bei der ovariectomierten Vergleichsgruppe. Weibchen zeigten somit insgesamt die höchste Anzahl an Leukozyten. Das Ergebnis war nicht nur signifikant höher als das der ovariectomierten Vergleichsgruppe, sondern auch wie unter Kapitel 4.2.3.1 bereits gezeigt, signifikant höher als das der Männchen. Zwischen nicht-operierten und orchectomierten Männchen ergab sich kein Unterschied.



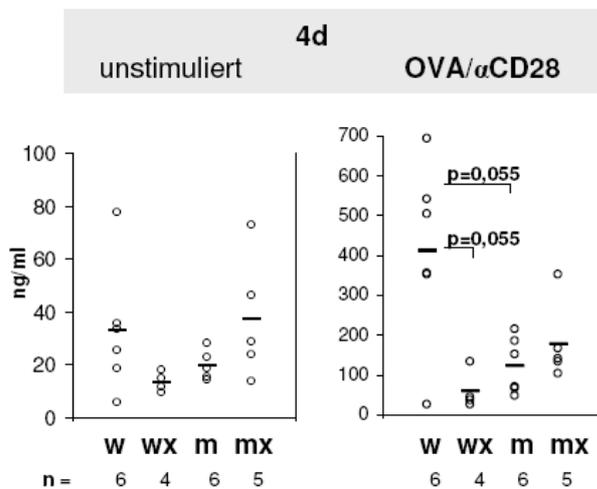
**Abb. 18: Anzahl der Leukozyten pro Milz, 10-Wochen-alte BALB/c-Mäuse.**

Zellzählung der Einzelzellsuspensionen der Milzen von Weibchen (w, n=8), ovariectomierten Weibchen (wx, n=9), Männchen (m, n=10) und orchectomierten Männchen (mx, n=11). Darstellung als Mittelwert der Zellzahl x 10<sup>6</sup> + SD, (Versuchsreihe 2).

#### 4.3.3 Zytokinantwort

Nach viertägiger OVA-spezifischer Stimulation der Milzzellkultur zeigte sich bei IL-4, dass Weibchen insgesamt die höchsten Konzentrationen aufwiesen. Die ovariectomierten Weibchen lagen ebenso wie Männchen tendenziell niedriger. Das Signifikanzniveau wurde mit jeweils p=0,055 knapp verfehlt.

## IL-4



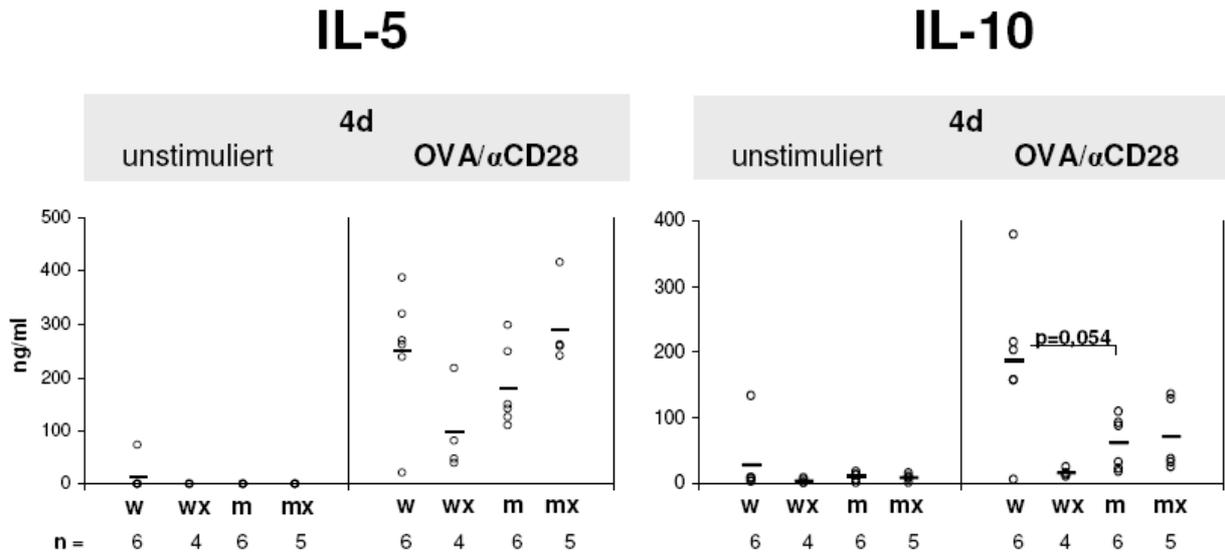
**Abb. 19: IL-4 Konzentrationen bei 10 Wochen alten BALB/c-Mäusen.**

Konzentrationen als Einzelwerte von Weibchen (w, n=6), ovariectomierten Weibchen (wx, n=4), Männchen (m, n=6) und orchiectomierten Männchen (mx, n=5), Mittelwertdarstellung als Balken, Detektionslimit 1,7 pg/ml.

Insgesamt zeigten die nicht-operierten Weibchen auch bei den anderen  $T_H2$ -Zytokinen IL-5 und IL-10 die höchsten Konzentrationen (Abb. 20). In den gewählten grafischen Darstellungen erscheinen ovariectomierte Weibchen jeweils als Gruppe mit den niedrigsten Konzentrationen.

Ausgehend vom Mittelwert waren bei IL-4 die Konzentrationen der ovariectomierten Weibchen 7fach und bei IL-10 10fach geringer. Die Unterschiede erwiesen sich jedoch nicht als statistisch signifikant.

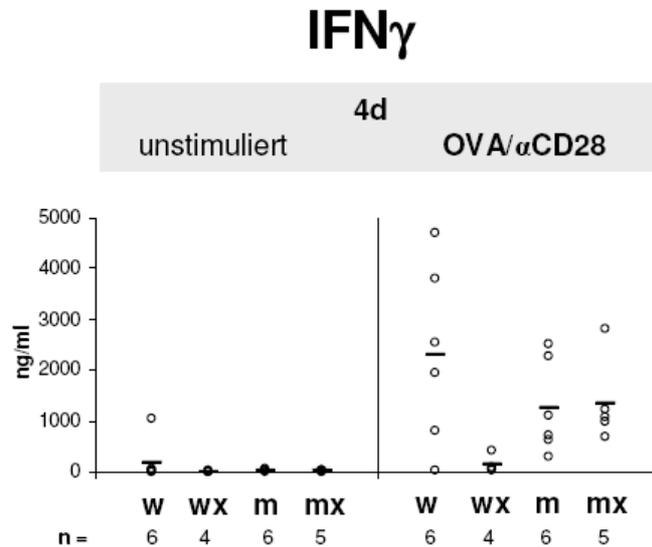
Dass die Gruppengröße bei den ovariectomierten Weibchen unter 5 fiel, lag daran, dass ein Tier bei der Auswertung als *non-responder* nachträglich aus den Analysen genommen werden musste.



**Abb. 20: IL-5 und IL-10 Konzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.**

Konzentrationen als Einzelwerte von Weibchen (w, n=6), ovarektomierten Weibchen (wx, n=4), Männchen (m, n=6) und orchektomierten Männchen (mx, n=5), Mittelwertdarstellung als Balken, Detektionslimit (IL-5) 1,1 pg/ml, (IL-10) 3 pg/ml.

Nach OVA-spezifischer Stimulation ergaben sich rechnerisch keine signifikanten Unterschiede bei  $\text{IFN}\gamma$  zwischen den gonadektomierten Tieren und den Vergleichsgruppen. Auch bei  $\text{IFN}\gamma$  wurden die höchsten Konzentrationen in den Überständen der Weibchen gemessen und die niedrigsten bei den ovarektomierten Tieren (Abb. 21).



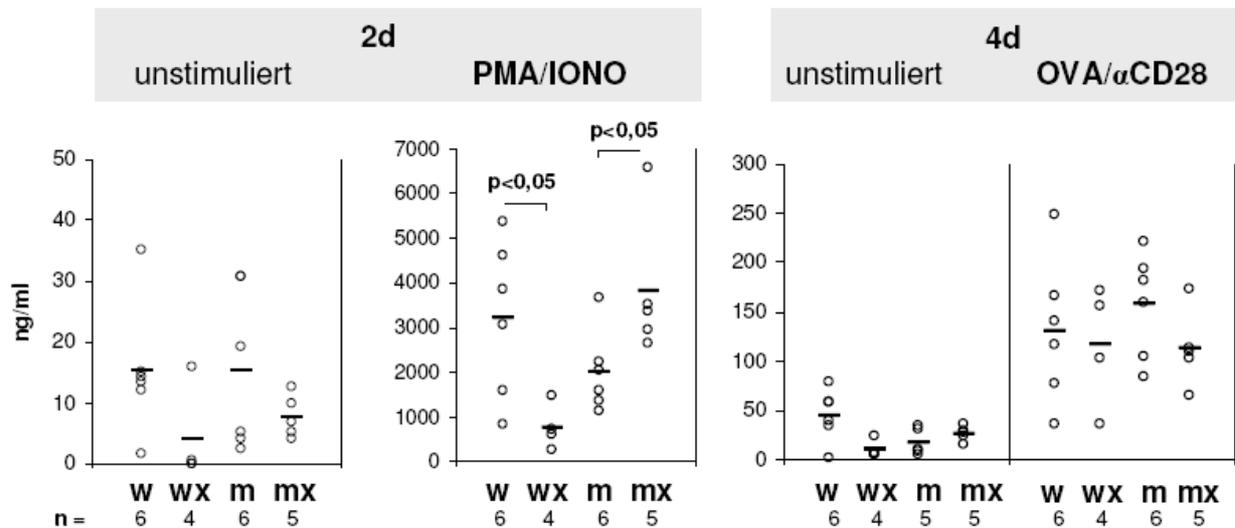
**Abb. 21: IFN $\gamma$  Konzentrationen bei 10 Wochen alten BALB/c-Mäusen.**

Konzentrationen als Einzelwerte von Weibchen (w, n=6), ovarektomierten Weibchen (wx, n=4), Männchen (m, n=6) und orchektomierten Männchen (mx, n=5), Mittelwertdarstellung als Balken, Detektionslimit 9,9 pg/ml.

Bei IL-2 ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nach OVA-spezifischer Stimulation (rechts in Abb. 22).

An dieser Stelle werden beispielhaft zusätzlich die Konzentrationen gezeigt, die sich nach 2 Tagen PMA/IONO-Stimulation ergaben (links in Abb. 22). Diese Stimulation wurde bei allen Zellkulturen als Positivkontrolle für die antigen-spezifische Stimulation gewählt. PMA führt zu einer polyklonalen Aktivierung der Zellen. IONO mobilisiert zusätzlich  $\text{Ca}^{2+}$ . Gemeinsam führen sie zu einer unselektiven maximalen Freisetzung der Zytokine aus den Milzzellen. Bei IL-2 traten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Dies konnte bei den bisher erwähnten Zytokinen nicht gezeigt werden. Bei IL-2 lagen die Konzentrationen ovariectomierter Weibchen niedriger als die der Weibchen. Auch zwischen den Männchen ergab sich ein Unterschied. Orchektomierte Männchen zeigten signifikant höhere Konzentrationen an IL-2. Sie zeigten insgesamt die höchsten Konzentrationen.

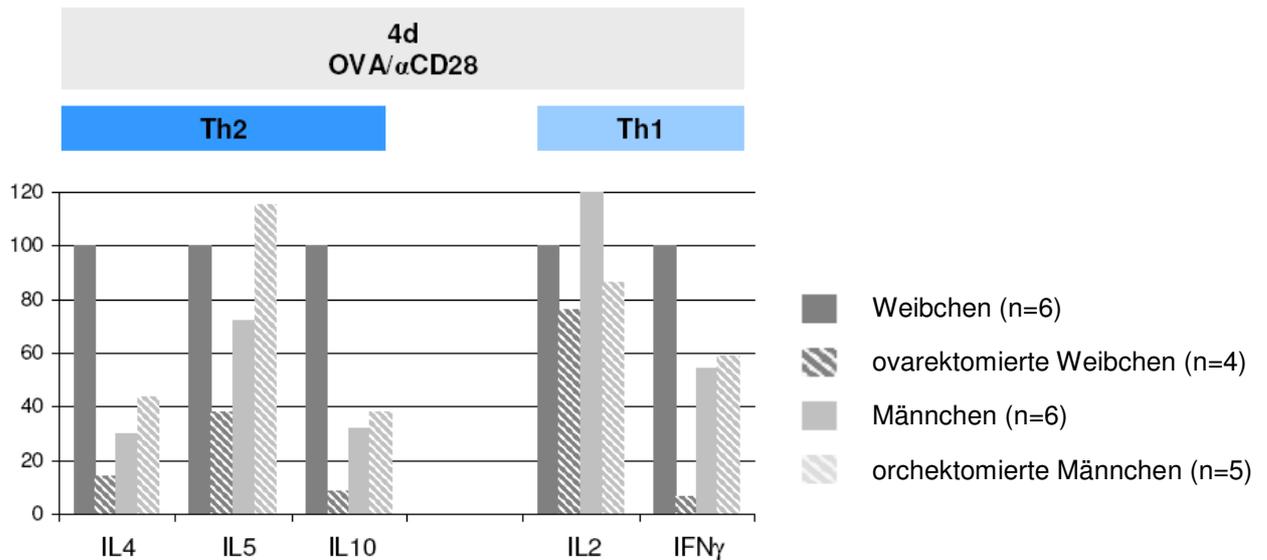
## IL-2



**Abb. 22: IL-2 Konzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c Mäusen.**

Konzentrationen als Einzelwerte von Weibchen (w, n=6), ovariectomierten Weibchen (wx, n=4), Männchen (m, n=6) und orchektomierten Männchen (mx, n=5), Mittelwertdarstellung als Balken, Detektionslimit 0,7 pg/ml.

Zur Veranschaulichung der Modulation der Zytokinkonzentrationen durch Geschlecht und Hormondeprivation wurde im Folgenden eine Darstellung gewählt, bei der die gemessenen Zytokinkonzentrationen der Weibchen als Bezugsgröße gelten und mit 100 % gleichgesetzt sind (Abb. 23). Die Darstellung orientiert sich allein an den entsprechend gemessenen Mittelwerten, gibt daher nur einen Überblick ohne Standardabweichungen zu berücksichtigen.

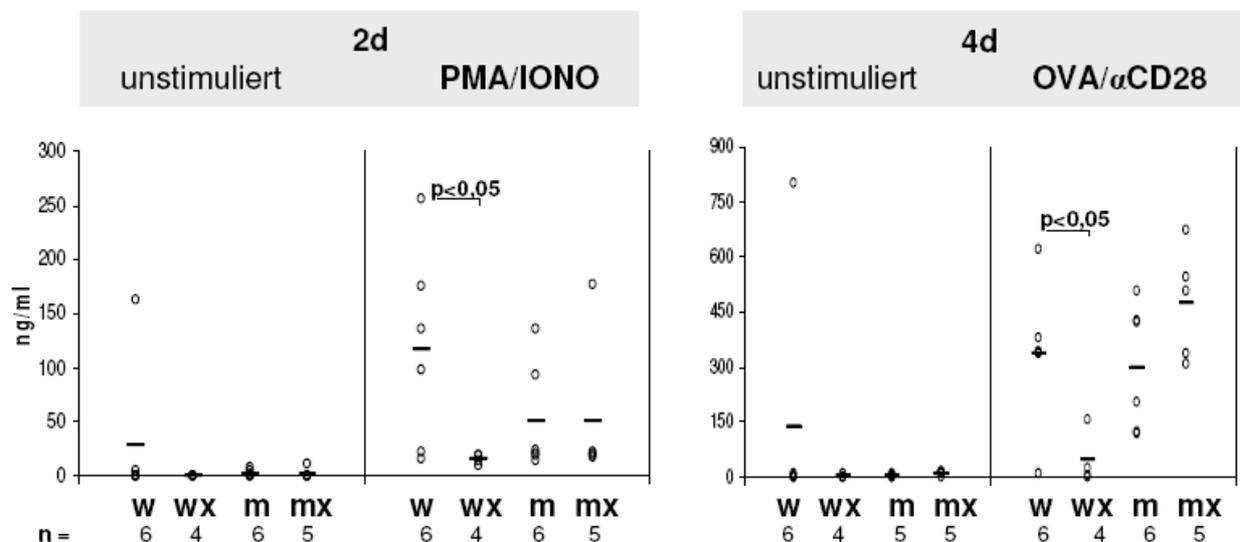


**Abb. 23: Zytokinkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.**

Vergleich von  $T_{H2}$  und  $T_{H1}$  Zytokinen, Zytokinkonzentrationen der Weibchen sind als Bezugsgröße auf 100 % gesetzt.

Bei IL-17 zeigten sich sowohl nach PMA/IONO-Stimulation als auch nach OVA-spezifischer-Stimulation signifikante Unterschiede zwischen Weibchen und ovariectomierten Weibchen. Die Konzentrationen von IL-17 waren bei der Gruppe der Weibchen am höchsten und bei den gonadektomierten Tieren am niedrigsten. Zwischen den orchektomierten und nicht-operierten Männchen ergab sich kein Unterschied.

## IL-17



**Abb. 24: IL-17 Konzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.**

Konzentrationen als Einzelwerte von Weibchen (w, n=6), ovariectomierten Weibchen (wx, n=4), Männchen (m, n=6) und orchektomierten Männchen (mx, n=5), Mittelwertdarstellung als Balken, Detektionslimit 2,7 pg/ml.

Die anderen mit der *Flow Cytometry* analysierten Zytokine IL-6, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  und GM-CSF zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. In der folgenden Tabelle werden die Messergebnisse aufgelistet (Tab. 7). Während die OVA-Stimulation bei einzelnen Tieren zu IL-6 Konzentrationen führte, die oberhalb des messbaren Bereichs lagen, waren die anderen 3 Zytokine größtenteils am unteren Grenzwert.

**Tab. 7: Übersicht der Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  und GM-CSF.**

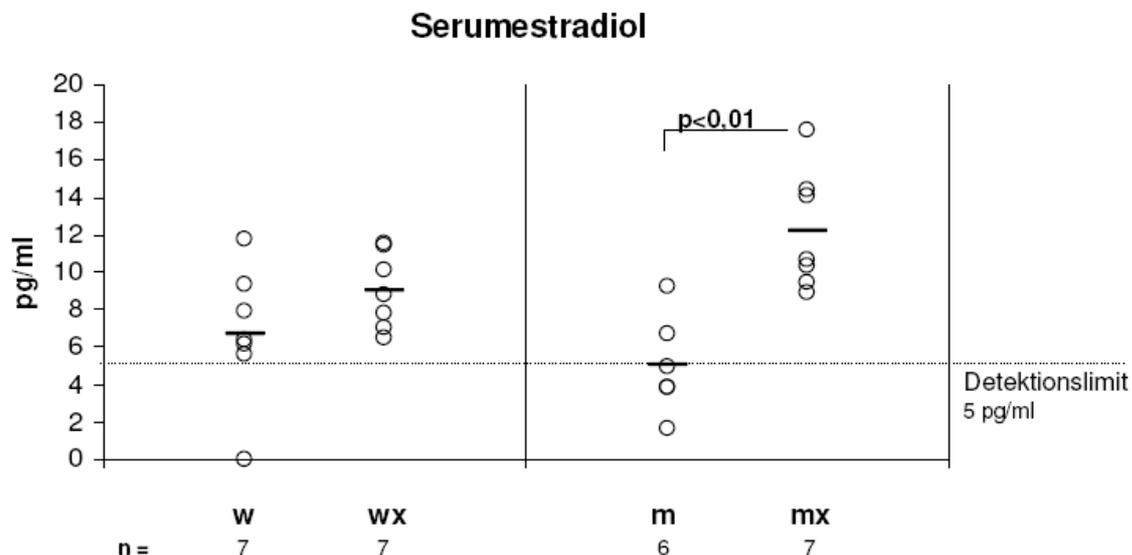
Geordnet nach jeweiligem Zytokin sind die Konzentrationen  $\pm$  SD der Weibchen (w), ovariectomierte Weibchen (wx), Männchen (m) und orchectomierte Männchen (m) gezeigt. Angabe der Werte unterhalb des Detektionslimits ( $\downarrow\downarrow$ ).

		4 d	
		unstim	OVA/ $\alpha$ CD28
<b>IL-6</b> Detektionslimit 1,7 pg/ml	w	946,14 ( $\pm$ 1986,60), n=6	4760,88 ( $\pm$ 1668,44), n=5
	wx	194,38 ( $\pm$ 120,55), n=4	3027,19 ( $\pm$ 984,32), n=4
	m	224,92 ( $\pm$ 73,59), n=5	4584,34 ( $\pm$ 1457,47), n=4
	mx	188,51 ( $\pm$ 57), n=5	3781,1 ( $\pm$ 1161,32), n=5
<hr/>			
<b>IL-1<math>\alpha</math></b> Detektionslimit 5,7 pg/ml	w	$\downarrow\downarrow$	31,51 ( $\pm$ 24,24), n=4
	wx	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
	m	$\downarrow\downarrow$	18,98 ( $\pm$ 4,63), n=4
	mx	$\downarrow\downarrow$	24,62 ( $\pm$ 9,62), n=4
<hr/>			
<b>TNF<math>\alpha</math></b> Detektionslimit 4,2 pg/ml	w	38,97 ( $\pm$ 73,28), n=5	64,72 ( $\pm$ 50,63), n=5
	wx	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
	m	$\downarrow\downarrow$	31,04 ( $\pm$ 31,58), n=5
	mx	$\downarrow\downarrow$	30,75 ( $\pm$ 17,12), n=4
<hr/>			
<b>GM-CSF</b> Detektionslimit 1,1 pg/ml	w	$\downarrow\downarrow$	33,23 ( $\pm$ 33,93), n=4
	wx	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
	m	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
	mx	6,9 ( $\pm$ 1,68), n=4	$\downarrow\downarrow$

#### 4.4 Serumestradiolkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen

Die Serumestradiolkonzentrationen der Weibchen unterschieden sich nicht signifikant von den Männchen. Ein weibliches Tier lag unterhalb des Detektionslimits des Testes. Bei den Männchen befanden sich 3 der 6 gemessenen Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits (Abb. 25).

Die Serumestradiolkonzentrationen der orchektomierten Männchen lagen signifikant höher als die der Männchen, wenn für die Berechnung des  $p$ -Wertes für die 3 Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits der Rechenwert eingegeben wurde.



**Abb. 25: Serumestradiolkonzentrationen bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen.**

Einzelwertdarstellung der Serumestradiolmessungen, Mittelwert als Querbalken, Detektionslimit 5 pg/ml, Werte unterhalb des unteren Standardwertes als Rechenwert, links 10-Wochen-alte Weibchen (w, n=7) im Vergleich zu ovariectomierten Weibchen (wx, n=7), rechts 10-Wochen-alte Männchen (m, n=6) im Vergleich zu orchektomierten Männchen (mx, n=7), (Versuchsreihe 2).

#### 4.5 Stammspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen

##### 4.5.1 Immunglobuline

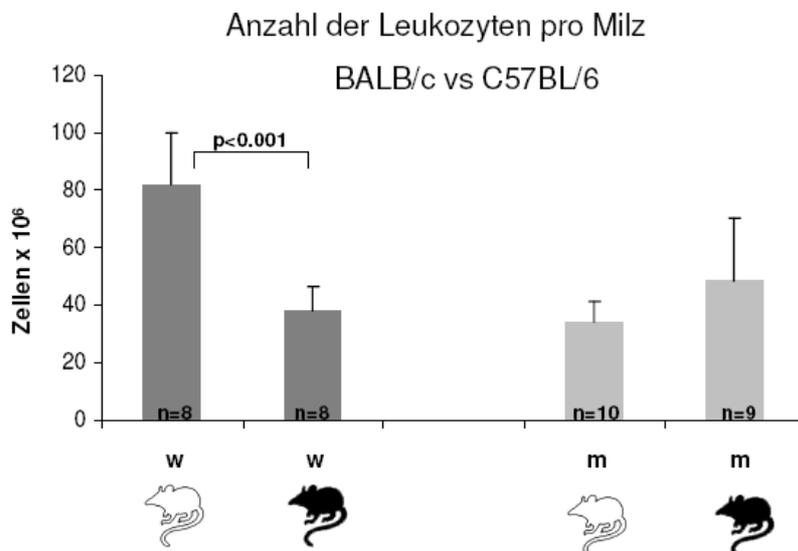
Bei dem C57BL/6-Stamm, einem als IgE *low-* oder *intermediate-responder* bekannten Stamm, war OVA-spezifisches-IgE im Serum der 10-Wochen-alten Mäuse nicht detektierbar (nicht gezeigte Ergebnisse).

Bei den 17-Wochen-alten Mäusen zeigte von 6 Weibchen ein Tier OVA-IgE (8.85 LU/ml, 1. Standard = 100). Von 6 17-Wochen-alten Männchen zeigten 2 Tiere messbare OVA-IgE Konzentrationen (11.98 LU/ml, 16,43 LU/ml). Selbst diese Werte fanden sich am unteren Detektionslimit, im unteren Bereich der Standardkurve, des ELISA.

Beim Vergleich der Gesamt-IgE-Konzentrationen der 10-Wochen-alten Mausgruppen zeigte sich, dass beim C57BL/6-Stamm die Konzentrationen signifikant niedriger ausfielen. BALB/c-Weibchen zeigten Konzentrationen von  $2580 \pm 661$  ng/ml während gleichaltrige C57BL/6-Weibchen nur Konzentrationen von  $86 \pm 48$  ng/ml aufwiesen. Bei den Männchen lagen wiederum BALB/c-Tiere mit  $3762 \pm 1304$  ng/ml deutlich höher als die Männchen des C57BL/6-Stammes mit  $68 \pm 50$  ng/ml (Abb. 11, Abb. 27). Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0,01$ .

#### 4.5.2 Anzahl der Leukozyten pro Milz

Auf der Ebene der Gesamtzahl an Leukozyten pro Milz hingegen zeigte sich bei den Weibchen ein signifikanter Unterschied. BALB/c-Weibchen hatten eine signifikant höhere Anzahl an Leukozyten. Bei den 10-Wochen-alten Männchen zeigte sich kein stammspezifischer Unterschied.



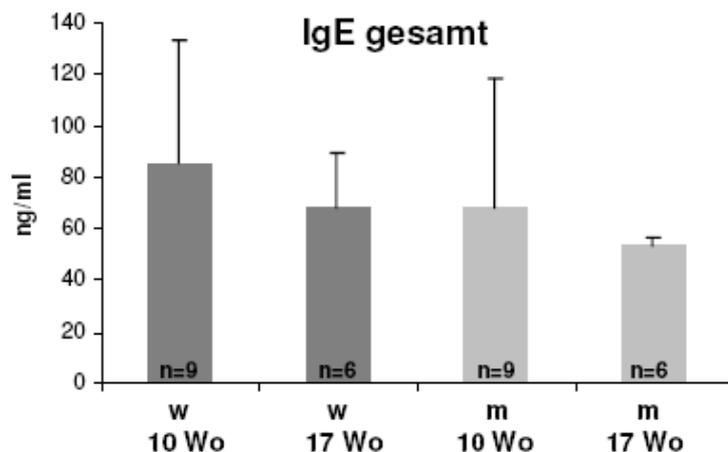
**Abb. 26: Vergleich der Anzahl der Leukozyten pro Milz von 10-Wochen-alten BALB/c- im Vergleich zu gleichaltrigen C57BL/6-Mäusen.**

Zellzählung der Einzelzellsuspensionen der Milzen. Links 10-Wochen-alte Weibchen BALB/c-Weibchen (w, n=8), im Vergleich zu gleichaltrigen C57BL/6-Weibchen (w, n=8). Rechts 10-Wochen-alte BALB/c-Männchen (n=10) im Vergleich zu gleichaltrigen C57BL/6-Männchen (n=9), Darstellung als Mittelwert der Zellzahl x  $10^6$  + SD.

#### 4.6 Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der systemischen allergischen Immunantwort bei C57BL/6-Mäusen

##### 4.6.1 Immunglobuline

Im C57BL/6-Stamm zeigten sich keine alters- oder geschlechtsspezifischen Unterschiede bezogen auf das Gesamt-IgE. Die Standardabweichungen innerhalb der Gruppen waren bei den jüngeren Tieren ausgeprägter als bei der älteren Tiergruppe.



**Abb. 217: Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen bei C57BL/6-Mäusen.**

ELISA-Messungen der Serumkonzentrationen von Gesamt-IgE bei 10-Wochen-alten Weibchen (w, n=9), 17-Wochen-alten Weibchen, (w, n=6), 10-Wochen-alten Männchen (m, n=9) und 17-Wochen-alten Männchen (m, n=6), Darstellung als Mittelwert + SD, (Versuchsreihe 3).

OVA-IgG<sub>1</sub> war detektierbar, doch auch hier zeigten sich bei ausgeprägten interindividuellen Unterschieden, keine alters- oder geschlechtsspezifischen Unterschiede (Ergebnisse nicht gezeigt).

OVA-IgG<sub>2a</sub> konnte auch im C57BL/6-Stamm bei den 17-Wochen-alten Mäusen mittels ELISA nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für die humorale allergische Immunantwort im C57BL/6-Stamm im Vergleich zum BALB/c-Stamm ergab sich zusammenfassend folgendes Ergebnis:

**Tab. 8: Vergleichende Darstellung des Einflusses von Stamm und Alter auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der humoralen allergischen Immunantwort.**

\* =  $p < 0,05$

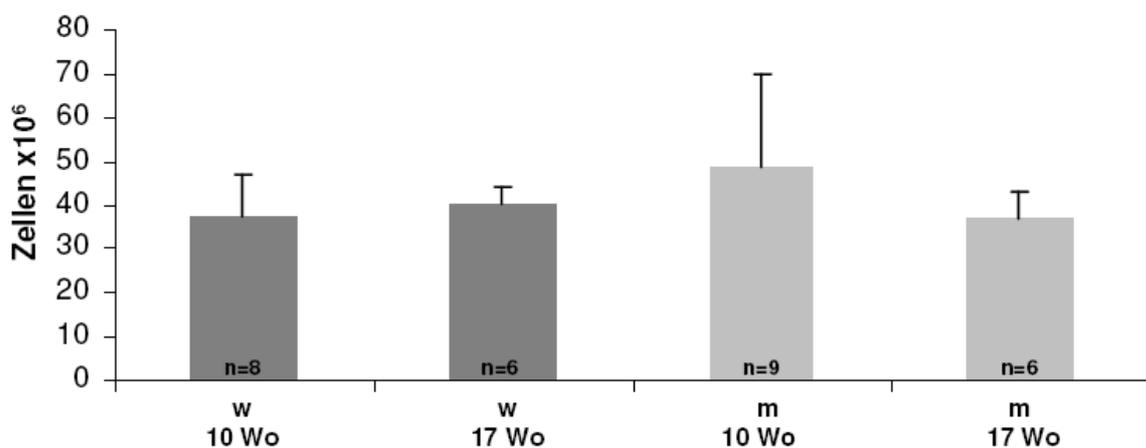
↓↓ = nicht detektierbar

Mausstamm	Alter in Wochen	Gesamt-IgE	OVA-IgE	OVA-IgG <sub>1</sub>	OVA-IgG <sub>2a</sub>
BALB/c 	10	♀ ≤ ♂	♀ = ♂	♀ = ♂	
	16	♀ > ♂ *	♀ > ♂ *	♀ > ♂ *	↓↓
C57BL/6 	10	♀ = ♂	↓↓	♀ = ♂	
	17	♀ = ♂	↓↓	♀ = ♂	↓↓

#### 4.6.2 Anzahl der Leukozyten in der Milz

Bei der Zellzählung der Leukozyten ergaben sich im C57BL/6-Stamm ebenfalls keine alters- oder geschlechtsspezifischen Unterschiede.

### Anzahl der Leukozyten pro Milz



**Abb. 28: Anzahl der Leukozyten pro Milz, 10- und 17-Wochen-alte C57BL/6-Mäuse.**

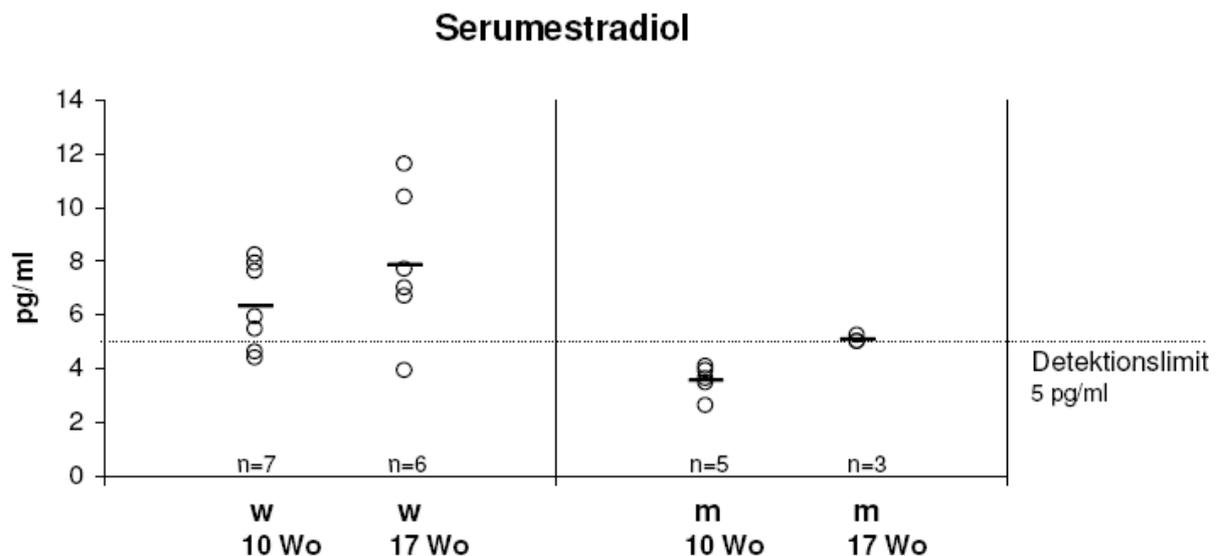
Zellzählung der Einzelzellsuspensionen der Milzen von 10-Wochen-alten Weibchen (w, n=8), 17-Wochen-alten Weibchen, (w, n=6), 10-Wochen-alten Männchen (m, n=9) und 17-Wochen-alten Männchen (m, n=6), Darstellung als Mittelwert der Zellzahl x 10<sup>6</sup> + SD, (Versuchsreihe 3).

#### 4.7 Serumestradiolkonzentrationen bei 10- und 17-Wochen-alten C57BL/6-Mäusen

2 der 7 Tiere aus der Gruppe der 10-Wochen-alten Weibchen liegen unterhalb des Detektionslimits des RIA. Bei den adulten Weibchen fällt 1 der 6 gemessenen Tiere unterhalb des Grenzwertes. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich zwischen den 2 Altersgruppen nicht.

Bei den Männchen fällt die Gruppe der 10-Wochen-alten Tiere komplett unterhalb des Detektionslimits. Die Serumkonzentrationen der adulten Männchen liegen insgesamt um das Detektionslimit von 5 ng/ml herum. Zwischen den beiden Altersgruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied.

Geschlechtsspezifische Unterschiede sind ebenfalls nicht messbar.



**Abb. 29: Serumestradiolkonzentrationen bei 10- und 17-Wochen-alten C57BL/6-Mäusen.**

Einzelwertdarstellung der Serumestradiolmessungen, Mittelwertdarstellung als Querbalken, Detektionslimit 5 pg/ml, Werte unterhalb des unteren Standardwertes als Rechenwert, links 10-Wochen-alte Weibchen (w, n=7) im Vergleich zu 17-Wochen-alten Weibchen (w, n=6), rechts 10-Wochen-alte Männchen (m, n=5) im Vergleich zu 17-Wochen-alten Männchen (m, n=3), (Versuchsreihe 3).

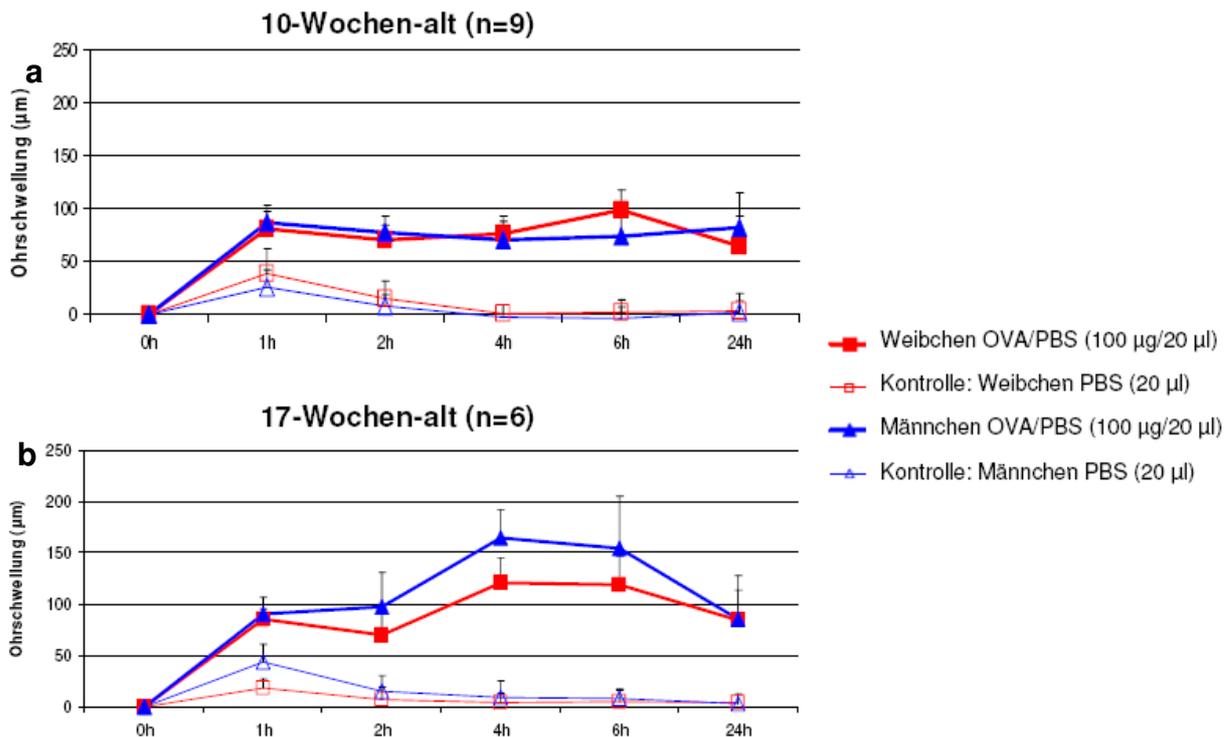
#### 4.8 Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der lokalen allergischen Immunantwort bei C57BL/6-Mäusen

##### 4.8.1 Ear-swelling

Bei der Auswertung der lokalen Reaktion auf das Allergen, der intrakutanen Provokation, wurde bei der jüngeren Gruppe das Schwellungsmaximum von etwa 80  $\mu$ m nach 1 Stunde erreicht. Bei den Messungen nach 4 und 6 Stunden kam es zu

keinen signifikanten Änderungen. Selbst nach 24 Stunden war eine Schwellung nachweisbar, die dem 1-h-Wert glich (Abb. 30).

Bei der älteren Gruppe wurde ein erstes Schwellungsmaximum ebenfalls nach 1 Stunde erreicht. Ein zweites Schwellungsmaximum erfolgte nach 4 Stunden. Das bereits nach 1 Stunde erreichte Ausmaß von etwa 80  $\mu\text{m}$  Schwellung konnte bei beiden Altersgruppen noch nach 24 Stunden nachgewiesen werden.

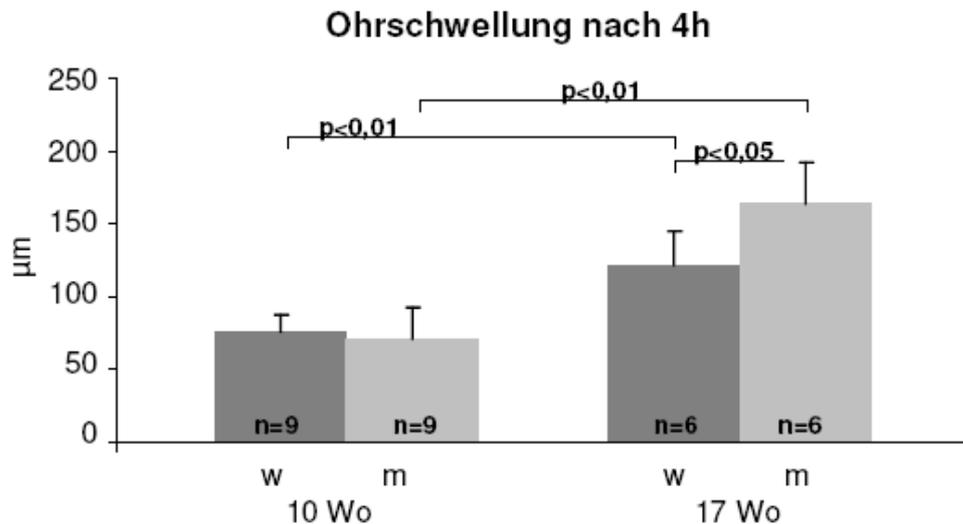


**Abb. 30: Ohrschwellung bei 10- und 17-Wochen-alten C57BL/6-Mäusen.**

10-Wochen-alte Weibchen und Männchen je n=9, 17-Wochen-alte Weibchen und Männchen je n=6. Messung der Ohrdicke mit einem abgefederten Messgerät, Ohrdicke vor Applikation als Nullwert (T<sub>0</sub>), Messung der Ohrschwellung (T<sub>1</sub>-T<sub>0</sub>) nach intrakutaner Applikation in die Ohrmuschel von OVA/PBS (100 µg/20 µl) oder PBS (20 µl) als Kontrollwert nach 1, 2, 4, 6, 24 h, (Versuchsreihe 3).

Die Schwellung der älteren Mäuse war durch das zweite Schwellungsmaximum nach 4 Stunden signifikant stärker ausgeprägt als bei den jüngeren Tieren (Abb. 31).

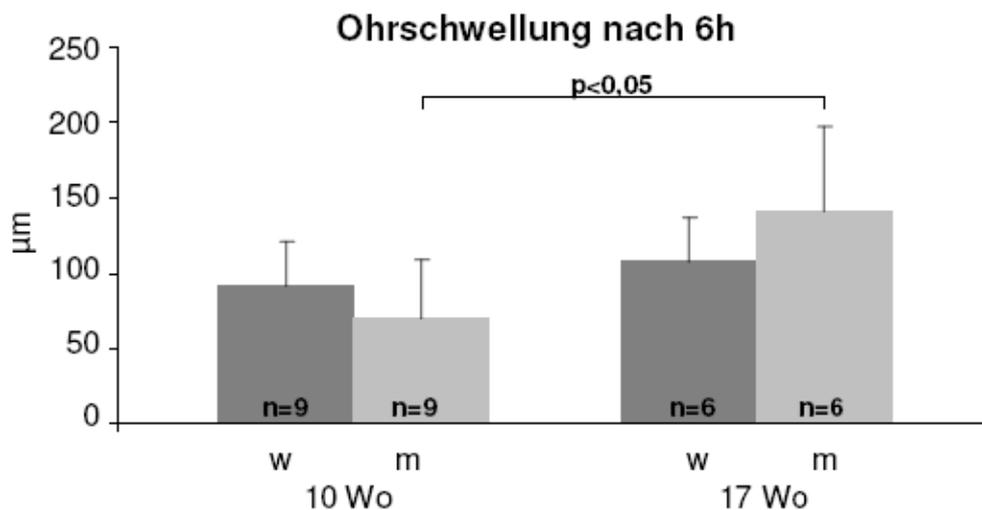
In der Reaktion der 10-Wochen-alten Mausgruppe gab es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Bei den 17-Wochen-alten Mäusen zeigten Männchen hingegen nach 4 Stunden eine signifikant stärkere Schwellung als die gleichaltrigen Weibchen (Abb. 31).



**Abb. 31: Ohrschwellung nach 4 Stunden mit geschlechts- und altersspezifischen Unterschieden.**

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede waren nach 6 Stunden bei der adulten Mausgruppe nicht mehr nachweisbar.

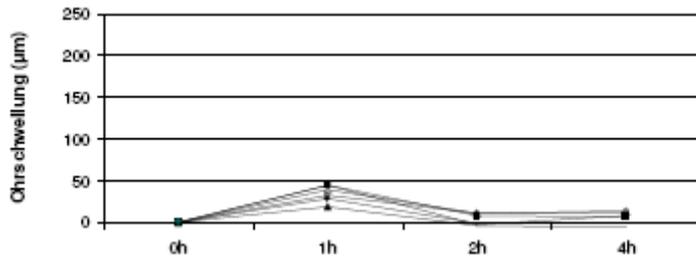
Bestehen blieb jedoch der altersspezifische Unterschied bei den Männchen. Die adulten Männchen zeigten weiterhin eine signifikant stärkere Ohrschwellung als die 10-Wochen alten Männchen. Zwischen den Weibchen der 2 Altersgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied mehr (Abb. 32).



**Abb. 32: Ohrschwellung nach 6 Stunden mit geschlechts- und altersspezifischen Unterschieden.**

Links in der Darstellung 10-Wochen-alte Weibchen (w) und Männchen (m) je n=9. Rechts in der Darstellung 17-Wochen-alte Weibchen (w) und Männchen (m) je n=6. Vergleich der Ohrschwellung nach geschlechts- und altersspezifischen Aspekten zum Zeitpunkt der ausgeprägtesten Schwellung nach 4 und 6 Stunden. Darstellung als Mittelwert der Ohrdicke in µm + SD.

Bei den naiven Kontrollmäusen, 3 17-Wochen-alte Weibchen aus dem C57BL/6-Stamm, zeigte sich nach einer Stunde ausschließlich die durch das Flüssigkeitsvolumen bedingte Anschwellung. Die Resorption erfolgte in der folgenden Stunde, so dass die Ohrdicke nach 2 Stunden der Ausgangsdicke entsprach.



**Abb. 33: Kontrolle der Ohrschwellung bei naiven 17-Wochen-alten C57BL/6-Weibchen.**

Provokation an nicht sensibilisierten Mäusen, n=3, Messung der Ohrdicke und Ohrschwellung nach selbigem Protokoll.

#### 4.8.2 Histologie

24 Stunden nach der Provokation wurden die Ohren abgetrennt und bis zur histologischen Aufarbeitung in Kryo eingebettet. Eine erste exemplarische Eosin-Papanicolau Färbung zeigte sowohl bei den 17-Wochen-alten Weibchen (Abb. 34 + 35, jeweils b+d) wie auch bei den gleichaltrigen Männchen (Abb. 36b) auf die OVA-Provokation ein deutliches Infiltrat und ein interzelluläres Ödem der Dermis des Ohres. Auf der Seite der Einstichstelle fanden sich oberhalb des Ohrknorpels im Falle der Negativ-Kontrolle, der Injektion von PBS, hingegen weder interzelluläres Ödem noch zelluläres Infiltrat (Abb. 34 + 35, jeweils a+c; 36a).

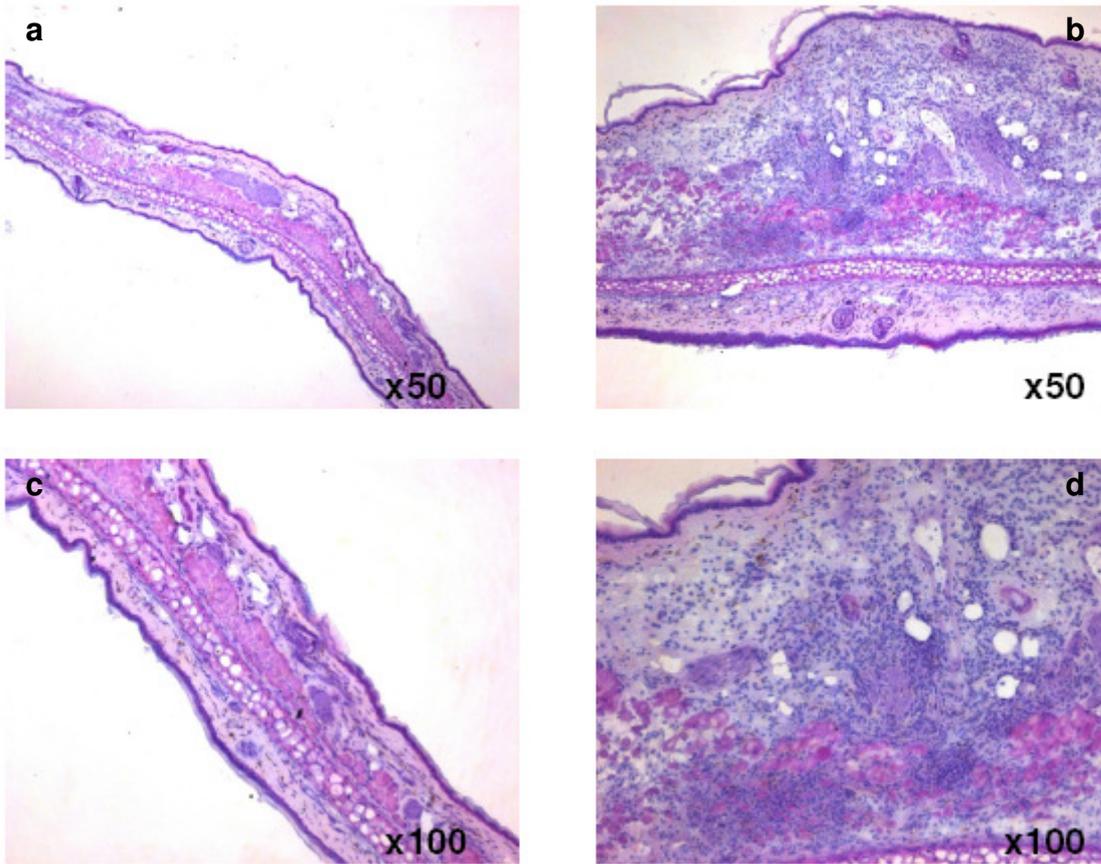
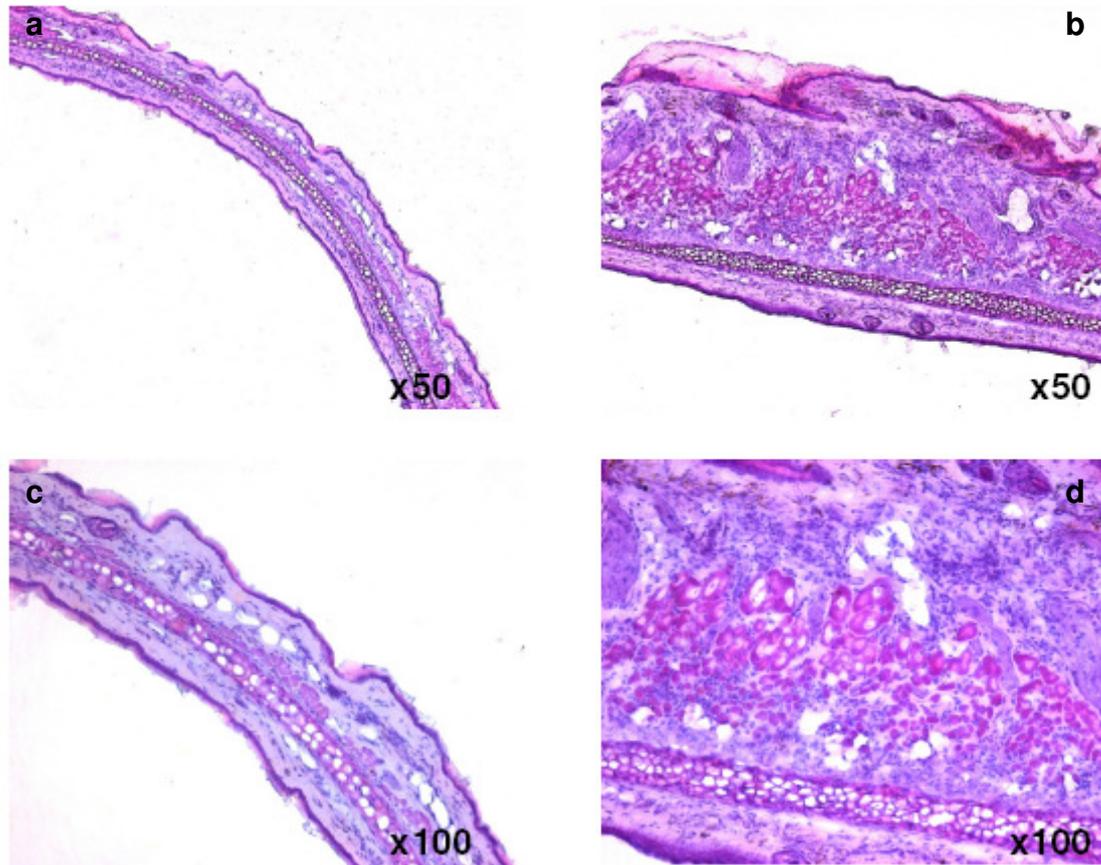


Abb. 34: Histologie der Querschnitte des linken (a, c) und rechten (b, d) Ohres eines 17-Wochen-alten Weibchens.

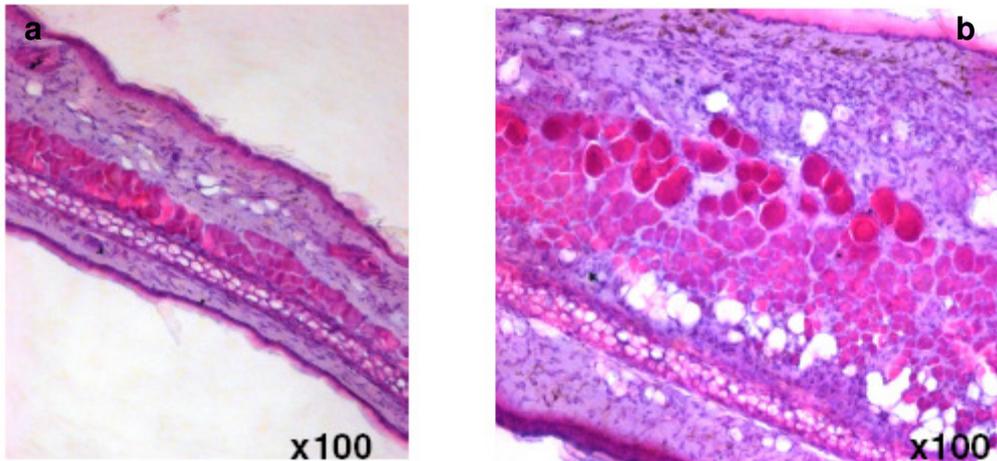


**Abb. 35: Histologie der Querschnitte des linken (a, c) und rechten (b, d) Ohres eines 17-Wochen-alten Weibchens.**

5 µm Schnittdicke, Färbung Papanicolau/Eosin

a + c: linkes Ohr, Kontrolle, 24 h nach intrakutaner Injektion von 20 µl PBS,  
Vergrößerungen x50 (a), x100 (c)

b + d: rechtes Ohr, OVA-Provokation, 24 h nach intrakutaner Injektion von 100 µg OVA in 20 µl PBS,  
Vergrößerungen x50 (b), x100 (d)



**Abb. 36: Histologie der Querschnitte des linken (a) und rechten (b) Ohres eines 17-Wochen-alten Männchens.**

5 µm Schnittdicke, Färbung Papanicolau/Eosin

a: Kontrolle, linkes Ohr, 24 h nach intrakutaner Injektion von 20 µl PBS, Vergrößerung x100

b: OVA-Provokation, rechtes Ohr, 24 h nach intrakutaner Injektion von 100 µg OVA in 20 µl PBS,  
Vergrößerung x100

## 5 DISKUSSION

### **5.1 Einfluss des Geschlechts auf die systemische allergische Immunantwort bei BALB/c-Mäusen**

Die bisher in Asthma-Modellen gezeigten geschlechtsspezifischen Unterschiede mit höheren Immunglobulinkonzentrationen bei Weibchen [50, 51], konnten wir in unserem gewählten Immunisierungsschema mit ausschließlich systemischer Sensibilisierung bestätigen. Bei den adulten BALB/c-Mäusen zeigten sich signifikant höhere Serumkonzentrationen von allergen-spezifischem IgE und Gesamt-IgE. OVA-spezifisches-IgG<sub>2a</sub> als Ausdruck einer T<sub>H</sub>1 dominierten Immunantwort war nicht nachweisbar.

### **5.2 Einfluss von Geschlecht und Alter auf die systemische allergische Immunantwort bei BALB/c-Mäusen**

Bei der jüngeren Vergleichsgruppe, die im Alter von 10 Wochen analysiert wurde, zeigten sich keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede.

Für das Gesamt-IgE zeichnete sich vielmehr ein umgekehrter Trend der Immunglobulinkonzentrationen mit höheren Serumspiegeln bei den Männchen aus.

Zu einer Angleichung der geschlechtsspezifischen Unterschiede kam es bei den Serumkonzentrationen von OVA-IgE und OVA-IgG<sub>1</sub>. Vor allem bei OVA-IgG<sub>1</sub>, das die Aktivität des Immunglobulinklassenwechsels verdeutlicht, fielen hohe Standardabweichungen auf.

Die Angleichung der Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen bestätigte sich auch auf zellulärer Ebene. Neben den primären Lymphorganen, Thymus und Knochenmark ist die Milz als sekundäres lymphatisches Organ maßgeblich an der systemischen Immunantwort beteiligt. Die Anzahl der OVA-IgE produzierenden Zellen in der Milz unterschied sich zwischen Weibchen und Männchen nicht.

Untersuchungen zur Frequenz IgE-sezernierender B-Zellen, zur Betrachtung von geschlechtsspezifischen Unterschieden, sind kaum zu finden. Bei der Betrachtung der Wirkung von Estrogenen auf die B-Zell-Entwicklung konnte mittels *knock-out*-Mäusen gezeigt werden, dass ER $\alpha$ -vermittelt nach Zufuhr von E2 die Anzahl immunglobulin-sezernierender Zellen in den Milzen von Weibchen [27] und Männchen [27, 61]

zunahm. Dies bestätigte die Bedeutung von E2 für die ER $\alpha$ -vermittelte Zunahme an Immunglobulin-sezernierenden B-Zellen und lieferte einen weiteren möglichen Hinweis für den Zusammenhang von Estrogenen und der von uns gemessenen ausgeprägteren humoralen allergischen Immunantwort der adulten Weibchen. So handelte es sich auch in diesen Studien um adulte, sogar bis zu 18-Monate-alte Tiere.

Ergebnisse mit einer vergleichbaren Altersgruppe bei physiologischen Sexualhormonkonzentrationen im Rahmen eines Allergiemodells liegen nicht vor.

Es ist demnach mit diesem Sensibilisierungsprotokoll gelungen auf Ebene der humoralen allergischen Immunantwort nicht nur die bisher gezeigten geschlechtsspezifischen Unterschiede bei adulten Mäusen zu bestätigen, sondern auch einen Einfluss des Alters aufzuzeigen.

Daten von Lamason *et al.* [35] zeigen ein ähnliches altersabhängiges Profil. Auf der Ebene der Genexpression und Gesamt-Immunglobulinkonzentrationen haben sie geschlechtsspezifische Unterschiede in der angeborenen und adaptiven Immunantwort gezeigt. Diese sind bei den prä-pubertären Mäusen noch nicht ausgebildet, deuten sich zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife an und werden bei adulten Mäusen signifikant.

Es kann ferner festgestellt werden, dass das epidemiologische Bild mit der Pubertät als Umkehrpunkt (Abb. 2) in dem gewählten *in vivo* System auf Niveau der humoralen allergischen Immunantwort eine Entsprechung findet. Während bei einer 10-Wochen-alten Mausgruppe keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachweisbar waren, dominierten bei den adulten Tieren die Immunglobulinkonzentration der Weibchen.

Die gezeigten höheren Gesamt-IgE-Konzentrationen bei Jungen [6], deuten sich mit unseren Messwerten im gewählten Mausmodell an.

Ob sich dieser Trend bei prä-pubertären Tieren zum signifikanten Unterschied zugunsten der Männchen wenden könnte, bleibt zu untersuchen. Methodisch sind durch die Sensibilisierungsphase von 7 Wochen diesem Vergleich jedoch Grenzen gesetzt. Selbst wenn kurz nach Geburt die Sensibilisierung initiiert würde, würde die ab der fünften Woche einsetzende Geschlechtsreife die Untersuchung limitieren [35]. Für eine vergleichende Studie mit prä-pubertären Mäusen müsste ein wesentlich kürzeres Sensibilisierungsprotokoll gewählt werden.

Zwar ist eine erhöhte Bereitschaft auf ein Antigen mit hohen IgE-Konzentrationen zu reagieren ein Merkmal der Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, aber es steht außer Frage, dass die Höhe der Immunglobulinkonzentration im Serum nicht allein

Ausschlag gebend ist für die Ausbildung einer allergischen Erkrankung oder für den Schweregrad einer allergischen Reaktion.

An molekularen Mechanismen konnte bisher gezeigt werden, dass IgE ein positiver Regulator für Expression seines spezifischen Rezeptors Fc $\epsilon$ -RI ist. Gebundenes IgE erhöht die Dichte der Rezeptoren und damit konsekutiv die Dichte von gebundenem IgE auf der Zelloberfläche von Effektorzellen der allergischen Immunantwort. Die Wahrscheinlichkeit einer Quervernetzung wird gesteigert [62-64]. An welcher Stelle der Signalkaskade welche spezifischen Mechanismen greifen, die zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden der humoralen allergischen Immunantwort führen, bleibt zu diesem Zeitpunkt ungeklärt.

Die weiteren Ergebnisse und Betrachtungen der zellulären Gegebenheiten sowie des Zytokinmilieus ermöglichten dabei eine schrittweise Annäherung.

In der Milz zeigte sich einerseits kein geschlechtsspezifischer Unterschied bei der Anzahl der OVA-IgE produzierenden Zellen. Andererseits war die Anzahl der Leukozyten insgesamt bei den Männchen signifikant niedriger als bei den Weibchen.

Gesamtzellzählungen sind in dieser Form in der Literatur im Geschlechtervergleich nicht zu finden. Humane Daten zeigten, dass bei der Gesamtzahl der peripheren Lymphozyten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede vorliegen, es jedoch postmenopausal mit Wegfall der körpereigenen Estrogenproduktion zu einer Reduktion der Anzahl der Lymphozyten kommt [65]. Grimaldi *et al.* [32, 66] haben Studien durchgeführt, die zeigen, dass unter Estrogenzufuhr das Überleben der B-Zellen in der Milz erhöht ist. Estrogen zeichnet sich als protektiver Faktor gegenüber der Apoptose aus, indem BCL-2 vermindert exprimiert wird.

Es kann demnach sein, dass in den gezeigten Ergebnissen vor allem die B-Zell-Population für die höhere Anzahl der Leukozyten bei Weibchen verantwortlich war. Dafür spricht auch, dass ER $\beta$  auf allen B-Zellen und ER $\alpha$  auf den reifen B-Zellen zu finden ist, Estrogen also in allen Entwicklungsphasen der B-Zelle rezeptorvermittelt angreifen kann.

Da die Lymphozyten allerdings nur 30 % der Leukozyten ausmachen und die B-Zellen einen Anteil von 15 % stellen, muss davon ausgegangen werden, dass auch andere Zellpopulationen zu der deutlich höheren Zellzahl bei den Weibchen beitragen. So machen den weit größeren Anteil der Lymphozyten die T-Zellen mit 85-90 % aus [67].

Um weitere Rückschlüsse auf Unterschiede im Verhältnis der Zellpopulationen zueinander oder besonders stark proliferierende Zellsubtypen ausmachen zu können, wäre eine Zellzählung mit Zelltypisierung erforderlich.

Die T-Zell-Population ist die weitaus größere Population der Blutlymphozyten. Ihr Aktivierungsgrad und Zytokinprofil ist für die Regulation der IgE-Produktion entscheidend. Daher werden im Folgenden die geschlechtsspezifischen Ergebnisse der Zytokinmessung aus den Milzzellkulturen besprochen.

Bei den Interleukinen der T<sub>H</sub>2 dominierten Immunantwort, die den Klassenwechsel zur IgE-Produktion begünstigen, zeigten Weibchen tendenziell höhere Konzentrationen.

IL-4 wird von T<sub>H</sub>2-Zellen produziert und aktiviert B-Zellen, steigert ihr Wachstum und provoziert den Immunglobulinklassenwechsel bei der Maus hin zu IgG<sub>1</sub> und einer verstärkten IgE-Produktion. Auch das Wachstum und Überleben der T-Zellen wird durch IL-4 positiv beeinflusst. IL-10 wird ebenfalls von T<sub>H</sub>2-Zellen produziert, hemmt die T<sub>H</sub>1-Antwort und supprimiert die Effektorfunktionen von Makrophagen und natürlichen Killerzellen [68]. Gleichzeitig fördert es in B-Zellen, die den IgE-Klassenwechsel bereits vollzogen haben, die IgE-Synthese [69].

Es zeigten sich bei 2 Interleukinen, die die IgE-Produktion und -Synthese bahnen, nach OVA-spezifischer Stimulation bei Weibchen höhere Werte. Dieser Unterschied ergab sich nicht für IL5 und auch bei T<sub>H</sub>1-Zytokinen wie IFN $\gamma$  und IL-2 zeigte sich kein deutlich messbarer Trend.

Giron-Gonzales *et al.* [70] setzen zur näheren Betrachtung der Unterschiede zwischen den Geschlechtern Zytokine der T<sub>H</sub>1-Antwort ins Verhältnis zu Zytokinen der T<sub>H</sub>2-Antwort. IFN $\gamma$  wurde als Markerzytokin der T<sub>H</sub>1-Antwort gewählt. IFN $\gamma$  wird sowohl von T<sub>H</sub>1-Zellen als auch von zytotoxischen T-Zellen sezerniert und inhibiert das Wachstum der T<sub>H</sub>2-Zellen vor allem durch Induktion der IL-12-Synthese. Bei den B-Zellen provoziert es eine Immunglobulinproduktion von IgG<sub>2a</sub> und supprimiert den Klassenwechsel [71, 72].

Von unseren Ergebnissen ausgehend zeigte sich dabei folgendes Bild: Das Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 betrug bei den Männchen rund 10:1, bei den Weibchen hingegen nur 6:1. Ähnlich ergab sich für das Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-10 mit 21:1 bei den Männchen und 12:1 bei Weibchen. Bei Männchen überwog IFN $\gamma$  deutlich gegenüber den IgE-Klassenwechsel begünstigenden Interleukinen IL-4 und IL-10.

Dass dies nicht zu signifikanten Unterschieden bei der humoralen Immunantwort der 10-Wochen-alten Mäuse führte, kann mehrere Ursachen haben. Die Analysen erfolgten *in vitro* mit den Seren, die am Versuchsende gewonnen wurden. Es ist daher möglich, dass sich das abzeichnende T<sub>H</sub>2-Milieu mit stärkerer Ausprägung bei den Weibchen erst gegen Ende des Versuches ausbildete – zu spät für eine ausreichende Beeinflussung der B-Zell-Antwort. Es wäre denkbar, dass das T-Zell-Profil, das sich bei der 10-Wochen-alten Mausgruppe abzeichnete, entsprechend frühzeitiger und konstanter *in vivo* bei der älteren Mausgruppe vorherrschte und zu den dort gemessenen geschlechtsspezifischen Unterschieden mit höheren Immunglobulinkonzentrationen bei den Weibchen führte.

Daneben bleibt die Ungewissheit darüber, wie viel Anteil die unterschiedlichen Zellen der Milzzellkultur an dem Gesamtergebnis der Zytokinmessung haben. Da verschiedene Zelltypen die gleichen Zytokine sezernieren, waren für das Ergebnis nicht ausschließlich T-Zellen verantwortlich. Darüber hinaus gilt zu beachten, dass zwar die in Kultur genommene Zellzahl für Weibchen und Männchen gleich war, doch nicht gesagt ist, dass bei beiden Geschlechtern die Lymphozytensubpopulationen in gleichem Verhältnis zueinander standen.

Da keine Zelltypisierung erfolgte, ist unklar, wie zum Beispiel das Verhältnis der B-Zellen zu den T-Zellen war. In der Literatur wird beschrieben, dass bei gleicher Gesamtzahl der Lymphozyten der Anteil der T-Zellen bei Männern geringer ist [67]. Wenn dies bei unseren Zellkulturen der Fall wäre, könnten sich insgesamt geringere Zytokinkonzentrationen bei Männchen durch den geringeren Anteil von T-Zellen in der Kultur erklären. Es bleibt jedoch zu klären, inwiefern diese von Bouman *et al.* [67] gezeigten Ergebnisse aus humanen Studien auf Mausmodelle übertragen werden können. Weiterhin ist anzunehmen, dass die Sensibilisierung sowohl B- als auch T-Zell-Kompartimente aktivierte und eine Proliferation stimulierte. Inwiefern sich dabei geschlechtsspezifische Unterschiede beziehungsweise Sexualhormone auswirken, bleibt ungeklärt.

Wenn weiterhin davon ausgegangen wird, dass das Verhältnis der zytotoxischen T-Zellen zu den T-Helferzellen bei beiden Geschlechtern gleich ist [73], bleibt bei unserem Ergebnis das Verhältnis der Zytokine zueinander auffällig. Nach OVA-spezifischer Stimulation überwogen die IFN $\gamma$ -Konzentrationen bei Männchen die Konzentrationen von IL-4 und IL-10 in einem Verhältnis, das deutlich ausgeprägter war als das der Weibchen.

Bei der Messung der Serumestradiolkonzentrationen bei den 10-Wochen-alten Weibchen zeigten sich insgesamt sehr geringe Werte. Sie schwankten um 7 pg/ml, wobei ein Weibchen sogar unter das Detektionslimit fiel. Ein signifikanter Unterschied zu den Konzentrationen der Männchen war nicht messbar, wobei bei den Männchen 3 von 6 Werten unterhalb des Detektionslimits fielen.

Inwiefern die relativ einheitliche Serumkonzentrationen von E2 bei 10-Wochen-alten Weibchen und Männchen für die Angleichung der Unterschiede bei der humoralen Immunantwort ursächlich war, bleibt an dieser Stelle offen. Ebenso bleibt offen, ob die bei den adulten Mäusen gezeigten Unterschiede eher durch den begünstigenden Einfluss von Estrogen oder die supprimierende Wirkung von Testosteron verursacht wurde. Angesichts der insgesamt auffällig niedrigen Serumestradiolkonzentrationen werden Testverfahren und Ergebnisse an späterer Stelle ausführlicher diskutiert.

### **5.3 Einfluss der Gonadektomie auf die systemische allergische Immunantwort bei BALB/c-Mäusen**

Bei der humoralen allergischen Immunantwort fiel auf, dass die Serumkonzentrationen der Immunglobuline der gonadektomierten Tiere nicht von den Vergleichsgruppen abwichen. Es zeigte sich weder für Gesamt-IgE noch für OVA-spezifische Immunglobuline ein signifikanter Unterschied.

Eine Begründung dafür könnte sein, dass bei nicht-operierten Tieren die gonadale Sexualhormonproduktion erst im Versuchsverlauf eingetreten war. Es ist anzunehmen, dass die Geschlechtsreife bei einigen nicht-gonadektomierten Tieren bereits um den Zeitpunkt der ersten Sensibilisierung eingetreten war. Bei anderen trat sie vielleicht erst zum Zeitpunkt der Provokation gegen Ende des Protokolls ein.

Daher fällt wahrscheinlich die Zeitspanne der Interaktion von Sexualhormonen mit dem Immunsystem in unterschiedliche Phasen der Ausbildung der allergischen Immunantwort. Dies hätte zum Einen zur Folge, dass bei einigen Tieren zum Beispiel die Latenz zwischen Einflussnahme von E2 auf die B-Zelle über den genomischen-Signalweg bis hin zur *de-novo*-Synthese der Proteine, den hier gemessenen Immunglobulinen zu lang war, um einen signifikanten Unterschied zu den hormoneprivierten Weibchen auszubilden.

Zweitens muss dabei auch bedacht werden, dass E2 ein dualer Wirkmechanismus zugesprochen wird. Riffo-Vasquez *et al.* [74] zeigen, dass in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Ovariectomie zu Sensibilisierungs- oder Provokationsphase, E2 entweder immunsuppressiv oder -protektiv wirkt. Im Umkehrschluss hieße dies, dass ein Anstieg des physiologischen E2-Spiegels je nach Phase der allergischen Kaskade eine verstärkte oder verminderte allergische Reaktion provozieren würde.

In Bezug auf die Wirkung von Estrogenen rückt ein anderer Aspekt mehr und mehr in den Fokus der Wissenschaften – die Bedeutung der Xenoestrogene. Unter diesen Begriff werden zahlreiche Stoffe aus der Umwelt zusammengefasst, die im Organismus estrogen-ähnliche Aktivitäten zeigen.

Versuche, die den Einfluss von Estrogen zum Fokus haben, achten daher auf möglichst estrogenfreie Reagenzien und Medien bei den Analysen. Darüber hinaus erhalten die Tiere eine speziell phytoestrogenarme Nahrung. Herkömmliches Futter ist sojähaltig und somit reich an Phytoestrogenen. Dadurch, dass in unserem Versuchsaufbau alle Tiere die gleiche Nahrung erhielten, sollte diese Variable theoretisch keinen spezifischen Einfluss haben. Die Wirkung von estrogen-ähnlichen Substanzen in einem *in vivo* Modell sind jedoch weit unberechenbarer als in einem standardisierten *in vitro* System. Es ist denkbar, dass Xenoestrogene von Tieren, die initial hormonepriviert sind, anders verwertet werden, sich zum Beispiel vermehrt im Fettgewebe anreichern. Da Xenoestrogene häufig auch längere Halbwertszeiten aufweisen [75], wäre es denkbar, dass so insgesamt Unterschiede, die durch eine Estrogendeprivation ausgelöst werden könnten, aufgehoben wurden.

Hinsichtlich der gonadektomierten Tiere gilt außerdem zu beachten, dass eine Gonadektomie zwar einerseits zu einer Hormondeprivation von gonadal sezerniertem Estrogen und Testosteron führt, andererseits wiederum Auswirkungen auf die HPG-Achse (Abb. 4) und die hormonelle Homöostase im Organismus hat. Zum Beispiel wird GnRH durch den Wegfall des negativen Feedbacks vermehrt aus dem Hypothalamus freigesetzt. Rezeptoren für dieses Hormon finden sich nicht ausschließlich in der Hypophyse, sondern auch auf zahlreichen primären Lymphorganen und peripheren Immunzellen [76-79]. Eine Bindung an B- und T-Lymphozyten führt zu Proliferation. In einem Mausmodell hat die Zufuhr von GnRH über 7 Wochen ein Anstieg des Gesamt-IgGs und eine Zunahme an T<sub>H</sub>2-Zellen provoziert [80].

Wie sehr sich diese Störung der HPG-Achse auf die gemessenen Immunglobulinkonzentrationen auswirkt, lässt sich rückwirkend nicht sagen. Zu untersuchen wäre dies in anschließenden Versuchen zum Beispiel durch Messung der GnRH-Werte oder mit pharmakologischen Modulatoren, wie GnRH-Antagonisten.

Wenn auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Immunglobulinkonzentrationen auftraten, so zeigte sich doch in der Anzahl der Leukozyten in der Milz durch die Gonadektomie eine Änderung. Gonadektomierte Weibchen zeigten eine signifikant niedrigere Zellzahl.

Riffo-Vasquez *et al.* [74] analysieren in einem Asthma-Modells mit BALB/c-Mäusen den Einfluss der Ovariectomie auf die Proliferationsrate der Milzzellen. Sie zeigen auf, dass die Proliferationsrate der Zellen bei den Tieren, die vor der Sensibilisierung auf OVA ovariectomiert wurden, signifikant abnimmt. Das legt die Überlegung nahe, dass die von uns gezeigten Zellzahlen bei der Gruppe der ovariectomierten Weibchen das Ergebnis einer solchen abnehmenden Proliferationsrate sein könnten.

Der protektive Charakter von Estrogen auf die B-Zell-Population wurde bereits erwähnt (Kap. 5.1). Durch die Gonadektomie könnte er an Bedeutung verloren haben. Die Zellzahl der ovariectomierten Weibchen war signifikant niedriger und näherte sich den Werten der Männchen an. Der Einfluss der Orchiectomie führte hingegen zu keinen signifikanten Änderungen in der Anzahl der Leukozyten der Milz im Vergleich zu den intakten Männchen.

Für die B-Zell-Population ist an dieser Stelle interessant zu wiederholen, dass B-Zellen aller Entwicklungsstufen zwar Estrogenrezeptoren aufweisen [27], Androgenrezeptoren bisher hingegen nur auf Vorläufer-B-Zellen in Knochenmark und Thymus nachweisbar sind. Das heißt, Testosteron kann rezeptorvermittelt seine suppressive Wirkung nur auf eine wesentlich kleinere Subpopulation ausüben.

Eine Studie von Erlandsson *et al.* [36] zeigt mittels ER-*knock-out*-Mäusen, dass bei exogener Zufuhr von E2 bei Männchen ER $\alpha$ -vermittelt das Milzgewicht zwar abnimmt, die Anzahl der Leukozyten in der Milz aber unverändert bleibt. Weder die Ausschaltung der rezeptorvermittelten Wirkung von Estrogenen noch die Gonadektomie mit Testosterondeprivation führen demnach bei Männchen zu einem Unterschied der Zellzahl.

Bei diesen komplexen Zusammenhängen ist der Blick auf die T-Zell-Antwort, die Zytokinkonzentrationen in den Milzzellkulturen der gonadektomierten Tiere, besonders interessant.

Auffällig ist, dass insgesamt bei Interleukinen der  $T_H2$  dominierten Immunantwort die gonadektomierten Weibchen die geringsten und die intakten Weibchen die höchsten Konzentrationen aufwiesen. Von den Mittelwerten ausgegangen, lagen die Werte der ovariectomierten Tiere 7fach niedriger. Bei IL-10 handelte es sich sogar um eine 10fache Abnahme. Statistisch gesehen ergab sich allerdings kein eindeutiger Trend. Im Nachhinein musste ein ovariectomiertes Weibchen als *non-responder* aus der Wertung genommen werden. Da die n-Zahl bei der Gruppe der ovariectomierten Weibchen damit unter 5 fiel, sind statistische Berechnungen und p-Wert-Angaben insgesamt sehr kritisch zu sehen.

Gerade bei der Betrachtung der Übersichtsdarstellung (Abb. 23) scheint die Vermutung allerdings nahe zu liegen, dass mit einer geringfügig größeren n-Zahl, die Unterschiede zwischen Weibchen und ovariectomierten Weibchen Signifikanzniveau erreichen würden.

Bei IL-5, einem Zytokin, das die IL-4 abhängige IgE-Produktion in humanen B-Zellen stimuliert [81] und für die Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten essentiell ist, kann ebenfalls nicht von einem rechnerisch auffälligen Trend gesprochen werden.

Riffo-Vasquez *et al.* [74] haben kürzlich gezeigt, dass IL-5 in den Überständen der Milzzellkultur bei ovariectomierten Weibchen signifikant niedriger ist als bei den intakten Weibchen. Es ist daher möglich, dass auch bei uns mit einer entsprechen höheren n-Zahl Signifikanzniveau erreicht hätte werden können. Allerdings stellen Riffo-Vasquez *et al.* [74] fest, dass die Konzentrationen von IL-4 und IL-10 in diesem Asthma-Mausmodell unbeeinflusst bleiben, was gegen den von uns für IL-4 gezeigten Trend sprechen würde. Dass  $T_H2$ -Zytokinantworten insgesamt durch Estrogene gefördert werden, zeigen zahlreiche andere Studien [22, 82, 83].

Auf den geschlechtsspezifischen Unterschied wurde unter Kapitel 5.2. eingegangen. Zwischen orchektomierten Männchen und nicht-operierten Männchen ergaben sich bei den Zytokinkonzentrationen keine Unterschiede.

IFN $\gamma$  zeigte sich bei der ovariectomierten Gruppe nach dem Mittelwert orientiert um 15fach reduziert gegenüber den intakten Weibchen. Bei großer interindividueller Varianz ließ sich jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied angeben.

IL-2 wird von T<sub>H</sub>1-Zellen und einigen CD8<sup>+</sup>-Zellen produziert, ist ursprünglich als T-Zellwachstumsfaktor bekannt, stimuliert aber ebenfalls das Wachstum der B-Zellen und greift in die Regulation der Antikörperproduktion ein. In Gegenwart von IL-2 wird von einer Hemmung der IgE-Produktion in anti-CD40/IL-4-stimulierten B-Zellen berichtet [84]. Nach allergen-spezifischer Stimulation ergab sich für IL-2 ein uneinheitliches Bild bei der Zytokinmessung. Die Gruppen unterschieden sich nicht.

Es gibt Ergebnisse, die zeigen, dass Testosteron seine suppressive Wirkung auf die T<sub>H</sub>2-Antwort vor allem über eine erhöhte IL-2-Sekretion vermittelt [66]. Dass dies in unseren Messungen nicht deutlich wurde, kann wiederum an der späten gonadalen Testosteronsekretion bei der Vergleichsgruppe liegen.

Im Widerspruch dazu zeigte sich jedoch, dass sich bei der PMA/IONO-Stimulation, die unspezifisch die Zellen zur maximalen Sekretion stimuliert, die orchektomierten Männchen signifikant höhere Konzentrationen aufwiesen als die nicht-operierten Tiere. Umgekehrt zeigten Weibchen gegenüber den gonadektomierten Weibchen signifikant höhere Konzentrationen.

In der Einleitung wurde angedeutet, dass mit der Entdeckung von neuen T-Zell-Subsets wie den T<sub>H</sub>17-Zellen das Paradigma der T<sub>H</sub>1- T<sub>H</sub>2-Balance als Grundlage molekularer Mechanismen der Immunantwort [85] zunehmend revidiert beziehungsweise ergänzt werden muss. Widersprüchliche Datenlagen, sowie die Tatsache, dass zum Beispiel eine IFN $\gamma$ -Defizienz bei Autoimmunerkrankungen, die als T<sub>H</sub>1-vermittelt gelten, statt zu einem deutlich abgeschwächten Krankheitsverlauf zu einer Exazerbation geführt hatten, ließen mehr und mehr an dem Schema zweifeln [86, 87]. Es hat sich nach und nach gezeigt, dass IL-17 als namensgebendes Hauptzytokin der T<sub>H</sub>17-Zellen, auch bei klassischen T<sub>H</sub>2-Erkrankungen eine pathogenetische Rolle spielt. IL-17mRNA ist erhöht nachweisbar in Lungengewebe, Sputum, BAL und Serum von Patienten, die an allergischem Asthma leiden [88]. Die IL-17-Konzentration im Sputum korreliert mit dem Schweregrad der Atemwegshypersensitivität [89].

In Asthma-Mausmodellen mit T<sub>H</sub>2-getriggelter Immunantwort zeichnet sich mittels *knock-out*-Mäusen ab, dass IL-17 während der Sensibilisierungsphase die allergen-

spezifische T-Zell-Antwort maßgeblich bahnt und aktiviert. Die intraperitoneale Injektion von OVA/Alum führt in den Milzzellen zu einer Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen [90].

Unsere Ergebnisse bestätigen vorliegende Daten insofern, als dass in unserem Modell einer systemisch provozierten allergischen Reaktion auf OVA, Milzzellen in der Kultur nach einer allergen-spezifischen Inkubation mit der um rund 300fach gesteigerten Sekretion von IL-17 reagierten. Nach unseren Kenntnissen wurden bisher keine Daten zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in Bezug auf IL-17 gezeigt. Wir konnten zeigen, dass in den Überständen der Milzzellkulturen ovariectomierter Weibchen signifikant weniger IL-17 messbar war als bei intakten Weibchen. Weder zwischen Weibchen und Männchen, noch zwischen Männchen und orchektomierten Männchen lag ein signifikanter Unterschied vor.

Zwischen der von Riffo-Vasquez *et al.* [74] beschriebenen dualen Wirkweise von Estrogen auf die allergische Immunantwort und der bisher für IL-17 gezeigten Wirkung ergibt sich eine interessante Parallellität. IL-17 hemmt ebenso wie Estrogen während der Provokation, der Effektorphase der Allergie, die lokale Immunantwort, zum Beispiel das Lungeninfiltrat von Eosinophilen im Asthma-Modell. Umgekehrt stimulieren sowohl IL-17 also auch Estrogen während der Sensibilisierungsphase die systemische Immunantwort, vor allem auf dem Niveau der Zytokine. Da sich allergisches Asthma bei Frauen in der Symptomatik progredienter zeigt [13] und gleichzeitig vermutet wird, IL-17 könnte einen neuen Marker der Krankheitsprogression darstellen [24], wirft sich insgesamt die Frage auf, ob es eine mögliche Korrelation von Estrogenkonzentration und IL-17 gibt. Unsere Zytokinmessungen könnten erste Hinweise dafür liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei nicht-operierten 10-Wochen-alten Weibchen die T-Zell-Antwort insgesamt am ausgeprägtesten zeigte. Bei IL-4 als wichtigem Zytokin der T<sub>H</sub>2-Antwort zeigte sich ein deutlicher Trend im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen der ovariectomierten Weibchen. Bei IL-17 war dieser Unterschied signifikant.

Zwischen orchektomierten und nicht-operierten Männchen zeigten sich im Zytokinprofil keine Unterschiede. Der Einfluss der Ovariectomie auf die T-Zell-Antwort scheint wesentlich stärker als der Einfluss der Orchektomie.

Dass diese T-Zell-Antwort bei Weibchen bei der humoralen Immunantwort nicht zu Unterschieden führte, ist größtenteils bereits diskutiert. Angeführt sei an dieser Stelle

noch, dass die bei der Milzzellkultur eingesetzten Reagenzien nicht speziell frei von Xenoestrogenen waren. Neben Steroiden könnten auch Phenole auf die Zellen einwirken und die Ergebnisse beeinflussen [91, 92]. Weder das von uns eingesetzte FCS, noch unser Medium waren frei von diesen Substanzen. Da es sich jedoch um ein geschlossenes *in vitro* System handelt, wurden alle Zellen gleichermaßen beeinflusst und die Variable in ihrem Einfluss damit vernachlässigbar. Dies steht im Gegensatz zu den multiplen Interaktionen, die zuvor angedeutet bei *in vivo* Systemen auftreten könnten. Die gemessenen gruppenspezifischen Unterschiede sind somit mit größter Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Einwirkung des Mediums entstanden.

Für uns unerwartet war das Ergebnis der Estradiolmessungen. Gonadektomierte Tiere wiesen tendenziell höhere Serumkonzentrationen auf als die intakten Tiere. Signifikanzniveau erreichte der Unterschied zwischen ovariectomierten Weibchen und nicht operierten Weibchen nicht. Wie bereits zuvor erwähnt, könnten die insgesamt auffällig niedrigen E2-Konzentrationen auch auf methodische Fehler zurückzuführen sein. In der Literatur liegen die Estradiolwerte abhängig von der Zyklusphase der Maus im Serum zwischen 50 und 100 pg/ml [93-95]. Die höchsten Werte werden dabei im Estrus gemessen. Es gibt allerdings auch stark schwankende Angaben. Bei BALB/c-Weibchen vergleichbaren Alters wurden einmal sogar Serumestradiolkonzentrationen in der Höhe von rund 500 pg/ml [74] gemessen. Dem entgegen stehen Messungen, die von 12 pg/ml ausgehen [61].

Die E2-Konzentrationen lagen bei den intakten Weibchen bei uns mit 7 pg/ml deutlich unter dem überwiegenden Anteil der bisher gemessenen Werte. Selbst wenn wie zuvor argumentiert die gonadale Estrogensynthese erst im Versuchsverlauf eingesetzt hätte, müssten zum Zeitpunkt der Analysen im Alter von 10 Wochen maximale Estradiolkonzentrationen erreicht worden sein. Es kann demnach ein methodischer Fehler des RIA nicht ausgeschlossen werden.

Daneben gibt es Studien, die zeigen, dass Xenoestrogene, vor allem sogenannte Phytoestrogene wie Isoflavone, beim Menschen zu einem Anstieg der Serumkonzentration von Sexualhormonbindenden Globulin (SHBG) führen [96]. Die Futterpellets der Mäuse waren reich an Soja, was zu einem Großteil aus Isoflavonen besteht. Ein Anstieg von SHBG würde zu einer Abnahme der Konzentration an freiem Estradiol führen und die insgesamt im RIA messbaren Estradiolkonzentrationen würden geringer ausfallen. Ob die bisherigen Daten jedoch auf das Mausmodell übertragbar

sind und bei einer vergleichsweise kurzen Verlaufsphase entscheidend auf die Serumestradiolkonzentrationen einwirken könnten, bleibt ungeklärt.

Während bei uns die Konzentrationen der ovariectomierten Weibchen nicht von der Gruppe der intakten Tiere abwichen, lagen Serumkonzentrationen von gonadectomierten Tieren in den bisherigen Veröffentlichungen je nach Angaben meist deutlich unterhalb des Detektionslimits [74]. Diese Messungen erfolgten jedoch 9 Tage nach Ovariectomie. Dies könnte insofern von Bedeutung sein, als dass nach unserem Protokoll die Messung deutlich später lag. 42 Tage nach Operation wurden die Seren zur RIA-Analyse gewonnen. Dies ist eine Zeitspanne, in der verschiedene andere Faktoren dazu beigetragen haben könnten, die Serumestradiolkonzentrationen bei den gonadectomierten Tieren ansteigen zu lassen. So ist es möglich, dass im Rahmen der angebotenen chirurgischen Dienstleistung die Gonaden nicht vollständig entfernt wurden. Bei initialer Hormondeprivation wäre die negative Rückkopplung vermindert, die GnRH-Ausschüttung erhöht und somit Restgewebe verstärkt zur Sezernierung von Sexualhormonen stimuliert.

Um dies ausschließen zu können, müssten Estradiolmessungen vor und kurz nach der Gonadectomie vorgenommen werden.

In der Studie, die bei adulten Weibchen Werte um 12 pg/ml angeben, liegen die Konzentrationen der ovariectomierten Tiere um 6 pg/ml [61] und damit auf dem Niveau unserer Messungen.

Die gonadectomierten Männchen zeigten höhere Estradiolkonzentrationen als die intakten Männchen. Mit 12 pg/ml lagen sie insgesamt am höchsten.

Beim Menschen existiert eine extragonadale oder auch extraglanduläre Estrogensynthese. Aus den Nebennierenrinden werden Vorläufersteroiden wie DHEA freigesetzt, die unter anderem in Fettgewebe, Muskeln und Leber mit Hilfe der Aromatase (Abb. 5) zu Estrogenen umgewandelt und in den Blutkreislauf sezerniert werden. Eine Synthese von Estrogenen in peripherem Gewebe der Mäuse ist zwar beschrieben, doch ihnen wird vor allem auto- und parakrine Funktion zugesprochen, eine Sekretion in die Blutbahn mit Beeinflussung des Serumspiegels ist nicht gezeigt worden [97, 98]. Die von uns gezeigten Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass doch eine Sekretion stattfindet. Estradiolmessungen bei Ratten zeigen bei RIA-Messungen, die in Abständen von Monaten wiederholt worden sind, dass bei orchectomierten Ratten die Serumkonzentration von Estradiol im Laufe der Zeit

zunimmt, was ebenfalls für die Möglichkeit einer peripheren extragonadalen Synthese und Sekretion auch bei niederen Säugetieren spricht [99].

#### **5.4 Einfluss des Stammes auf die systemische allergische Immunantwort bei C57BL/6-Mäusen**

Im C57BL/6-Stamm ließ sich mit dem von uns gewählten Sensibilisierungsprotokoll bei den 10-Wochen-alten Mäusen keine messbare allergen-spezifische IgE-Antwort auslösen. OVA-IgE war nicht detektierbar. Bei den 17-Wochen-alten Mäusen zeigte von 6 Weibchen ein Tier und von den 6 Männchen zeigten 2 Tiere messbare OVA-IgE Konzentrationen. Insgesamt allerdings lagen selbst diese Werte im unteren Messbereich. Bei der Messung von Gesamt-IgE fiel auf, dass die Konzentrationen im Vergleich zum BALB/c-Stamm rund 40fach geringer ausfielen.

Es lässt sich sagen, dass sich mit unseren Ergebnissen der C57BL/6-Stamm als *intermediate-responder* bestätigte – mit nicht detektierbarem OVA-IgE im Serum, aber einer deutlichen lokalen Hautreaktion auf die Provokation mit dem Allergen [47].

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Änderungen am Protokoll die Detektion von OVA-IgE im Serum der Tiere verbessern könnten. Andere Arbeitsgruppen zeigen mit anderen Sensibilisierungsprotokollen und abgeänderten Protokollen im C57BL/6-Stamm OVA-IgE. Da es für OVA-IgE jedoch keinen etablierten Standard gibt und sich von Labor zu Labor unterscheidet, bleibt ein Vergleich insgesamt unmöglich.

Bei den Milzzellen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den 10-Wochen-alten Weibchen. BALB/c-Weibchen zeigten eine signifikant höhere Anzahl an Leukozyten pro Milz als die gleichaltrigen C57BL/6-Weibchen.

Ein Vergleich dieser Art findet sich in der Literatur bisher nicht. Es stellt sich die Frage, ob diese Tatsache die insgesamt geringer ausfallende systemische allergische Immunantwort mitbegründet. Dem widerspricht allerdings, dass bei den Männchen keine stammspezifischen Unterschiede in der Zellzahl auftraten. Das heißt, C57BL/6-Männchen müssten ebenso hohe Gesamt-IgE- und OVA-spezifische-IgE-Konzentrationen aufzeigen.

Die Zellzahl alleine ist nicht aussagekräftig genug, um solche Rückschlüsse zuzulassen. Interessant wäre auch an dieser Stelle eine Zelltypisierung, die vielleicht

Hinweise bieten könnte, ob das B-Zell-Kompartiment zwischen den Stämmen nach Sensibilisierung unterschiedlich ist.

Der signifikante Unterschied zwischen den Weibchen der beiden Stämme lässt eher eine andere Vermutung zu. In einem anderen Zusammenhang weisen Spearow *et al.* [100] darauf hin, dass verschiedene Mausstämme gegenüber E2 eine unterschiedliche Empfindlichkeit zeigen. Zwar wurde durch diese Arbeitsgruppe der Einfluss von exogenem E2 auf die Gonaden männlicher Mäuse untersucht, doch ist es durchaus denkbar, dass auch andere Zielgewebe bei verschiedenen Mausstämmen unterschiedlich sensibel auf Sexualhormone reagieren. Konkret könnte dies für unsere Ergebnisse heißen, dass die hohe Zellzahl bei BALB/c-Weibchen vor allem durch ein starkes Ansprechen auf die Stimulation von Estrogen zu begründen ist. Für diese Hypothese sprechen auch die signifikant geringeren Zellzahlen bei ovariectomierten BALB/c-Weibchen und BALB/c-Männchen. Bei den C57BL/6-Mäusen ergab sich hingegen kein geschlechtsspezifischer Unterschied bei der Anzahl der Leukozyten pro Milz.

### **5.5 Einfluss von Geschlecht und Alter auf die systemische allergische Immunantwort bei C57BL/6 Mäusen**

Weder bei Gesamt-IgE noch bei OVA-IgG<sub>1</sub> zeigten sich geschlechts- oder altersspezifische Unterschiede. Wie in Kapitel 5.4 angedeutet, zeigte auch die Anzahl der Leukozyten keine signifikanten geschlechts- und altersspezifischen Unterschiede.

Es wäre in diesem Zusammenhang sehr interessant zu analysieren, ob das Immunsystem beim C57BL/6-Stamm insgesamt weniger sensibel auf Estrogen reagiert. So böte sich etwa in weiterführenden Versuchen eine Vergleichsreihe mit einem anderen Allergen an. Wie unter Kapitel 1.4.2 erwähnt, hat sich der C57BL/6-Stamm als *high-responder* auf die Hausstaubmilbe gezeigt [47]. Es könnte beispielhaft untersucht werden, ob bei adulten C57BL/6-Weibchen bei insgesamt höheren spezifischen Immunglobulinkonzentrationen weiterhin kein Unterschied zu den Männchen vorliegt. Es bleibt ungeklärt, inwiefern der genetische Hintergrund einerseits und unterschiedliche Empfindlichkeit auf Sexualhormone andererseits die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der allergischen Immunantwort verursachen.

## 5.6 Einfluss von Geschlecht und Alter auf die lokale allergische Immunantwort bei C57BL/6 Mäusen

Wie bereits erwähnt, wurden Mäuse des C57BL/6-Stammes in einem Asthma-Modell als *intermediate-responder* auf OVA eingeordnet, da sie trotz einer geringen Serumkonzentration von allergen-spezifischen Immunglobulinen eine deutliche Hautreaktion auf die intrakutane OVA-Provokation zeigen [47]. Die Auswertung erfolgte in bisherigen Allergiemodellen jedoch meist anhand der Quaddelbildung und/oder dem Ausmaß der Extravasation des zuvor intravenös injizierten blauen Farbstoffs Evan's Blue [55, 56] auf der Bauchhaut. Im C57BL/6-Stamm ist nach unseren Kenntnissen bisher das *ear-swelling* als Sonderform der ICHS auf OVA als Allergen nicht etabliert. Trotzdem wählten wir dieses Verfahren, unter anderem um durch den sonst systemisch zu injizierenden blauen Farbstoff keine Interferenzen bei den geplanten Serumanalysen und Milzzellkulturen zu riskieren. Selbst wenn das *ear-swelling* bisher im BALB/c-Stamm eingesetzt wurde, galt das Augenmerk nie geschlechtsspezifischen Unterschieden der biologischen Aktivität von OVA-IgE.

Die lokale Provokation auf OVA mittels *ear-swelling* ließ sich nach unserem Protokoll sowohl bei den 10-Wochen-alten als auch bei den 17-Wochen-alten Mäusen auslösen. Bei der Auswertung der lokalen Reaktion auf das Allergen, zeigte sich insgesamt eine deutlichere Schwellung bei den älteren Mäusen. Nach der Applikation von 100 µg OVA war bei den älteren Mäusen mit einem zweiten Peak nach 4 Stunden die Schwellung signifikant stärker ausgeprägt als bei den jüngeren Tieren.

Im C57BL/6-Stamm konnte somit auf OVA eine IPR und eine LPR gezeigt werden. Mit unseren Protokollen ließ sich OVA-IgE zwar systemisch nicht nachweisen, die biologische Aktivität einer antigen-vermittelten Reaktion auf Hautniveau war jedoch deutlich messbar.

Die Histologie zeigte exemplarisch, dass es zu einem deutlichen Influx von Zellen im Bereich der Haut oberhalb des Ohrknorpels, der Stelle der OVA-Applikation kam. Das zelluläre Infiltrat und das zelluläre Ödem waren im Vergleich zum Kontrollohr, in das PBS injiziert wurde, sehr ausgeprägt. Eine Zelltypisierung und -zählung könnte in weiteren Schritten hilfreich sein, um geschlechtsspezifische Unterschiede der lokalen Hautreaktion genauer zu analysieren.

### **5.7 Schwierigkeiten des Mausmodells**

Gerade bei einem vielfältigen Zusammenspiel von endogenen und exogenen Faktoren wie im Falle einer allergischen Reaktion bieten Tiermodelle eine wichtige Voraussetzung zur detaillierteren Analyse der Pathogenese. Beim Vergleich der Genome von Maus und Mensch konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell für jedes Gen des Menschen ein entsprechendes Gen bei der Maus gibt [101]. Aber dennoch ist die Übertragbarkeit auf den Menschen nicht uneingeschränkt gegeben.

Es bleibt zu beachten, dass im Mausmodell die humorale und lokale Immunreaktion in der Entwicklung und Ausprägung stark durch die Art der Allergenexposition beeinflusst wird. Gerade aber die Route, die intraperitoneale Injektion des Allergens, stimmt nicht mit der Sensibilisierung beim Menschen überein. Beim Menschen erfolgt der wiederholte Kontakt mit kleinen Allergendosen zum Beispiel über Inhalation oder die Nahrungsaufnahme.

Daneben liegen verhältnismäßig wenige Informationen zur Endokrinologie der Maus vor, was Rückschlüsse vor allem auch bei einem insgesamt kürzeren Lebens- und Hormonzyklus der Maus auf den Menschen oder umgekehrt erschwert [35].

Relevant für unsere Analysen zeigte sich dies unter anderem in den Grenzen der Durchführbarkeit einer vergleichenden Studie mit immunisierten prä-pubertären Mäusen, da der Eintritt der Geschlechtsreife während oder vor Beendigung der Sensibilisierungsphase liegt.

Weitere Datenerhebungen und Experimente in murinen Modellen sind notwendig für eine Klärung der Wechselwirkungen zwischen dem endokrinen System und der allergischen Immunantwort. Ebenso sind weitere Untersuchungen in humanen Modellen erforderlich, um die klinische Relevanz der erhobenen Befunde zu überprüfen.

### **5.8 Weiterführende Ausblicke**

Vor allem für die Klärung der zugrunde liegenden, molekularen Mechanismen, die zu geschlechts-, alters- oder stammspezifischen Unterschieden in der systemischen und lokalen allergischen Immunantwort führen, werden weiterführende Experimente erforderlich sein.

Die Analyse der Zytokinprofile der Milzzellkulturen konnte in dieser Studie nur bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen durchgeführt werden. Entsprechend aufschlussreich könnte ein Vergleich mit Zytokindaten aus der adulten BALB/c-Gruppe, sowie den Mausgruppen des C57BL/6-Stammes sein. Ebenso bleibt zu klären, ob eine

entsprechend anzustrebende höhere n-Zahl bei der 10-Wochen-alten Gruppe die deutlichen Tendenzen in signifikante Unterschiede zwischen intakten und gonadektomierten Tieren überführen würde.

Aufgrund der erforderlichen Materialmenge wird es methodisch weiterhin schwierig bleiben, Immunglobuline und Hormonkonzentrationen im Versuchsverlauf an mehreren Zeitpunkten zu messen. In diesem Rahmen hilfreich wären neben der Messung von Estradiol auch die Erfassung von Testosteron und gegebenenfalls GnRH, beziehungsweise der Einsatz von Rezeptorantagonisten. Letzteres wäre vor allem auch ein Ansatz im Hinblick auf die lokale Wirkung von Hormonen. Wie erwähnt stellt die gewebsspezifische Wirkung, Synthese und Verstoffwechslung von Hormonen diesbezüglich eine besondere Herausforderung dar.

Ein anderer interessanter Ansatz für weiterführende Studien ist der beobachtete signifikante Unterschied von IL-17 mit höheren Konzentrationen bei nicht-operierten gegenüber ovariectomierten Weibchen. Sowohl für Estradiol als auch für IL-17 wurde eine duale Wirkweise beobachtet, eine Stimulation in der Sensibilisierungsphase auf der Ebene der systemischen Immunantwort und eine Hemmung während der Effektorphase bei der lokalen allergischen Immunreaktion [74, 90].

Spannend ist dies auch vor den beobachteten Ergebnissen, dass bei adulten BALB/c-Weibchen die Serumkonzentrationen der Immunglobuline überwog, während adulte C57BL/6-Männchen bei der lokalen kutanen Provokation eine ausgeprägtere Ohrschwellung zeigten. Die explorative histologische Untersuchung könnte in weiteren Schritten mittels Zelltypisierung und -zählung Hinweise liefern für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Hautreaktion. Unseres Wissens nach führten wir erstmals die Ohrschwellung auf OVA als Allergen im C57BL/6-Stamm durch. Entsprechende Vergleichsdaten im BALB/c-Stamm in Hinblick auf geschlechts- und altersspezifische Unterschiede sind ausstehend.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse vielversprechende, neue Perspektiven bieten für weiterführende Studien. Eingehenderes Verständnis der Pathologie und Einflussgrößen wird bei multifaktoriellen Erkrankungen wie den Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis zunehmend eine individuell abgestimmte und angepasste Prävention und Therapie ermöglichen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Analyse der stark ansteigenden Prävalenz atopischer Erkrankungen in den westlichen Industrienationen ist zunehmend aufgefallen, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung dieser Erkrankungen hat [5, 7]. So zeigt sich, dass Jungen bis zur Pubertät häufiger von allergischem Asthma betroffen sind. Bei den seltener erkrankten Mädchen ist die Prognose jedoch bei überwiegend persistierender und progredienter Symptomatik schlechter [11, 13]. Die Pubertät als Wendepunkt in der Inzidenz allergischer Erkrankungen und gleichzeitig als Periode intensivster, hormoneller Veränderungen legt die Überlegung nahe, dass die Geschlechtshormone pathogenetisch bedeutsam sein könnten.

Mit der vorliegenden Arbeit analysierten wir initial die geschlechts- und altersspezifischen Unterschiede der systemischen allergischen Immunantwort im Mausmodell. Während bei 10-Wochen-alten BALB/c-Mäusen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachweisbar waren, dominierten bei den adulten Tieren die Immunglobulinkonzentrationen der Weibchen. Bei der Messung der Estradiolkonzentrationen konnten bei 10-Wochen-alten Weibchen und Männchen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern aufgezeigt werden.

Zur differenzierteren Analyse des Einflusses der Sexualhormone Estrogen und Testosteron erfolgte eine prä-pubertäre Gonadektomie. Die Serumkonzentrationen der Immunglobuline der nicht-operierten wichen nicht von den gonadektomierten Mäusen ab. Im Gegensatz dazu deuteten sich im Zytokinmilieu Unterschiede an. Im Zytokinprofil der Milzzellkulturen lagen Interleukine wie IL-4 und IL-10, die die IgE-Antwort begünstigen, in ihren Konzentrationen bei Weibchen höher als bei Männchen, wobei kein Signifikanzniveau erreicht wurde. Insgesamt wiesen gonadektomierte Weibchen die geringsten und die intakten Weibchen die höchsten Konzentrationen auf. Ein Signifikanzniveau wurde diesbezüglich bei IL-17 erreicht.

Im Vergleich mit dem C57BL/6-Stamm fiel auf, dass allergen-spezifisches IgE beim C57BL/6-Stamm nicht nachweisbar war, die Gesamt-IgE-Konzentrationen insgesamt signifikant niedriger ausfielen und sich weder geschlechts- noch altersspezifische Unterschiede abzeichneten. Bei der lokalen allergen-spezifischen Provokation zeigte sich eine deutliche kutane Reaktion, messbar als Ohrschwellung, die histologisch als

interzelluläres Ödem mit deutlichem, zellulärem Infiltrat imponierte. Bei den adulten Männchen zeigte sich nach 4 Stunden eine signifikant stärker ausgeprägte Schwellung als bei den gleichaltrigen Weibchen. Insgesamt war die Schwellung bei den adulten Mäusen signifikant ausgeprägter als bei der jüngeren Vergleichsgruppe.

Diese Ergebnisse bestätigten den BALB/c-Stamm als *high-responder* auf OVA [47, 52] und die bisher in Asthma-Modellen gezeigten geschlechtsspezifischen Unterschiede mit einer signifikant ausgeprägteren humoralen allergischen Immunantwort der adulten Weibchen [50, 51]. Weiterhin wurde zusätzlich ein Einfluss des Alters aufgezeigt. Inwiefern die relativ einheitliche Serumkonzentrationen von E2 für die Angleichung der Unterschiede bei der humoralen Immunantwort der jüngeren Mausgruppe ursächlich war, bleibt an dieser Stelle offen. Ebenso bleibt offen, ob die bei den adulten Mäusen gezeigten Unterschiede eher durch den begünstigenden Einfluss von Estrogen oder die supprimierende Wirkung von Testosteron verursacht wurde.

Bei der Betrachtung des Zytokinprofils der Milzzellkulturen der 10-Wochen-alten Mäuse fiel auf, dass Zytokine der  $T_H2$ -Antwort bei nicht-operierten Weibchen die höchsten Konzentrationen zeigten. Der Einfluss der Ovariectomie war auf die T-Zell-Antwort insgesamt stärker als der Einfluss der Orchiectomie. Wir bestätigten neuere Daten zu IL-17, die IL-17 im Rahmen der klassischen  $T_H2$ -Erkrankungen zunehmend als bedeutsam sehen [88, 90], da wir eine stark gesteigerte IL-17-Sekretion in Milzzellkulturen nach allergen-spezifischer Inkubation nachwiesen. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit höheren Konzentrationen bei nicht-operierten gegenüber ovariectomierten Weibchen. Unserer Kenntnis nach liegen bisher keine geschlechtsspezifischen Analysen vor. Unsere Daten könnten somit ein erster Hinweis für einen Zusammenhang der gonadalen Estrogensynthese und der IL-17-Konzentration sein.

Für den C57BL/6-Stamm ließ sich die Einstufung als *low-* beziehungsweise *intermediate-responder* bestätigen [47, 52], da sich allergen-spezifisches IgE nicht nachweisen ließ, die Gesamt-IgE-Konzentrationen signifikant niedriger ausfielen, aber eine lokale kutane allergen-spezifische Immunantwort provozierbar war. Auffällig bleibt, dass sich bei der humoralen Immunantwort des C57BL/6-Stamms weder geschlechts- noch altersspezifische Unterschiede zeigten, während bei der kutanen Provokation die älteren Tiere eine ausgeprägtere Reaktion zeigten und die Ohrschwellung der 17-Wochen-alten Männchen stärker war als die der Weibchen.

## A ANHANG

### A.1 Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumhydrochlorid
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AR	Androgenrezeptor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , Protein bei der Regulation der Apoptose
Bio	Biotin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DHT	Dihydrotestosteron
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
E2	17 $\beta$ -Estradiol
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked-immunospot-assay</i>
EOS	Eosinophiler Granulozyt
ER	Estrogen Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
Fc $\epsilon$ -RI	Fc $\epsilon$ -Rezeptor I
Fc $\epsilon$ -RII	Fc $\epsilon$ -Rezeptor II
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
HPG	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden
i.c.	intrakutan
i.p.	intraperitoneal
ICHS	<i>immediate cutaneous hypersensitivity</i> , aktive kutane Hypersensibilität

- ANHANG -

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IONO	Ionomycin
IPR	<i>immediate phase reaction</i> , akute Phase der allergischen Reaktion
LH	Luteinisierendes Hormon
LPR	<i>late phase reaction</i> , späte Phase der allergischen Reaktion
LU	<i>labor units</i>
m	Männchen
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose
MZ	Mastzelle
mx	orchektomierte Männchen
NaCl	Natriumchlorid
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid
PBST	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid + Tween
PMA	Phorbol 12-Myristal 13-Acetat
RIA	<i>radio-immunosorbent-assay</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SA-HRP	Streptavidin- <i>Horseradish Peroxidase</i>
SD	Standardabweichung
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>H</sub>	T Helfer
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
w	Weibchen
Wo	Wochen
wx	ovarektomierte Weibchen

## A.2 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller
Autoklav		Melag
Brutschrank	HERA cell	Heraeus
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson
Feinwaage		Satorius
Frostbox		Nalgene
Kryostat	Shandon Cryotome FSE	Thermo scientific
Kühlschrank/Gefrierkombi		Janke und Kunkel, EUREKA
Messgerät, abgefedert	No. 2804F-10 <i>full jeweled, made in USA</i> , No. 7326	Mitutoyo
Mikroskop	Olympus CK30	Zeiss
Mikroskop F 40/0.65 + F 10/0.25		Zeiss
Mikrotiterplattenphotometer		DYNATEC
Mikrotiterplattenwaschgerät		Tecan
Mikrowelle		Siemens
Multistepper		Eppendorf
pH-Elektrode		neoLab
pH-Meter		PRÄCITRONIC
Pipetboy		Hirschmann Laborgeräte
Plattenzentrifuge	Laborfuge GL	Hirschmann Laborgeräte
Schüttler		IKA Labortechnik
Sterilbank	<i>flow bench</i> , HERA safe	Heraeus
Vortex		Heidolph Reax
Wärmeplatte	NuOVAII	Thermolyne
Wasserbad	Type 1008	GFL
Zellzählgerät	CASY 1, Modell TT	Schärfe Labortechnik
Zentrifugen	5417R, 5417C	Eppendorf
	Minifuge RF	Heraeus
	Multifuge 4KR	Heraeus

### A.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Größe	Hersteller
24-well-Tissue Kulturplatten		Becton Dickinson, Falcon
96-well-Mikrotiterplatten		NUNC
Biopsieschälchen, Tissue-Tek® 4565, <i>Specimen Molds</i>	10 mm x 10 mm x 5 mm	Sakura
Combitips	5, 10 ml	Eppendorf
Deckglas		Menzel-Gläser
Haematokrit-Kapillaren	75 mm/60 µl	Hirschmann Laborgeräte
Kanülen	0,3x13 mm	Becton Dickinson Microlance
Kanülen	0,45x25 mm	Braun
Latexhandschuhe		Ansell DermaClean
Objektträger		R. Langenbrinck
Petrischalen, steril	94/16 mm	Greiner
Pipetten, steril	5, 10, 25 ml	Becton Dickinson, Falcon
Pipettenspitzen		Sarstedt
Polypropylen-Röhrchen (FACS-Messung)		Sarstedt
Reaktionsgefäße, steril		Becton Dickinson, Falcon
Schnappdeckelverschlussreaktionsgefäße		Sarstedt, Eppendorf
Spritzen	1ml	Becton Dickinson Plastipak
Spritzenstempel	5 ml	Braun
Sterilfilter, steril		Sarstedt
Teesieb		
Transferpipette	5-50 µl	Finland-Labsystems
Transferpipetten	10-100 µl	Eppendorf
Zellfilter, Nylon, steril	40, 100 µm	Becton Dickinson, Falcon

### A.4 Software

Software	Hersteller
<i>Axio Vision LE Application 4.5.0.0</i>	Carl Zeiss <i>Imaging Solutions</i>
<i>Revelation Version G 3.2.</i>	Dynatech
SPSS 12.0G for windows	SPSS inc.
<i>Flow Cytomix Pro 2.1</i>	Bendermed Systems
Excel	Microsoft

## A.5 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien		Hersteller
Albumin	<i>from chicken egg white grade V</i>	Sigma
Alum, Imject		Pierce
BSA	bovines Serumalbumin, Fraction V	Serva
<i>Dulbecco's PBS, without Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup></i>		PAA Laboratories
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS), steril mit NaHCO<sub>3</sub>, ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></i>		PAA Laboratories GmbH
Eosin-Phloxin-Lösung		Dr. K. Hollborn&Söhne
Estradiol-Kit	DSL-4800	Beckman Coulter, Diagnostic Systems Laboratory, TX, USA
fetales Kälberserum (FCS)		Biochrom
<i>Flow Cytometry Based Fluorescent Bead Immunoassay</i>	BMS820FF <i>mouse</i> , T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2, 10plex	Bendermed Systems
Forene®	Isofluran, 1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyldifluoromethylether	Abott GmbH & Co.KG
Goat serum, normal		Dako
IONO, steril	Ca <sup>2+</sup> -Ionophor	CALBIOCHEM
Kaisers Glycerin Gelatine		Merck
Ketamin®	Ketaminhydrochlorid 50mg/ml	DeltaSelect
Milchpulver		Roth
Panthenol-Augensalbe®		
Papanicolaou's Lösung 1a Harris	Hämatoxylinlösung	Merck
PMA, steril	Phorbol-12-myristate-13-acetate	SIGMA
Rompun®	Xylazinhydrochlorid 2 %	Bayer
<i>Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP)</i>	Part No. 890803	R & D
TMB-Tablette	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid	Sigma

## A.6 Antikörper und sekundäre Reagenzien

Antikörper	Zusammensetzung	Hersteller
Anti-mouse IgE	Klon EM95.3; 3,6 mg/ml, 1:720	DRFZ
Anti-mouse IgE	Klon 84 1-C; 476 µg/ml	DRFZ
Anti-mouse IgE mAB	Klon R35-72; 0,5 mg/ml, 1:250	BD Pharm.
Anti-mouse IgE-Biotin	Klon EM 5.3; 582 mg/ml	DRFZ
Biotin-Conjugated Rat Anti-Mouse IgG <sub>1</sub> (Monoclonal Antibody IgG <sub>1</sub> -Biotin)	Klon A85-1	BD Pharmingen
Biotin-Conjugated Rat Anti-Mouse IgG <sub>2a</sub> (Monoclonal Antibody)	Klon R19-15	BD Pharmingen
Biotin-konjugiertes OVA	Kopplung 1:50	DRFZ
IgE-Biotin	Klon 84 1-C	DRFZ
Purified Mouse IgE, κ (anti-Trinitrophenol)	Monoclonal Immunglobulin Isotype Standard, Klon C38-2	BD Pharmingen

## A.7 Puffer und Lösungen

Puffer (Hersteller)	Zusammensetzung
10x PBS-Puffer	80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l H <sub>2</sub> O (pH 7,4)
1x PBST-Waschpuffer	100 ml 10x PBS + 900 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> + 500 µl Tween20
3 % Agarose (lowEEO, Sigma A 6013)	3 g Agarose in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
3 %; 1 % BSA/PBS	1,8 g; 0,6 g BSA in 60 ml 1x PBS
3 %; 1 % MP/PBS	1,8 g; 0,6 g Milchpulver in 60 ml 1x PBS
AMP- Puffer (AMP, Sigma A-9879)	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol + 800 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> + 150 mg MgCl <sub>2</sub> + 100 µl TritonX-405
Coating-Puffer pH 9	= 500 ml A + 50 ml B A = 4,2 g NaHCO <sub>3</sub> in 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> B = 5,3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Entwicklungspuffer	8 mg 5-Bromo-2-chloro-indolyl-phosphat (5-BCIP) + 8 ml AMP-Puffer + 2 ml 3 % Agarose
Ketamin/Rompun-Injektionsnarkose	3:1:6 in 0,9 % NaCl
Lysis-Puffer (eBioscience, 00-4333-57)	1x RBC-Lysis Buffer
Medium (Biochrom KG)	RPMI 1640-Medium, steril, ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> + FCS + Penicillin, Streptomycin
OVA-Stock 1 mg/ml	0,014 g in 14 ml 1x PBS
Substrat-Puffer pH 5,5	= 128,5 ml A + 121,5 ml B + 250 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> A = 17,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> B = 10,6 g Zitronensäure in 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
TMB-Substrat-Puffer (SIGMA T3405)	1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin + 4 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 10 ml Substrat-Puffer

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 721-32.
2. Siebenkotten, G., et al., *The murine IgG1/IgE class switch program*. Eur J Immunol, 1992. **22**(7): p. 1827-34.
3. Stavnezer, J., *Immunoglobulin class switching*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 199-205.
4. Renz, H., et al., *In-vitro-Allergiediagnostik*. 2002, <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/II-na/061-017.htm>.
5. Selnes, A., et al., *Diverging prevalence trends of atopic disorders in Norwegian children. Results from three cross-sectional studies*. Allergy, 2005. **60**(7): p. 894-9.
6. Siroux, V., et al., *Role of gender and hormone-related events on IgE, atopy, and eosinophils in the Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(3): p. 491-8.
7. Lee, J.H., et al., *Gender differences in IgE-mediated allergic asthma in the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study*. J Asthma, 2006. **43**(3): p. 179-84.
8. Schramm, B., et al., *Cost of illness of atopic asthma and seasonal allergic rhinitis in Germany: 1-yr retrospective study*. Eur Respir J, 2003. **21**(1): p. 116-22.
9. Rimpela, A.H., et al., *Asthma and allergic rhinitis among Finnish adolescents in 1977-1991*. Scand J Soc Med, 1995. **23**(1): p. 60-5.
10. Osman, M., *Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy*. Arch Dis Child, 2003. **88**(7): p. 587-90.
11. Almqvist, C., M. Worm, and B. Leynaert, *Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review*. Allergy, 2008. **63**(1): p. 47-57.
12. Becklake, M.R. and F. Kauffmann, *Gender differences in airway behaviour over the human life span*. Thorax, 1999. **54**(12): p. 1119-38.
13. Shames, R.S., *Gender differences in the development and function of the immune system*. J Adolesc Health, 2002. **30**(4 Suppl): p. 59-70.
14. Kalogeromitros, D., et al., *Influence of the menstrual cycle on skin-prick test reactions to histamine, morphine and allergen*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(5): p. 461-6.
15. Vrieze, A., D.S. Postma, and H.A. Kerstjens, *Perimenstrual asthma: a syndrome without known cause or cure*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(2): p. 271-82.
16. Settipane, R.A. and R.A. Simon, *Menstrual cycle and asthma*. Ann Allergy, 1989. **63**(5): p. 373-8.
17. Troisi, R.J., et al., *Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(4 Pt 1): p. 1183-8.
18. Barr, R.G., et al., *Prospective study of postmenopausal hormone use and newly diagnosed asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Arch Intern Med, 2004. **164**(4): p. 379-86.
19. Patki, A., *Eat dirt and avoid atopy: the hygiene hypothesis revisited*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2007. **73**(1): p. 2-4.
20. Ackerman, L.S., *Sex hormones and the genesis of autoimmunity*. Arch Dermatol, 2006. **142**(3): p. 371-6.

21. Whitacre, C.C., *Sex differences in autoimmune disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 777-80.
22. Whitacre, C.C., S.C. Reingold, and P.A. O'Looney, *A gender gap in autoimmunity*. Science, 1999. **283**(5406): p. 1277-8.
23. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 375-87.
24. Oboki, K., et al., *Th17 and allergy*. Allergol Int, 2008. **57**(2): p. 121-34.
25. Federman, D.D., *The biology of human sex differences*. N Engl J Med, 2006. **354**(14): p. 1507-14.
26. Matthews, J. and J.A. Gustafsson, *Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta*. Mol Interv, 2003. **3**(5): p. 281-92.
27. Islander, U., et al., *Influence of oestrogen receptor alpha and beta on the immune system in aged female mice*. Immunology, 2003. **110**(1): p. 149-57.
28. Norman, A.W., M.T. Mizwicki, and D.P. Norman, *Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(1): p. 27-41.
29. Cato, A.C., A. Nestl, and S. Mink, *Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways*. Sci STKE, 2002. **2002**(138): p. RE9.
30. Collins, P. and C. Webb, *Estrogen hits the surface*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1130-1.
31. Deroo, B.J. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 561-70.
32. Grimaldi, C.M., et al., *Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 811-20.
33. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1703-11.
34. Kanda, N. and K. Tamaki, *Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 282-8.
35. Lamason, R., et al., *Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty*. BMC Immunol, 2006. **7**: p. 2.
36. Erlandsson, M.C., et al., *Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus*. Immunology, 2001. **103**(1): p. 17-25.
37. Vliagoftis, H., et al., *Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **98**(4): p. 398-409.
38. Hamano, N., et al., *Effect of sex hormones on eosinophilic inflammation in nasal mucosa*. Allergy Asthma Proc, 1998. **19**(5): p. 263-9.
39. Zhao, X.J., et al., *Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways*. Thorax, 2001. **56**(3): p. 205-11.
40. Zaitso, M., et al., *Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx*. Mol Immunol, 2007. **44**(8): p. 1977-85.
41. Benten, W.P., et al., *Testosterone induces Ca<sup>2+</sup> influx via non-genomic surface receptors in activated T cells*. FEBS Lett, 1997. **407**(2): p. 211-4.
42. Benten, W.P., et al., *Developmental regulation of intracellular and surface androgen receptors in T cells*. Steroids, 2002. **67**(11): p. 925-31.

43. Olsen, N.J., et al., *Androgen deprivation induces phenotypic and functional changes in the thymus of adult male mice*. *Endocrinology*, 1991. **129**(5): p. 2471-6.
44. Rahman, F. and H.C. Christian, *Non-classical actions of testosterone: an update*. *Trends Endocrinol Metab*, 2007. **18**(10): p. 371-8.
45. Benten, W.P., et al., *Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells*. *Faseb J*, 1999. **13**(1): p. 123-33.
46. Zannolli, R. and G. Morgese, *Does puberty interfere with asthma?* *Med Hypotheses*, 1997. **48**(1): p. 27-32.
47. Herz, U., H. Renz, and U. Wiedermann, *Animal models of type I allergy using recombinant allergens*. *Methods*, 2004. **32**(3): p. 271-80.
48. Astorquiza, M.I., E. Maldonado, and C. Cisternas, *Sex modifies IgE antibody response*. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 1991. **1**(1): p. 49-52.
49. Yamatomo, T., et al., *Sex-related differences in the initiation of allergic rhinitis in mice*. *Allergy*, 2001. **56**(6): p. 525-31.
50. Hayashi, T., et al., *Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in BALB/c mice*. *Scand J Immunol*, 2003. **57**(6): p. 562-7.
51. Melgert, B.N., et al., *Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice*. *Clin Exp Allergy*, 2005. **35**(11): p. 1496-503.
52. Herz, U., et al., *Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness*. *Clin Exp Allergy*, 1998. **28**(5): p. 625-34.
53. Yasue, M., et al., *Comparison of sensitization to crude and purified house dust mite allergens in inbred mice*. *Lab Anim Sci*, 1998. **48**(4): p. 346-52.
54. Ovary, Z., *Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse*. *J Immunol*, 1958. **81**(4): p. 355-7.
55. Saloga, J., et al., *Development and transfer of immediate cutaneous hypersensitivity in mice exposed to aerosolized antigen*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(1): p. 133-40.
56. Seitzer, U., et al., *Quantitative assessment of immediate cutaneous hypersensitivity in a mouse model exhibiting an IgE response to Timothy grass allergens*. *Med Sci Monit*, 2003. **9**(12): p. BR407-12.
57. Togawa, M., M. Kiniwa, and H. Nagai, *The roles of IL-4, IL-5 and mast cells in the accumulation of eosinophils during allergic cutaneous late phase reaction in mice*. *Life Sci*, 2001. **69**(6): p. 699-705.
58. Iwamoto, I., et al., *Role of CD4+ T lymphocytes and interleukin-5 in antigen-induced eosinophil recruitment into the site of cutaneous late-phase reaction in mice*. *J Leukoc Biol*, 1992. **52**(5): p. 572-8.
59. Sawada, K., et al., *The expression of murine cutaneous late phase reaction requires both IgE antibodies and CD4 T cells*. *Clin Exp Allergy*, 1997. **27**(2): p. 225-31.
60. Sato, E., et al., *Chronic inflammation of the skin can be induced in IgE transgenic mice by means of a single challenge of multivalent antigen*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(1): p. 143-8.
61. Erlandsson, M.C., et al., *Oestrogen receptor specificity in oestradiol-mediated effects on B lymphopoiesis and immunoglobulin production in male mice*. *Immunology*, 2003. **108**(3): p. 346-51.
62. Quarto, R., J.P. Kinet, and H. Metzger, *Coordinate synthesis and degradation of the alpha-, beta- and gamma-subunits of the receptor for immunoglobulin E*. *Mol Immunol*, 1985. **22**(9): p. 1045-51.

63. Furuichi, K., J. Rivera, and C. Isersky, *The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: effect of ligand binding on receptor expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(5): p. 1522-5.
64. Jensen-Jarolim, E. and E. Untersmayr, *Gender-medicine aspects in allergology*. Allergy, 2008. **63**(5): p. 610-5.
65. Yang, J.H., et al., *Hormone replacement therapy reverses the decrease in natural killer cytotoxicity but does not reverse the decreases in the T-cell subpopulation or interferon-gamma production in postmenopausal women*. Fertil Steril, 2000. **74**(2): p. 261-7.
66. Grimaldi, C.M., et al., *Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation*. J Clin Invest, 2002. **109**(12): p. 1625-33.
67. Bouman, A., et al., *Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans*. Am J Reprod Immunol, 2004. **52**(1): p. 19-26.
68. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
69. Arps, V. and E. Kolsch, *The role of interleukin-10 in the generation of CD4+ and CD8+ memory T cells (expressing a CD44+, CD62L- phenotype) and their contribution to the regulation of immunoglobulin E antibody formation*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **127**(3): p. 198-207.
70. Giron-Gonzalez, J.A., et al., *Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women*. Eur J Endocrinol, 2000. **143**(1): p. 31-6.
71. Matsui, E., et al., *Reduced IFNgamma production in response to IL-12 stimulation and/or reduced IL-12 production in atopic patients*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(9): p. 1250-6.
72. Teramoto, T., et al., *Serum IgE level is negatively correlated with the ability of peripheral mononuclear cells to produce interferon gamma (IFNgamma): evidence of reduced expression of IFNgamma mRNA in atopic patients*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(1): p. 74-82.
73. Giltay, E.J., et al., *In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(4): p. 1648-57.
74. Riffo-Vasquez, Y., et al., *Role of sex hormones in allergic inflammation in mice*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(3): p. 459-70.
75. Narita, S., et al., *Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(1): p. 48-52.
76. Tanriverdi, F., et al., *The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity*. J Endocrinol, 2003. **176**(3): p. 293-304.
77. Jacobson, J.D. and M.A. Ansari, *Immunomodulatory actions of gonadal steroids may be mediated by gonadotropin-releasing hormone*. Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 330-6.
78. Chen, H.F., et al., *Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(2): p. 743-50.

79. Silveira, L.F., et al., *Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR "knockout"*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2973-7.
80. Jacobson, J.D., et al., *Gonadotropin-releasing hormone increases CD4 T-lymphocyte numbers in an animal model of immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(3 Pt 1): p. 653-8.
81. Pene, J., et al., *Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen*. Eur J Immunol, 1988. **18**(6): p. 929-35.
82. Beagley, K.W. and C.M. Gockel, *Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **38**(1): p. 13-22.
83. Verthelyi, D., *Sex hormones as immunomodulators in health and disease*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(6): p. 983-93.
84. Nonoyama, S., M.L. Farrington, and H.D. Ochs, *Effect of IL-2 on immunoglobulin production by anti-CD40-activated human B cells: synergistic effect with IL-10 and antagonistic effect with IL-4*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **72**(3): p. 373-9.
85. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
86. Vermeire, K., et al., *Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5507-13.
87. Manoury-Schwartz, B., et al., *High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors*. J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5501-6.
88. Laan, M., et al., *Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways*. Eur Respir J, 2002. **19**(3): p. 534-7.
89. Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska, *Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine*. Respir Med, 2003. **97**(6): p. 726-33.
90. Schnyder-Candrian, S., et al., *Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2715-25.
91. Hubert, J.F., A. Vincent, and F. Labrie, *Estrogenic activity of phenol red in rat anterior pituitary cells in culture*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **141**(3): p. 885-91.
92. Okuyama, K., et al., *Sex-related splenocyte function in a murine model of allergic asthma*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(7): p. 1212-9.
93. Fata, J.E., V. Chaudhary, and R. Khokha, *Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 680-8.
94. Bebo, B.F., Jr., et al., *Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2080-9.
95. Colledge, W.H., *GPR54 and puberty*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(9): p. 448-53.
96. Low, Y.L., et al., *Phytoestrogen exposure is associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women and interact with ESR1 and NR1I2 gene variants*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(5): p. 1009-16.
97. Labrie, F., et al., *Is dehydroepiandrosterone a hormone?* J Endocrinol, 2005. **187**(2): p. 169-96.

98. Labrie, F., et al., *Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(8): p. 2403-9.
99. Erben, R.G., J. Eberle, and M. Stangassinger, *B lymphopoiesis is upregulated after orchiectomy and is correlated with estradiol but not testosterone serum levels in aged male rats*. Horm Metab Res, 2001. **33**(8): p. 491-8.
100. Spearow, J.L., et al., *Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice*. Science, 1999. **285**(5431): p. 1259-61.
101. Beckers, J. and M. Hrabé de Angelis, *Von der funktionellen Genomforschung zur systemischen Krankheitsanalyse*, in *BIOspektrum*. 2007. p. 504-506.

## 8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Miriam Gerstenberg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Bedeutung von Geschlecht, Alter und Stamm für die allergische Immunantwort im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere Frau Prof. Dr. Worm möchte ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Rohde danke ich für die Bestimmung des Estradiols und die insgesamt freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die einzigartig angenehme Arbeitsatmosphäre. Sie haben mich immer wieder inspiriert, mich zum Lachen gebracht und wichtige Pausen der Entspannung garantiert. Elke Luger danke ich für die wertvollen Diskussionen und die fachlich praktische Unterstützung. Stephanie Soost danke ich für klinisch orientierten Rat, auch im Rahmen der gemeinsamen Teilnahme am „3. Berliner Symposium zur Geschlechterforschung in der Medizin“. Dennis Ernst danke ich für seine Geduld und Klarheit in jedweder Situation. Christin Koch danke ich für das kritische, fundierte Hinterfragen und ihre aufmunternde Art, - die perfekte Kombination an Motivation und Auflockerung. Weiterhin danke ich Anja Dahten, Verena Fokuhl, Dana Hoser und Sabine Dölle für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, dafür, dass sie meine Zeit im Labor bereichert und unvergesslich gemacht haben.

Unvergesslich bleibt für mich auch der Austausch mit Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der anderen Arbeitsgemeinschaften, mit denen wir die dermatologischen Forschungslabore gemeinschaftlich nutzen. Ich danke Cathleen Sünder und Mandy Grusser für die Inspiration, Diskussion und Beratung, für die Freundschaft.

Nicht zuletzt denke ich an dieser Stelle an die Mäuse. Die Arbeit mit jedem einzelnen Lebewesen hat für mich die Studie zu dem gemacht, was sie geworden ist.



Für die finanzielle Unterstützung durch die Studentische Forschungsförderung der Charité danke ich.

- DANKSAGUNG -

Abschließend danke ich meinen Eltern für die unermessliche Unterstützung auf meinem gesamten Bildungsweg.

Jan – Worte reichen nicht aus – ich danke dir von ganzem Herzen – für alles!

Eine weitere bruchstückhafte Liste derer, die mich während der Zeit begleitet und bereichert haben: AnneAnnemarieAnnkathrinBeateCarlottaCécileChristaConstanzeDanielaDianaEckertsEsperienzaViaggiFabioFrankGaetanoGianlucaHannaHannahJanaJensJuleKarinLeopoldLinoLorenzoManuelaMarioMatteoMaximNadinePatPaulPeterRabiaSimoneTimoTobiVito... DANKE.

## 10 LEBENSLAUF

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