

Aus dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

und

der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité-Universitätsmedizin

Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die allergische Immunantwort

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Friederike A. Kirn

Tierärztin aus Rottweil

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3265

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. M.F.G. Schmidt
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. M. Worm

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

gnrh, hormone antagonists, oestrogens, cyproterone acetate, sex differences, sex hormones, immune response, atopy, skin diseases, dermatitis, animal models, skin tests, Ovalbumin

Tag der Promotion: 02.03.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-606-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Allergie	1
1.1.1.	Typ I Reaktion	1
1.1.2.	Molekulare Mechanismen der IgE-Regulation	2
1.1.3.	Typ IV Reaktion.....	3
1.2.	Allergie und Geschlecht.....	4
1.2.1.	Hypophysen-Hypothalamus-Achse	5
1.2.2.	Östrogen	7
1.2.3.	Östrogenrezeptoren	9
1.2.4.	Hormonrezeptorantagonisten und Hormonrezeptormodulatoren	10
1.3.	Die Atopische Dermatitis	13
1.3.1.	Atopie.....	13
1.3.2.	Epidemiologie.....	13
1.3.3.	Klinik	13
1.3.4.	Atopische Dermatitis und Geschlecht	15
2.	Ziele dieser Arbeit	16
3.	Material und Methoden.....	17
3.1.	Materialien.....	17
3.2.	Versuchstiere	17
3.3.	Tierhaltung	17
3.4.	Mausmodelle.....	17
3.4.1.	Erster Versuchsteil:	17
3.4.2.	Zweiter Versuchsteil:	18
3.4.3.	Dritter Versuchsteil	19
3.5.	Bestimmung der lokalen Immunantwort mittels Hauttest	19
3.6.	Bestimmung der Serumestradiolgehalte mittels Radioimmunosorbent Assay	20
3.7.	Antikörperbestimmung mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	20
3.8.	Milzzellkultur und Stimulation	22
3.8.1.	Milzzellaufreinigung.....	22
3.8.2.	Milzzellkultur.....	22
3.8.3.	Zytokinbestimmung mittels Flow Cytometry Based Fluorescent Bead Immunoassay	23
3.9.	Klinische Ausprägung der Atopischen Dermatitis	23
3.10.	Histologie.....	23

3.10.1.	Einbetten und Schneiden der Hautbiopsien.....	23
3.10.2.	Färbung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Zellen	24
3.10.3.	Messung der Epidermisdicke	25
3.11.	Mastzellfärbung	25
3.12.	Quantitative Bestimmung der Zellinfiltrate.....	25
3.13.	Statistik.....	26
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Hormonkompetente vs. hormoninkompetente Tiere	27
4.1.1.	Humorale Immunantwort	27
4.1.2.	Zytokinantwort.....	29
4.1.3.	Estradiollevel.....	30
4.2.	Behandelte Tiere	31
4.2.1.	Systemische Immunantwort	31
4.2.1.1.	Humorale Immunantwort.....	31
4.2.1.2.	Zytokinantwort.....	33
4.2.2.	Lokale Immunantwort.....	34
4.2.3.	Estradiollevel.....	35
4.3.	Tiere im Mausmodell der Atopischen Dermatitis.....	37
4.3.1.	Systemische Immunantwort	37
4.3.1.1.	Humorale Immunantwort.....	37
4.3.1.2.	Zytokinantwort.....	39
4.3.1.3.	Gesamtzahl Lymphozyten.....	40
4.3.1.4.	B-T-Zell-Ratio.....	40
4.3.2.	Lokale Immunantwort.....	41
4.3.2.1.	Klinische Ausprägung der Atopischen Dermatitis	41
4.3.2.2.	Ergebnisse der Histologie	42
5.	Diskussion.....	47
5.1.	Hormonkompetente vs. hormoninkompetente Tiere	47
5.2.	Einfluss von Geschlechtshormonen auf die allergische Immunantwort nach Behandlung mit hormonselektiven Antagonisten.....	50
5.3.	Tiere im Mausmodell der Atopischen Dermatitis.....	55
5.4.	Abschließende Betrachtung	57
6.	Zusammenfassung.....	59
7.	Summary.....	61

A. Anhang

A.1. Abkürzungen

A.2. Abbildungen

A.3. Geräte

A.4. Software

A.5. Verbrauchsmaterialien

A.6. Chemikalien und Reagenzien

A.7. Antikörper und Sekundärreagenzien

A.8. Puffer und Lösungen

Referenzen

Danksagungen

Selbständigkeitserklärung

1. Einleitung

1.1. Die Allergie

Der Begriff „Allergie“ aus dem Griechischen *allos* = fremd und *ergon* = Werk, Reaktion wurde 1906 das erste Mal von Freiherrn Clemens von Pirquet benutzt. Er definierte die Allergie zunächst als „veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine fremde Substanz zu reagieren“. Diese sehr weitgefasste Definition umfasst zahlreiche immunologische Reaktionen. Daher ist die Definition der Allergie als „angeborene oder erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber körperfremden, eigentlich unschädliche Substanzen, die als Allergen erkannt werden“ heute enger gefasst (1, 2).

Nach Coombs und Gell (1963) werden entsprechend ihrer Pathophysiologie vier Typen der immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen unterschieden. Diese vier Formen laufen nicht isoliert sondern teilweise parallel ab oder gehen ineinander über. Für diese Arbeit sind Reaktionen vom Typ I und Typ IV von Bedeutung und werden im Folgenden näher erläutert.

1.1.1. Typ I Reaktion

Die Typ I Reaktion (syn. Frühtyp, humorale Allergie, Soforttyp, anaphylaktischer Typ) ist die häufigste Form einer Allergie und geht mit der Bildung von allergenspezifischem IgE sowie deren Fixierung an Mastzellen einher. Allergene können zahlreiche Stoffe sein, wie zum Beispiel Pollen, Medikamente, Nahrungsmittelbestandteile oder auch Hausstaubmilben und Tierhaare. Während der Sensibilisierung des Organismus auf ein spezifisches Antigen spielt auch die verminderte Aktivität der Suppressorzellen eine Rolle.

Schließlich werden Peptide des Antigens an Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHCII) gebunden und von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) zur Aktivierung von T-Zellen präsentiert. Die Aktivierung und Interaktion von B- und T-Lymphozyten führt schließlich zur Produktion von IgE-Antikörpern, die an den hoch affinen IgE-Rezeptor (FcεRI) binden, der beispielsweise von Mastzellen exprimiert wird und nach Kreuzvernetzung die Ausschüttung enthaltener Mediatoren auslöst. Auch zirkulierende Basophile, aktivierte Eosinophile (2, 3) sowie Langerhanszellen der Haut und Blutmonozyten weisen den hochaffinen FcεRI Rezeptor auf (4).

Auch der niedrig affine IgE-Rezeptor CD23 (FcεRII), der zum Beispiel auf Monozyten, Eosinophilen, B-Zellen und T-Zellen exprimiert wird, ist in der Lage IgE zu binden.

Nach erfolgter Sensibilisierung auf ein Allergen führt der wiederholte Kontakt zur Freisetzung von Mastzellmediatoren wie Histamin und Prostaglandinen.

Die späte Phase der allergischen Reaktion beginnt etwa 8-12 Stunden später und ist durch die Ausschüttung von Prostaglandinen, Leukotrienen, Zytokinen und Chemokinen gekennzeichnet.

Diese Spätreaktion ist an der Ausbildung chronischer allergischer Inflammation beteiligt, die beim allergischen Asthma oder der atopischen Dermatitis auftritt (2).

1.1.2. Molekulare Mechanismen der IgE-Regulation

Für die IgE-Produktion sind zwei Prozesse notwendig.

Die Verschiebung der Immunantwort in Richtung T_H2 :

Allergen wird durch Antigen präsentierende Zellen aufgenommen und dadurch aktiviert. Sie präsentieren naiven T_H -Zellen schließlich Peptide des Allergens mittels MHC II. Kleine lösliche Peptide und das Vorhandensein von IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 begünstigen die Entwicklung von T_H2 -Zellen, die schließlich die Produktion von T_H2 -Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 begünstigen (2).

Klassenwechsel der B-Zelle zum ϵ -Isotyp:

Auf die Bindung des Allergens am spezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR) folgt das Crosslinking des Rezeptors und die Internalisierung des Allergens. Auf MHC II präsentierte Peptide können von Allergen spezifischen T_H -Zellen erkannt werden. Das 2-Signal-Modell beschreibt die CD40/CD40-Ligand Interaktion zwischen B-Zelle und aktivierter T_H -Zelle als erstes Signal, das 2. Signal ist Zytokin vermittelt und besteht in der Produktion von IL-4 und IL-13 durch T_H2 -Zellen, Basophile oder Mastzellen, die den Immunglobulinklassenwechsel nach IgE begünstigen (5).

Der Wechsel einer naiven B-Zelle, die IgM und IgD exprimiert zur IgE exprimierenden B-Zelle kann direkt oder sequentiell erfolgen (6). Aktivierte B-Zellen können zu Memory-B-Zellen, Antikörper produzierende Plasmablasten sowie Plasmazellen ausdifferenzieren.

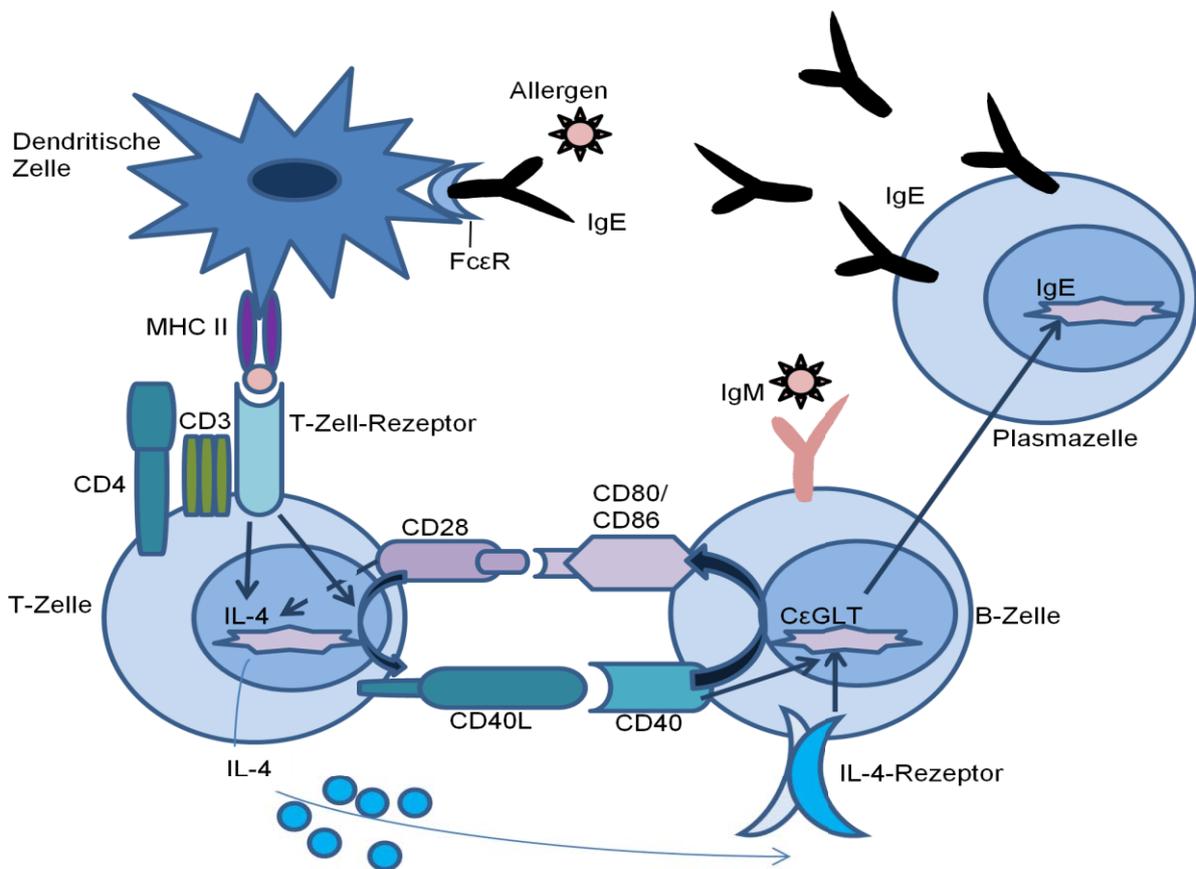


Abb. 1: Zell-Zell-Interaktionen beim Klassenwechsel (nach (7))

1.1.3. Typ IV Reaktion

Die Typ IV Reaktion (syn. verzögerter Typ, zellvermittelte Allergie) ist T-Zell abhängig. Als Beispiel ist die Kontaktallergie zu nennen, bei der meist niedermolekulare Substanzen wie Metalle allergen wirken. Die Sensibilisierungsphase dauert Tage bis Wochen und auch die Allergiesymptome treten nach erneutem Allergenkontakt erst 12 bis 72 Stunden später auf. Während der Sensibilisierungsphase kommt es zur Aufnahme des Allergens durch Langerhanszellen der Haut. Diese und unreifen dendritischen Zellen präsentieren das aufgenommene Antigen in Lymphknoten, hier bilden sich spezifische T-Zellen, sogenannte Gedächtniszellen, die sich in die Haut zurückziehen. Diese Gedächtniszellen setzen bei erneutem Allergenkontakt Zytokine und Chemokine ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF) frei, die im Gegenzug Keratinozyten stimulieren und inflammatorische Zytokine ausschütten und die klonale Expansion spezifischer T-Zellen fördern.

1.2. Allergie und Geschlecht

Zahlreiche Studien belegen einen deutlichen Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Entwicklung und das Auftreten der allergischen Immunantwort (8-10). Epidemiologischen Studien zufolge treten atopische Erkrankungen einschließlich Asthma bei Jungen deutlich häufiger auf als bei Mädchen, während bei Erwachsenen Frauen häufiger betroffen sind (11-14). Es ist bekannt, dass Asthmasymptome sich während der späten Follikelphase, wenn der Östrogengehalt des Blutes höher ist als in der Lutealphase verstärken (15-17), auch werden Frauen häufiger wegen des Asthmas stationär behandelt als Männer und 50% dieser Frauen befanden sich zum Zeitpunkt der Einweisung in der perimenstruellen Phase des Zyklus (18).

Die Ekzemprävalenz ist bei Mädchen höher als bei Jungen, sie steigt mit fortschreitendem Alter sogar weiter an (19). Hautreaktionen zeigen eine Zyklusabhängigkeit und sind während des Menstruationszyklus häufiger in der Luteal- und Follikelphase, was den Einfluss von Geschlechtshormonen auf die allergische Immunantwort vermuten lässt (20).

Vergleichbare Daten zeigen Ergebnisse aus In-Vitro-Studien (21-25): Während Androgene und Progesteron die B-Zell-Antwort hemmen, fördern Östrogene die Immunglobulinproduktion in vivo und in vitro (26). Testosteron hemmt dagegen die Histaminproduktion und die Mastzelldegranulation, wohingegen erhöhte Konzentrationen von Östrogen die Mastzelldegranulation fördern (27, 28).

Die Daten aus Studien zur Lymphozytenreifung und -proliferation sind widersprüchlich. Ein Einfluss von Geschlechtshormonen scheint gegeben, dennoch ist nicht klar in welchem Umfang und über welche Mechanismen Östrogene die Reifung und Proliferation von Lymphozyten beeinflussen (29).

In Tiermodellen wurde gezeigt, dass Östrogene die Immunglobulinproduktion und die Produktion von T_H2-Zytokinen stimulieren, wohingegen Progesteron und Androgene das Immunsystem unterdrücken (30, 31). Im Gegensatz verstärkt Progesteron die allergische Atemwegentzündung bei OVA sensibilisierten Mäusen. Dies wurde mittels einer erhöhten bronchialen Antwort auf Metacholin sowie Eosinophilie des Lungengewebes nachgewiesen (32).

Die Aussagekraft der Daten aus in-vivo Mausmodellen welche die Rolle der Geschlechtshormone in geeigneten Allergiemodellen prüfen ist begrenzt. Astorquiza et al. berichten, dass die spezifische IgE-Antwort, nicht aber die IgG- oder die IgM-Antwort bei RF-Mäusen niedriger ist als bei weiblichen Mäusen, die OVA sensibilisiert wurden (33).

Eine neuere Studie zeigt, dass die initiale Immunantwort orchektomierter Mäuse verstärkte spezifische IgE-Antworten aufweisen (34).

Riffo-Vasquez et al. zeigten, dass Ovariectomie vor Sensibilisierung mit OVA die Lungeninflammation sowie die Überreaktion der Atemwege auf Metacholin verhinderte (35). Allerdings wurde keine signifikante Reduktion der Gesamt-IgE-Werte bei den hormoninkompetenten Mäusen festgestellt, auch waren IL-4 und IFN γ nicht verändert. Allerdings war die Fähigkeit des Immunsystems IL-5 zu produzieren bei Ovariectomierten Mäusen beeinträchtigt.

Eine mögliche Konsequenz hieraus könnte sein, dass während der späteren Allergenexposition der Mäuse die klonale Expansion und das Homing der T-Zellen während der Allergenexposition ausgeglichen sind.

Mäuse, die vor und während der Sensibilisierung mit einem Östrogenrezeptormodulator (Tamoxifen) behandelt wurden, zeigten eine geringer ausgeprägte Eosinophilie der Lunge, das gleiche Ergebnis war bei ovariectomierten Mäusen zu sehen. Ovariectomierte Mäuse, denen jedoch Östrogen appliziert wurde zeigten zwar stärkere Eosinophilie, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Um die Rolle von Östrogen während der Effektorphase aufzudecken, wurden die Mäuse erst nach der Sensibilisierung kastriert. Die lokale Immunantwort in der Lunge war unverändert, es war ein Trend zu beobachten, dass vermehrt Eosinophile ins Lungengewebe rekrutiert werden. Deutlich war jedoch ein höherer IL-5-Gehalt in der bronchoalveolären Lavage, was einen intensiveren Entzündungsprozess vermuten lässt. Zusätzlich war IL-4 erhöht und IFN γ vermindert.

Östrogene scheinen aber auch anti-inflammatorisch wirken zu können, so zeigten Riffo-Vasquez et al., dass nach Sensibilisierung ovariectomierte Mäuse, denen während der Antigenprovokation Östradiolbenzoat appliziert wurde, geringere Eosinophilie der Lunge aufweisen.

Über welche Mechanismen Östrogen auf lokaler sowie auf humoraler Ebene wirkt, wird jedoch auch in dieser neuesten Untersuchung nicht geklärt.

1.2.1. Hypophysen-Hypothalamus-Achse

Die Produktion der Geschlechtshormone unterliegt einem komplexen zentralen Steuer- und Regelsystem welches für die funktionierende Koordination zwischen ZNS und Hormonsystem sorgt.

Beim Menschen wird etwa alle 60-90 Minuten das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) aus den diffus verteilten Neuronen des mittleren Hypothalamus in das Portalvenensystem

sezerniert und gelangt zur Hypophyse. GnRH ist ein Dekapeptid, welches auf GnRH-Rezeptoren der Hypophyse wirkt.

Der GnRH-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Peptidhormonrezeptor (GPgR), dessen Gewebsexpression hochspezifisch ist. Er ist mit 328 Aminosäuresequenzen einer der kleinsten GPgR. Er gehört zu den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren und ist der Einzige bei Säugern bekannte GPgR, dem der funktionell bedeutsame zytoplasmatische C-Terminus gänzlich fehlt (36). Dieser Rezeptorabschnitt beherbergt oftmals die spezifischen Phosphorylierungsstellen für G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen. Dies hat zur Folge, dass der GnRH-Rezeptor keiner schnellen homologen Desensibilisierung infolge Agonistenstimulation unterliegt, was zu außergewöhnlich hohen Internalisierungsraten führt (37, 38). Am Ende der Kaskade vermittelt der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen die GnRH-induzierte Sekretion von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-Stimulierendem-Hormon (FSH) (39).

Beim Menschen existieren strukturelle Varianten des GnRH-Rezeptors, so besitzt GnRH-Rezeptor II einen zytoplasmatischen C-Terminus und unterliegt einer schnellen Desensibilisierung und Internalisierung und wird ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert. Er spielt bei Steroidhormon-abhängigen Tumoren eine Rolle und wird sowohl in gutartigem als auch in bösartigem Gewebe exprimiert (40).

LH und FSH gelangen über die Blutbahn an ihren Wirkort, den Gonaden. Beide binden an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei der Frau befinden sich die FSH-Rezeptoren auf den Granulosazellen des Ovars, die LH-Rezeptoren auf Theka-, Granulosa- und Lutealzellen sowie auf den Zellen des Interstitiums.

Beim Mann finden sich FSH-Rezeptoren auf den Sertoli-Zellen, LH-Rezeptoren ausschließlich auf den Leydig-Zellen.

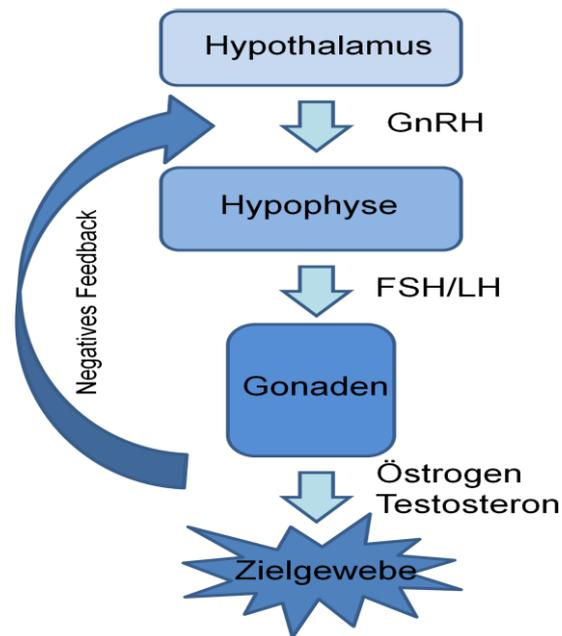


Abb. 2: Regulation der Geschlechtshormonproduktion

Beim Mann stimuliert FSH die Spermatogenese und LH die Produktion und Sekretion von Testosteron aus den Leydig-Zellen des Hodengewebes.

Bei der Frau stimuliert FSH das Follikelwachstum auf den Ovarien. Infolge der folliculären Östrogensynthese setzt nach anfänglicher positiver Rückkopplung eine negative Rückkopplung auf die Hypophyse ein. Es kommt zur Ovulation und zur Luteinisierung der Granulosa- und Thekazellen.

1.2.2. Östrogen

Östrogene (auch: Estrogene) gehören zu den Steroidhormonen. Das Grundgerüst der Steroidhormone ist Perhydrocyclopentanophenanthren (früher: Steran) mit 17 Kohlenstoffatomen (C₁₇). Abhängig von der Lokalisation von Doppelbindungen und Seitenketten sowie der Gesamtanzahl der Kohlenstoffatome lassen sich verschiedene Steroidklassen unterscheiden:

- C₂₇ – Cholesterol
- C₂₁ – Gestagene
- C₁₉ – Androgene
- C₁₈ – Östrogene

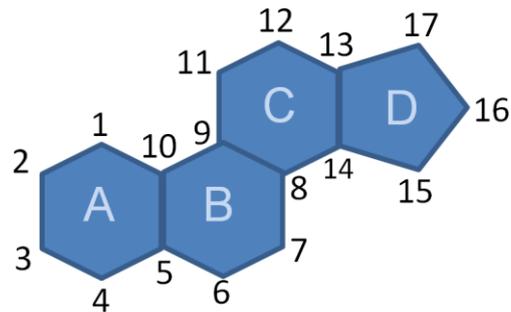


Abb. 3: Perhydrocyclopentanophenanthren, Grundgerüst der Steroidhormone

Die Steroidhormonsynthese beginnt mit dem Ausgangssubstrat Cholesterin, welches in Gonaden und Leber aus Acetyl-Coenzym-A synthetisiert werden kann. Eine weitere Quelle ist aber auch die Nahrung: Hier kann es über Low Density Lipoprotein aus dem Darm resorbiert werden. In der Zelle können schließlich über Gestagene und Androgene Östrogene gebildet werden. Die für den Menschen und Primaten beschriebene Synthese aus Dehydroepiandrosteron, welches in den Nebennieren synthetisiert wird, ist bei der Maus nicht beschrieben (41).

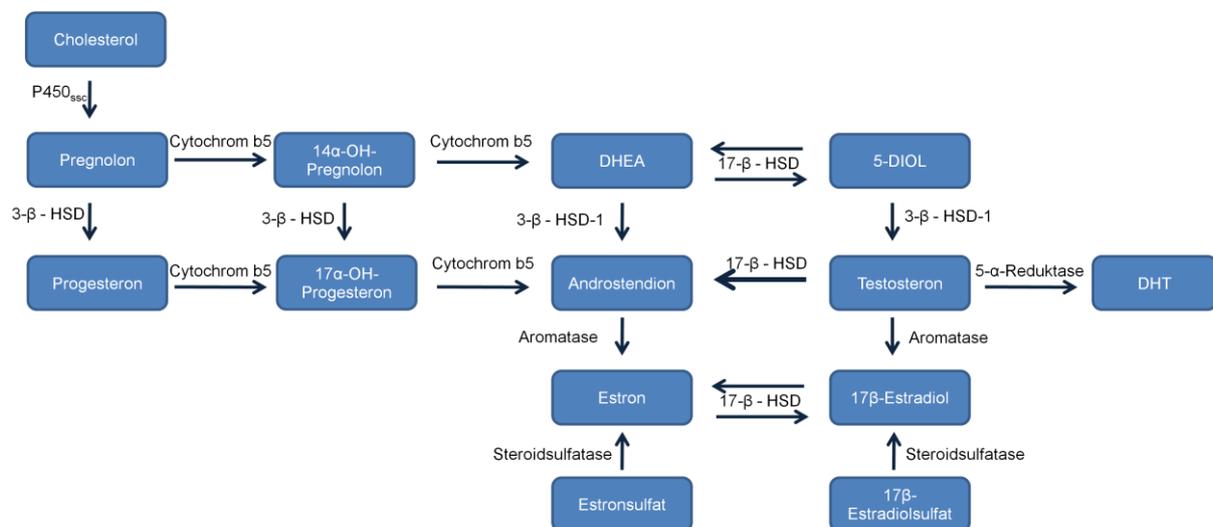


Abb. 4: Die Steroidsynthese beim Menschen (modifiziert nach Labrie et al. 2005).
P450ssc = Cholesterindesmolase; **DHEA** = Dihydroepiandrosteron; **5-DIOL** = Androst-5-en-3 α , 17 β -diol; **HSD** = Hydroxysteroiddehydrogenase; **DHT** = Dihydrotestosteron;

Das wirksamste natürlich vorkommende und hauptsächlich zirkulierende Estrogen ist 17 β -Estradiol (E₂). Estron (E₁) besitzt nur ein Drittel und Estradiol (E₃) nur ein Zehntel der biologischen Aktivität des Estradiols.

Estrogene werden im Blut an SHBG sowie auch an Albumin gebunden transportiert, ihre biologische Halbwertszeit beträgt etwa 90 Minuten. Sie werden in der Leber metabolisiert und mit dem Harn ausgeschieden.

1.2.3. Östrogenrezeptoren

Die Wirkung von Estrogenen wird durch zwei Estrogenrezeptoren (ER) vermittelt, ER α und ER β . Beide gehören zur Familie der Nuklearrezeptoren und sind Transkriptionsfaktoren.

ER enthalten Bindungsdomänen, die strukturell und funktionell unterschiedlich sind. Die DNA-Bindungs-Domäne ist beteiligt an der DNA-Bindung und Erkennung, die Ligandenbindungsstelle liegt am C-terminalen Teil des Rezeptors. Die variabelste Region ist die NH₂-terminale Region, welche an der Aktivierung der Transkription beteiligt ist (AF).

Die Estrogenrezeptoren unterscheiden sich hauptsächlich in ihren NH₂-terminalen Domänen, ihre Affinität zu E₂ ist jedoch sehr ähnlich (42).

ER und ERs sind Produkte zweier unterschiedlicher Gene, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (43, 44). Für beide Rezeptoren sind zahlreiche Spleißvarianten beschrieben. Ob diese als funktionelle Proteine mit biologischen Funktionen exprimiert werden, ist nicht geklärt.

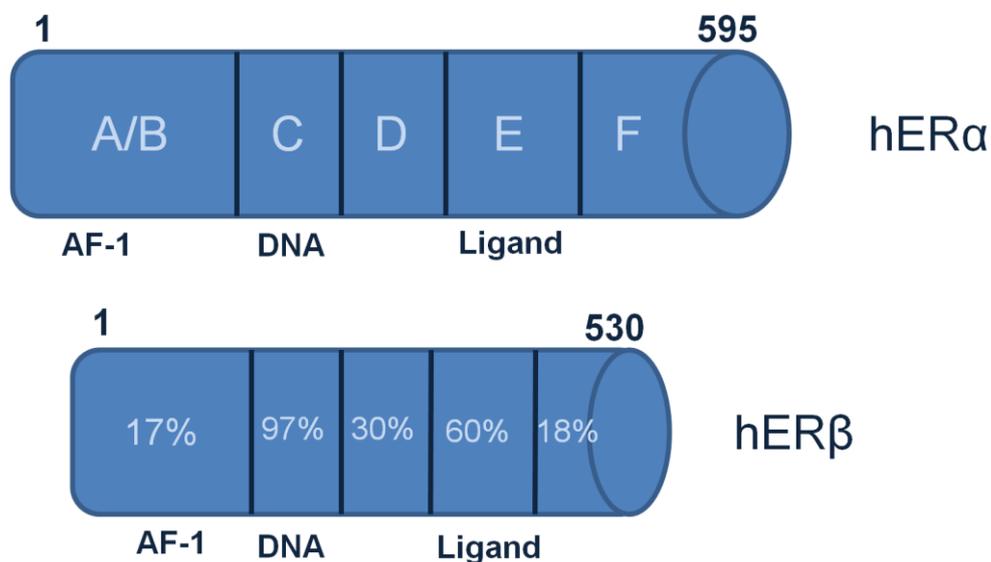


Abb. 5: Die humanen Östrogenrezeptoren α und β

Beide Rezeptoren auf allen Zellen des Immunsystems exprimiert. Wie viele jeweils auf einer Zelle exprimiert werden, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So ist beispielsweise

bekannt, dass unter inflammatorischen Bedingungen mehr ER β exprimiert wird, was zur Beeinflussung der Estrogenwirkungen führen kann (29).

Die Wirkweise der Rezeptoren ist sehr vielfältig. Rezeptor-Liganden-Komplexe können direkt an Estrogenrezeptorbindungselemente (ERE) binden, welche in den Promotorregionen der Zielgene liegen oder sie können mit weiteren Transkriptionsfaktoren interagieren, so zum Beispiel mit Fos/Jun oder SP-1. Hierdurch werden Promotorregionen von Genen beeinflusst, die keine EREs aufweisen.

Über zahlreiche Koregulatoren und Änderungen der Chromatinstruktur wird schließlich die Polymerase II aktiviert und die Transkription beginnt. Die zugrunde liegenden Mechanismen müssen noch detailliert geklärt werden.

Außer den genomischen Mechanismen sind sehr viel schnellere, nicht-genomische Mechanismen bekannt. Hier werden über die Aktivierung von Phosphatasen und Kinasen Ioneneinströme für die Estrogenwirkungen verantwortlich gemacht. Dies beschreiben Zaitsev et al. 2007 für die Mastzelle, die in-vitro unter Estrogeneinfluss nach der Degranulation mehr intrazelluläres Kalzium aufweist als Mastzellen, die unbehandelt blieben (28).

Zusätzlich zu diesen beiden ligandeninduzierten Mechanismen wurden ligandenunabhängige Aktivierungsweisen beschrieben. Hier führt Wachstumsfaktorsignaling in Abwesenheit von Estrogen zur Aktivierung und möglicherweise Phosphorylierung zur Aktivierung von ER oder Rezeptorkoregulatoren (45).

1.2.4. Hormonrezeptorantagonisten und Hormonrezeptormodulatoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind Cetorelix (freundlicher Weise von Bayer-Schering Pharma AG zur Verfügung gestellt), ein Gonadotropin-Releasing-Hormon-Antagonist, Tamoxifen, ein selektiver Estrogenrezeptormodulator und Androkur® (Schering), dessen Wirkstoff Cyproteronacetat die Testosteronrezeptoren antagonisiert.

Cetorelix(acetat) ist ein synthetisches Dekapeptid, das zur Therapie von hormonsensitiven Tumoren in Prostata und Brust sowie einiger gynäkologischer Erkrankungen wie Endometriose verwendet wird. Außerdem wird es zur kontrollierten OVAriellen Hyperstimulation der Frau hinzugezogen. Cetorelix hemmt die GnRH I Rezeptoren der Hypophyse kompetitiv und verhindert so die Produktion von FSH und LH (46).

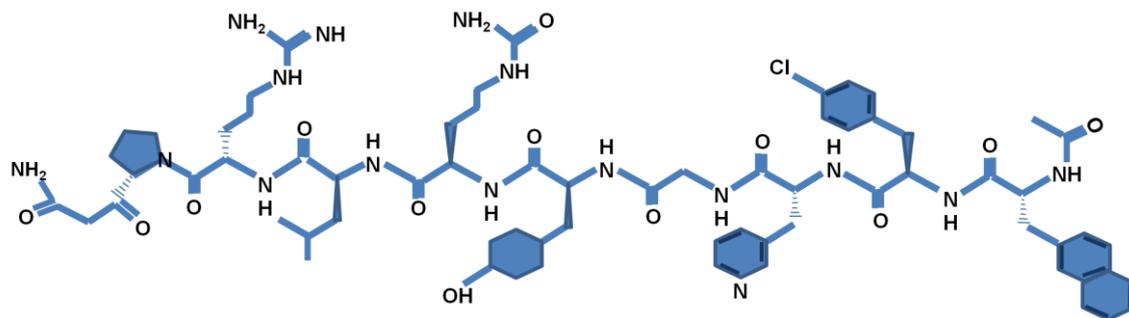


Abb. 6: Strukturformel von Cetrorelix (Acetyl-D-3-(2'-naphthyl)-alanine- D-4-chlorophenylalanine-D-3-(3'-pyridyl)- alanine-L-serine-L-tyrosine-D-citru-line-L- leucine-L- arginine-L-proline-D- alanine-amide)

Tamoxifen ist ein synthetischer nicht-steroidaler Estrogenrezeptormodulator, der hauptsächlich zur Therapie von ER-positiven Brusttumoren eingesetzt wird. Tamoxifen besitzt je nach Gewebe antagonistische sowie agonistische Wirkungen. So ist bekannt, dass Tamoxifen die Entstehung von Tumoren des Endometriums begünstigt, weil es an den Estrogenrezeptoren des Endometriums als Agonist wirkt. Die Beteiligung von ER β an diesen unerwünschten Nebenwirkungen wird als gering eingeschätzt (42).

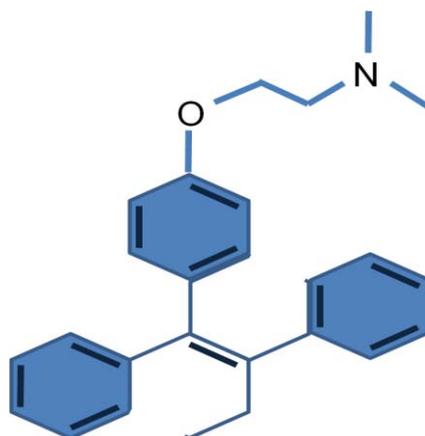


Abb. 7: Strukturformel von Tamoxifen (Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethyl-ethanamine

Cyproteronacetat (Androkur®, Schering) ist ein Derivat des 17 α -Hydroxyprogesteron (Pregnan), das als Depotpräparat zur Triebdämpfung bei Sexualdeviationen des Mannes sowie zur palliativen Therapie des inoperablen Prostatakarzinoms verwendet wird. In oralen Kombinationspräparaten auch zur Zyklusregulierung und Aknebehandlung verwendet.

Das Antiandrogen hat zusätzlich gestagene und zentrale antigonadotrope Wirkungen, es hemmt die Wirkung von Androgenen an androgenabhängigen Zielorganen (47).

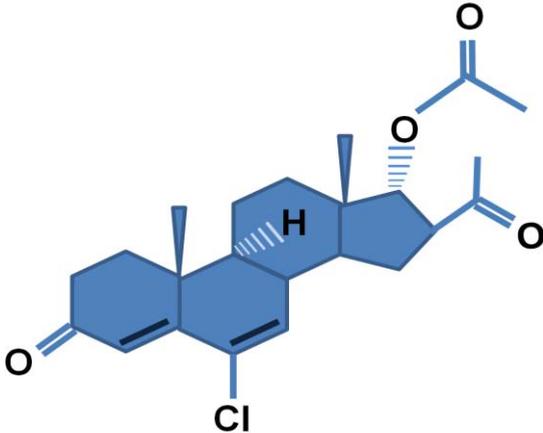


Abb. 8: Strukturformel von Cyproteronacetat

1.3. Die Atopische Dermatitis

1.3.1. Atopie

Der Begriff „Atopie“ kommt aus dem Griechischen (*Atopos* = fehl am Platz) und wird für die genetische Prädisposition für Allergensensibilisierung und der damit einhergehenden IgE-Produktion gebraucht.

Es werden zwei Formen der Atopischen Dermatitis (AD) unterschieden: Die intrinsische Form der AD, die durch die fehlende IgE-vermittelte Sensibilisierung gekennzeichnet ist. An dieser AD leiden etwa 20-30% der Patienten.

Die Mehrzahl der Patienten leidet unter der „extrinsischen Form“, einhergehend mit der IgE-vermittelten Sensibilisierung und T_H2-Zytokintitern (v.a. IL-4 und IL-13) (48).

1.3.2. Epidemiologie

Die Ekzemprävalenz bei Kindern liegt bei 10-20%, bei Erwachsenen bei 1-3% (49). In den letzten 6 Jahrzehnten stieg die Anzahl der Erkrankten in den Industriestaaten erheblich, in Skandinavien hat sie sich gar verzwanzigfacht (50). 80% der Erkrankten leiden an einer milden Form des Ekzems (51), bei den meisten von ihnen geht die Krankheitssymptomatik nach Eintritt ins Erwachsenenalter zurück. Häufig treten in den Familien der Betroffenen andere allergische Erkrankungen auf, was eine genetische Komponente der Entstehung vermuten lässt. Auch die Tatsache, dass bei betroffenen eineiigen Zwillingen in 80% der Fälle beide Zwillinge betroffen sind, wären dies nur bei 20% der zweieiigen Zwillinge der Fall ist (52). Söderhäll et al. beschreiben eine neue Variante eines Kollagengenes, welches auf dem Chromosom 3q21 lokalisiert ist. Das Gen COL29A1 kodiert für ein neues Kollagen, welches bei AD-Patienten in der Epidermis nicht exprimiert wird (53), aber vermutlich für epidermale Integrität und Funktionstüchtigkeit verantwortlich ist.

1.3.3. Klinik

Häufige Symptome der Atopischen Dermatitis sind Rötung, trockene Haut, Juckreiz. Oft treten die Symptome in Schüben auf, ohne dass ein direkter Auslöser zu erkennen ist. Im Fall der allergischen Kontaktdermatitis ist zwar ein Auslöser vorhanden, die Symptomatik ist von der Schubsymptomatik jedoch nur schwer zu unterscheiden.

Die Haut gliedert sich anatomisch in Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, bestehend aus Keratinozyten (90%), Melanozyten und

Langerhanszellen. Sie besteht aus Stratum spinosum, das Schichten großer Keratinozyten und Langerhanszellen beherbergt und Stratum basale, wo eine Schicht mitoseaktiver Zellen auf einer Basalmembran liegt.

Die Dermis besteht aus kollagenen und elastischen Fasern, Mukopolysacchariden und zellulärem Bindegewebe. Es wird von Blut- und Lymphgefäßen versorgt und ist innerviert. In der Dermis existieren Mastzellen und Dendritische Zellen. Die Dermis ist in Stratum papillare und Stratum reticulare unterteilt.

Die Subkutis besteht aus Fettzellen und Bindegewebe (54).

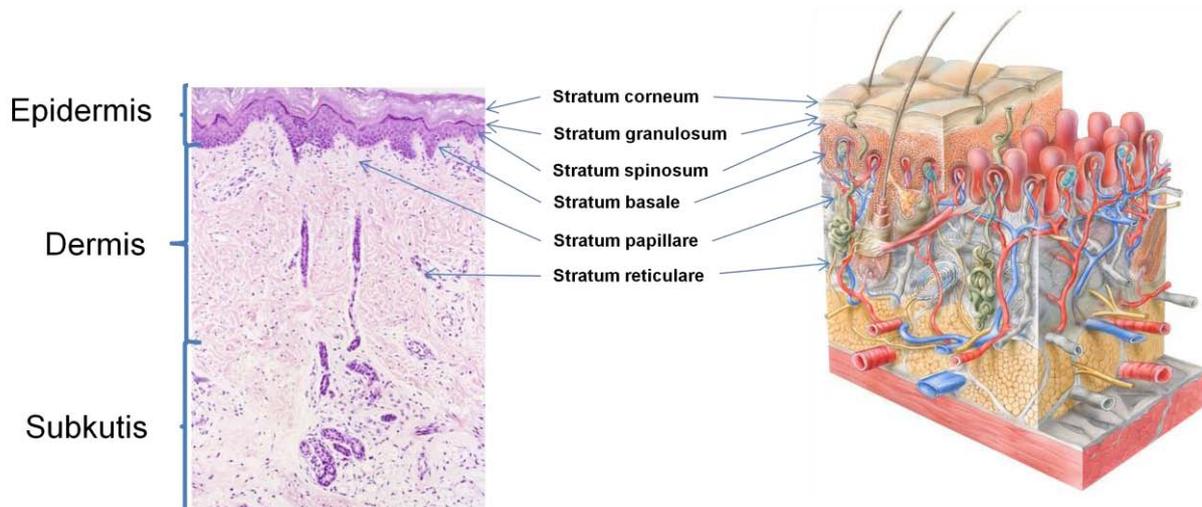


Abb. 9: Die Hautschichten

Durch die gesteigerte IgE-Synthese der extrinsischen AD-Patienten befinden sich sehr viele IgE-beladene Mastzellen, Langerhanszellen und Dendritische Zellen in der Haut. Dies führt zu erleichtertem Antigenkontakt und die darauf folgende Antigenpräsentation in den örtlichen Lymphknoten zur klonalen Expansion von T_H2 -Zellen.

Mechanische Reizung der betroffenen Hautstellen beispielsweise durch Kratzen, aktiviert Keratinozyten, die daraufhin proinflammatorische Zytokine sezernieren. Deshalb ist die akute Phase der Atopischen Dermatitis durch entzündete Hautpartien und daraus resultierendem Pruritus, Papeln, Verkrustung und Exsudation charakterisiert.

Die chronische AD ist gekennzeichnet durch Infiltration des Gewebes durch T-Zellen und Makrophagen, vermehrten IgE-beladenen Langerhanszellen und dendritischer Zellen. Zudem hat sich die Immunantwort in Richtung T_H1 verschoben, was zur Präsenz von IL-5, GM-CSF, IL-12 und IFN mRNA exprimierenden Zellen in der Haut führt (48).

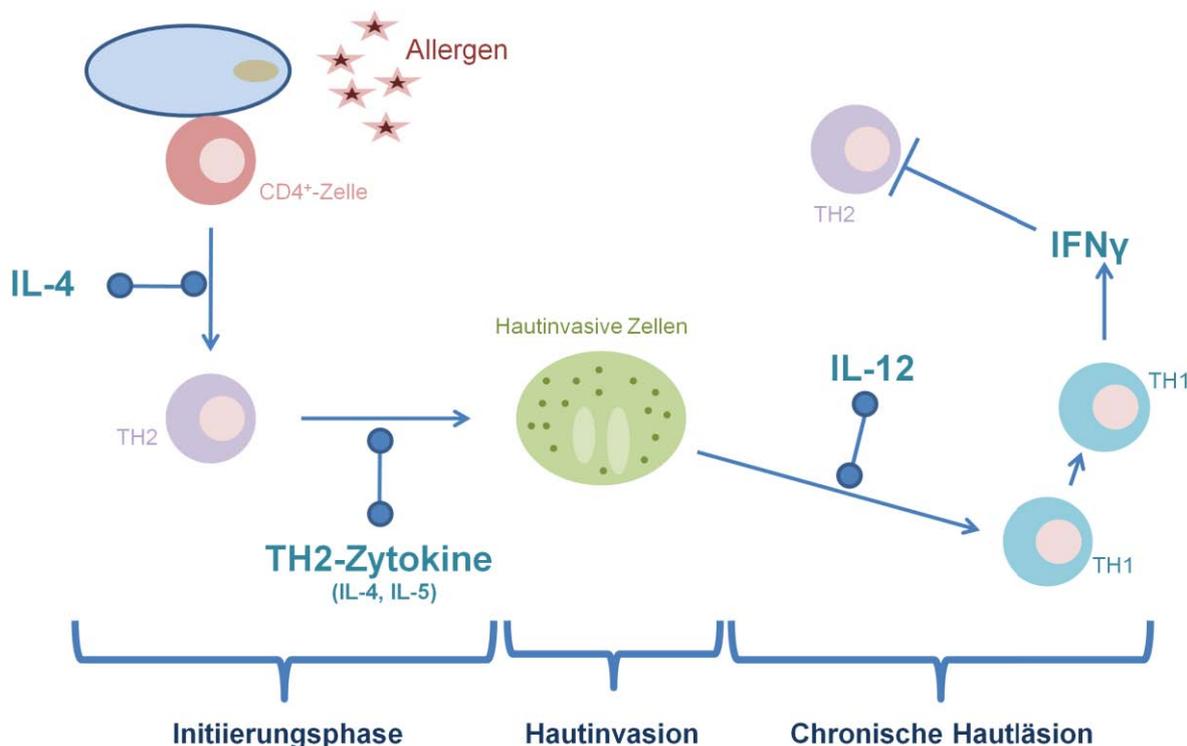


Abb. 10: Sequentielle Aktivierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen im Verlauf der atopischen Dermatitis

Während der Initiierungsphase kommt es nach dem Kontakt mit einem Allergen zur Entwicklung T_H2 -Zellen, die IL-4, IL-13 und IL-5 produzieren. Dadurch invasieren unterschiedliche Zellen, die vornehmlich IL-12 exprimieren, in die Haut. IL-12 induziert nun die Bildung von IL-12, wodurch ein Wechsel zu einem T_H1 -Phänotyp induziert wird. Diese T_H1 -Zellen exprimieren IFN- γ , die zum einen T_H2 -Zellen inhibieren und zum anderen die Bildung des chronischen Ekzems induzieren und aufrechterhalten.

1.3.4. Atopische Dermatitis und Geschlecht

Bei Mädchen ist die Ekzempprävalenz deutlich höher als bei Jungen und steigt mit fortschreitendem Alter sogar weiter an (19). Es wurde nachgewiesen, dass die Hautreaktion auf Pricktests während des Menstruationszyklus variiert, in Luteal- und Follikelphase ist sie am deutlichsten ausgeprägt (20).

Bei der allergischen Kontaktdermatitis, bei der die T_H1 -Antwort überwiegt, sind die Symptome während der Follikelphase stärker als während der Lutealphase (55). Zudem wurde die Kontaktallergie als Nebenwirkung von Estradioltherapie beobachtet (56-59). Aus Mausexperimenten ist bekannt, dass Estradiol die Produktion des für die chronische AD und Kontaktallergie bedeutsamen IFN- γ verstärkt (60, 61). Es wurde zusätzlich ein genetischer Effekt diskutiert, denn in einem Lupus erythematoses Mausmodell (MRL-Maus) waren die Symptome unter Estradioleinfluss vermindert (62, 63). Die IFN- γ - sowie die IL-4-Genexpression ist nach Allergenprovokation in der Haut intakter weiblicher BALB/c-Mäuse deutlich erhöht, verglichen mit der Haut ovariectomierter Mäuse (64).

2. Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Östrogen und Testosteron auf die allergische Immunantwort genauer zu untersuchen, sowohl durch die Messung der humoralen Immunantwort gonadektomierter und intakter männlicher und weiblicher Mäuse, als auch nach pharmakologischer Behandlung der Tiere mit Rezeptorantagonisten und –modulatoren. Letzteres sollte sowohl auf humoraler Ebene im Mausmodell als auch auf lokaler Ebene im Atopischen Dermatitis Modell der Maus untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software, Chemikalien und Reagenzien sowie Antikörper, Puffer und Lösungen die für diese Arbeit verwendet wurden, finden sich im Anhang A.2. – A.7.

3.2. Versuchstiere

Für alle drei Versuchsteile wurden Mäuse der Inzuchtlinie BALB/c verwendet.

Die 41 Tiere des ersten Versuchsteils wurden über Charles River France bezogen. 11 weibliche Tiere und 10 männliche Tiere wurden im Alter von 4 Wochen gonadektomiert.

60 weitere Tiere für die weiteren Versuchsteile wurden über Harlan Winkelmann Deutschland bezogen. Im Alter von 12 Wochen wurden sie in den Versuch genommen.

3.3. Tierhaltung

Die Tiere wurden unter spezifisch pathogen freien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20-22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus in Gruppen à fünf Tieren in Polykarbonatkäfigen gehalten. Futter (ssniff, low phytoestrogens) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.4. Mausmodelle

3.4.1. Erster Versuchsteil:

12 Wochen alte weibliche, weibliche Ovarrektomierte, männliche sowie männliche orchektomierte BALB/c Mäuse wurden an Tag 1, 14, 21 mit 10µg OVA/alum in PBS i.p. sensibilisiert. OVA (0,2µg/µl, Albumin from chicken egg white Grade V, Sigma) wird 1:2 in Alum (Imject Alum, Pierce) emulgiert, pro Maus wird schließlich ein Volumen von 100µl (= 10µg OVA) mit einer Einmalkanüle (0,45x25mm, 26Gx1“, Sterican 100, B Braun) und aufgesetzter Spritze (1ml, BD) injiziert.

An Tag 1 und 14 wurde durch einen Skalpelleinschnitt in die Schwanzvene Blut entnommen.

An Tag 36 erhielten die Tiere eine Ketamin (DeltaSelect)/Xylazin (Rompun®, Bayer) (in 0,9% Natriumchloridlösung, 3/1/6) Injektionsnarkose (10µl/g KG) und wurden nach retrobulbärer Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet.

Im Anschluss wurde die Milz entnommen.

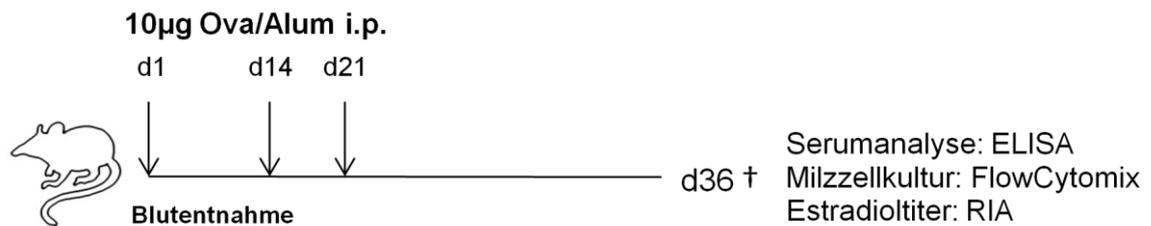


Abb. 11: Versuchsprotokoll des ersten Versuchsteils.

3.4.2. Zweiter Versuchsteil:

11 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden in vier Gruppen à 10 Tiere eingeteilt. Gruppe 1 wurde ab Tag -7 täglich 250µg (in 100µl 0,9% NaCl gelöst) subkutan injiziert. Gruppe 2 wurde an Tag -7 ein Slow Release Tamoxifen Pellet (3mm, 90-day-release, Innovative Research of America, Sarasota, USA) mit Hilfe eines Precision Trochar (MP-182, 10 Gauge, Innovative Research of America, Sarasota, USA) an die seitliche Brustwand subkutan implantiert. Gruppe 3 wurde ab Tag 1 alle 10 Tage ein Cyproteronacetat Depotpräparat (Androkur®, Bayer-Schering Pharma AG, Berlin) intramuskulär injiziert.

An Tag 1, 14 und 21 wurden die Tiere wie oben OVA-sensibilisiert.

An Tag 1 und 21 wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen. An Tag 35 wurde allen Tieren zur Auslösung der lokalen Immunantwort 5µg Ovalbumin (in 20µl PBS) in die Ohrhaut gespritzt (Ear Swelling).

An Tag 36 erhielten die Tiere eine Ketamin (DeltaSelect) / Xylazin (Rompun®, Bayer) (in 0,9% Natriumchloridlösung, 3/1/6) Injektionsnarkose (10µl/g KG) und wurden nach retrobulbärer Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet.

Im Anschluss wurde die Milz entnommen und beide Ohren abgenommen.

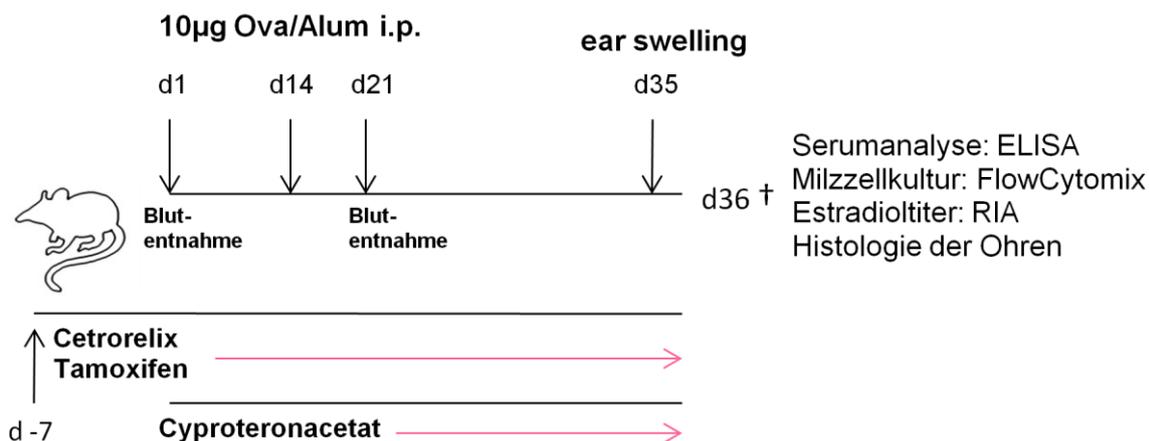


Abb. 12: Versuchsprotokoll des zweiten Versuchsteils

3.4.3. Dritter Versuchsteil

11 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden in zwei Gruppen à 10 Tiere eingeteilt. Den Tieren der Gruppe 1 wurde an Tag -7 einen Slow-Release Tamoxifen Pellet implantiert.

An Tag 1 und 14 wurden alle Tiere OVA-sensibilisiert.

Um die lokale Immunantwort auszulösen wurde dreimal 10 0µg Allergen für jeweils eine Woche epikutan appliziert.

An Tag 63 erhielten die Tiere eine Ketamin (DeltaSelect) / Xylazin (Rompun®, Bayer) (in 0,9% Natriumchloridlösung, 3/ 1/6) Injektionsnarkose (10µl/g KG) und wurden nach retrobulbärer Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet.

Im Anschluss wurde die Bauchhaut der Tiere fotografiert, Hautbiopsien und Milz entnommen.

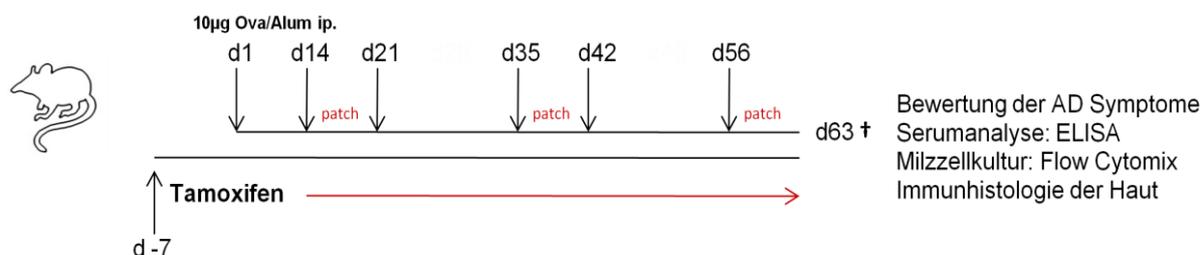


Abb. 13: Versuchsprotokoll des dritten Versuchsteils

3.5. Bestimmung der lokalen Immunantwort mittels Hauttest

An Tag 35 wurde allen Tieren zur Auslösung der lokalen Immunantwort 5µg OVAAlbumin (in 20µl PBS) intradermal in das rechte Ohr gespritzt, zur Kontrolle wurde dasselbe Volumen PBS in die linke Ohrhaut gespritzt. Die Dicke der Ohren wurde vor Injektion sowie eine, zwei, vier, sechs und 24 Stunden nach der Injektion mit einem Handmessgerät (Mitutoyo,

Japan) erfasst. Die Tiere wurden für alle Schritte kurz mit einer Isofluran Inhalationsnarkose (Forene®, Abbott) anästhesiert.

3.6. Bestimmung der Serumstradiolgehalte mittels Radioimmunosorbent Assay

Die Durchführung des Tests übernahm freundlicherweise Prof. Dr. W. Rohde vom Institut für experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin. Der D SL-4800 E stradiol-Kit (Beckman Coulter, Diagnostic Systems Laboratory, Webster, TX, USA) wurde entsprechend der Herstellerempfehlung durchgeführt, die Volumina der Reagenzien wurden an die geringeren Serummengen aus den Verlaufsblutproben angepasst (1/4).

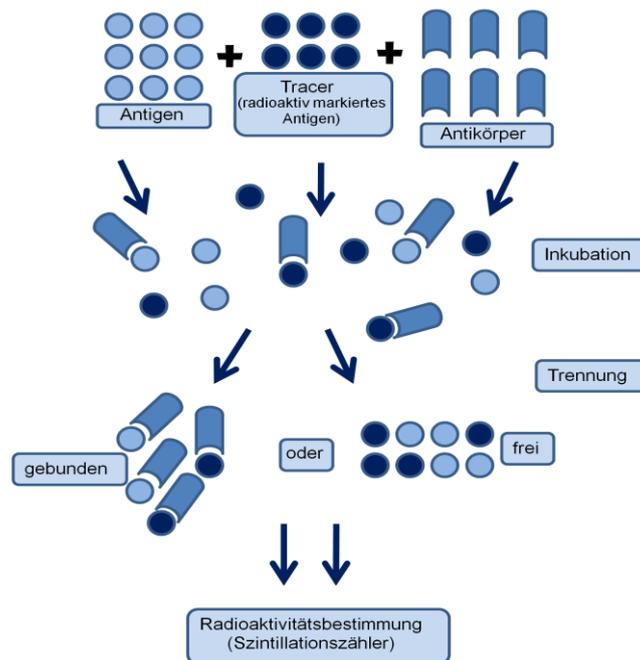


Abb. 14: Prinzip des RIA

3.7. Antikörperbestimmung mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die Blutproben wurden bei 3200g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Immunglobulingehalte wurden durch Sandwich-ELISA bestimmt.

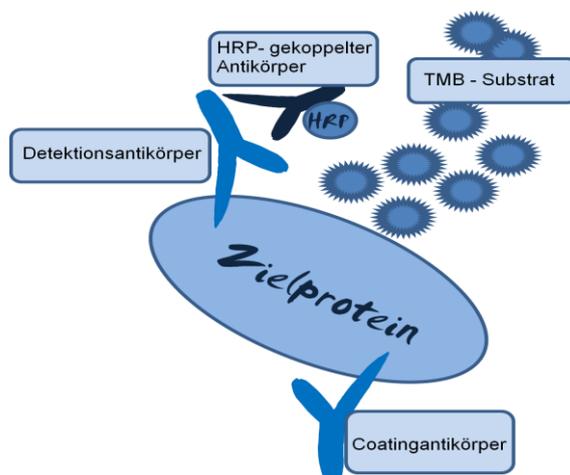


Abb. 15: Prinzip des Sandwich-ELISA

Coating:

Für den Sandwich-ELISA wurde zunächst eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc) mit dem spezifischen Antikörper oder dem spezifischen Protein, gelöst in Natriumcarbonatpuffer, beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Vertiefungen nur mit Natriumcarbonatpuffer dienten als Blank, der später von den OD-Werten abgezogen wird, um unspezifische Bindungen aus den anschließenden Titerberechnungen auszuschließen. Weitere Kontrollen waren K1 = ohne Serum, K2 = ohne Detektionsantikörper, K3 = ohne Streptavidin-HRP. Zwischen allen Schritten wird mittels ELISA-Washer und PBST dreimal gewaschen.

Blocken:

Die Vertiefungen wurden 2 Stunden mit 3% Milchpulver bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen des Coatingantikörpers zu verhindern.

Auftragen der Proben:

Der Standard und die Proben wurden in die Vertiefungen der ersten Reihe pipettiert. Anschließend wurden Standard und Proben von Reihe 1 bis Reihe 8 verdünnt und bei Raumtemperatur für 3 Stunden (OVA-spezifischer IgE/IgG1-ELISA) oder über Nacht bei 4°C inkubiert (total-IgE).

Detektion:

Der Detektionsantikörper wurde in 1% Milch oder 1% BSA verdünnt und eine Stunde bei 4°C sowie 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Detektionsantikörper ist biotinyliert und bindet im nächsten Schritt Streptavidin, welches mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist (Streptavidin-HRP, R&D, 1:1000 in PBS, 100µl pro Vertiefung).

Substratreaktion:

Für die Entwicklung wurde eine Tablette TMB in 10ml TMB-Puffer gelöst und 4µl Wasserstoffperoxid dazugegeben. Davon wurden 100µl in jede Vertiefung pipettiert. Während der Inkubationszeit von 10-20 Minuten setzt die Meerrettichperoxidase die farblose Substratlösung mit 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin in ein blaues Endprodukt um.

Die Reaktion wurde schließlich mit 50µl 12,5% Schwefelsäure abgestoppt, und die optische Dichte des Endprodukts spektrophotometrisch bei 450nm gemessen. Die optische Dichte ist zur Konzentration der im Serum enthaltenen Antikörper proportional und anhand der Standardkurve wurden die jeweiligen Antikörperkonzentrationen errechnet.

3.8. Milzzellkultur und Stimulation

3.8.1. Milzzellaufreinigung

Alle Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen der Milzzellkultur zu vermeiden.

Die Milz wurde durch ein Zellsieb (BD Falcon) mit 100µm Netzweite in PBS/EDTA gedrückt und schließlich durch ein 50µm Netzweite Zellsieb in ein 50ml Falcon gegeben. Dieses wurde auf 50ml mit PBS/EDTA aufgefüllt und bei 340g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert.

Im Anschluss wurden die sedimentierten Zellen in 2,5ml 1xRBC-lysis buffer (eBioscience) resuspendiert und 4-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Falcon wird mit PBS/EDTA auf 50ml aufgefüllt und erneut bei 340g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert, im Anschluss daran wurde das Zellsediment in 20ml PBS/EDTA resuspendiert.

Für die Zellzählung mittels CASY 1 wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1000 in 10ml Casytone-Lösung (CASY) verdünnt. Es wurde in drei Messzyklen à 400µl gemessen.

Währenddessen wurde die Zellsuspension erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und schließlich durch Zugabe von Medium auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.8.2. Milzzellkultur

Für die Stimulation mit PMA/Iono wurden 2×10^6 Zellen (= 1000µl Zellsuspension) mit 40ng PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, SIGMA) und 4×10^{-10} mol Ionomycin (Iono, A23187, Calbiochem) in einer 24-well Platte (Nunc) inkubiert. Als Kontrolle wurde für jedes Tier eine

unstimulierte Probe mit 2×10^6 Zellen und 1000 μ l Medium inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Im Anschluss wurde die Platte bei 1400rpm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände wurden abgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Stimulation mit OVA/ α CD28 wurden 2×10^6 Zellen (= 1000 μ l Zellsuspension) mit 500 μ g OVA und 10 μ g α CD28 (Klon 37.51 DRFZ) sowie eine unstimulierte Kontrolle jeden Tieres in einer 24-well Platte (Nunc) unter oben genannten Bedingungen 4 Tage inkubiert, anschließend wie oben zentrifugiert und die Überstände abgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.8.3. Zytokinbestimmung mittels Flow Cytometry Based Fluorescent Bead Immunoassay

Die in den Überständen der stimulierten Zellkulturen enthaltenen Zytokine wurden mittels Flow Cytometry Based Fluorescent Bead Immunoassay (BMS820FF mouse T_H1/T_H2 10plex, Bendermed Systems) bestimmt. Es wurden nach Anleitung des Herstellers die in 25 μ l enthaltenen Konzentrationen der Zytokine IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF α , GM-CSF, IL-4 und IL-17 gemessen.

3.9. Klinische Ausprägung der Atopischen Dermatitis

Die Bilder, die von der Haut gemacht wurden, wurden von drei verschiedenen Personen beurteilt. Hierbei wurde ein SkinScore verwendet. Dieser bezieht 5 Faktoren ein: Erythem, Ödem/Papeln, Abschürfungen, Trockenheit und Ausdehnung. Die 5 Faktoren wurden jeweils nach Schweregrad von 0 (keine Symptome) über 1 (milde Symptome), 2 (mittelschwere Symptome) und 3 (schwere Symptome) beurteilt. Schließlich wurde aus den Summen der vergebenen Schweregrade der 3 Beurteilenden Personen ein Durchschnitt gebildet.

Das Minimum des SkinScores konnte demnach 0 (= keine Hautläsion) und das Maximum 15 (schwere Hautläsionen) sein.

3.10. Histologie

3.10.1. Einbetten und Schneiden der Hautbiopsien

Es wurden mit Hilfe einer Hautstanze (Biopsy Punch, micron) Hautbiopsien mit dem Durchmesser 5mm genommen und in mit Einbettmedium (Jung) gefüllte Vinyleinbetttschalen

(Tissue Tek, Sakura). Die Einbettschale wurde langsam durch flüssigen Stickstoff eingefroren und später bei -80°C aufbewahrt.

Die Hautschnitte wurden mit einem Kryostaten bei -30°C geschnitten. Die Schnitte sind $5\mu\text{m}$ dick und wurden zum Trocknen zunächst auf eine Wärmeplatte (40°C) gelegt, um dann bei -80°C aufbewahrt zu werden.

3.10.2. Färbung der CD4^+ und CD8^+ Zellen

Zunächst wurde das Gewebe 20 Minuten mit 5% Ziegen Serum in TBS geblockt. Zusätzlich wurde ein Avidin/Biotin Kombinationskit (Dako) entsprechend der Herstellerangaben benutzt. Die Flüssigkeiten wurden ohne zu Waschen entfernt und der erste Antikörper, 1:30 verdünnt in Dako REALTM Antikörperlösung (Dako) wurde auf die Gewebeschnitte gegeben und 1 Stunde lang inkubiert.

Für die CD4^+ -Färbung wurde anti-mouse CD4 (L3/T4) (Klon RM4-5, $31.25\mu\text{g/ml}$, BD Pharmingen) als erster Antikörper benutzt, für die CD8^+ -Färbung anti-mouse CD8a (Klon 53-6.7, $31.25\mu\text{g/ml}$ BD Pharmingen).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Antikörper mit TBS (BIOCYT) vom Gewebe gewaschen und der 2. Antikörper (anti-rat Ig-biotin, polyklonal, $0,5\text{mg/ml}$, BD Pharmingen, 1:200 in Dako REALTM) wurde auf das Gewebe gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Entwicklung der immunhistochemischen Färbung wurde das Dako REAL Detection System Alkalische Phosphatase/RED (Dako) benutzt und nach Herstellerangaben vorgegangen.

Anschließend wurde mit Hämatoxylin-Eosin gegen gefärbt. Hierbei werden die in der Haut befindlichen Zellkerne mit Papanicolaou Lösung (Merck, 1:2 in destilliertem Wasser) 40 Sekunden lang gefärbt, wobei Hämatein und Alaunsalze mit den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren im Zellkern Chelatkomplexe bilden.

Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit Leitungswasser gewaschen. Durch den leicht sauren pH-Wert des Wassers erhält das Gewebe schließlich seine blau-violette Farbe. Im Anschluss daran wurden Zytoplasma, Kollagen und Muskelgewebe mit Eosin (Eosin-Phloxim-Lösung, Dr. K. Hollborn & Söhne) 30 Sekunden lang gefärbt und im Anschluss daran zweimal 5 Minuten gewaschen.

3.10.3. Messung der Epidermisdicke

Die Epidermisdicke wurde mit Hilfe des „Axio Vision“-Programms gemessen. In die Messung wurden Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale mit einbezogen.

Pro Schnitt wurden 10-20 verschiedene Messungen durchgeführt und der Durchschnitt aus den Werten gebildet.

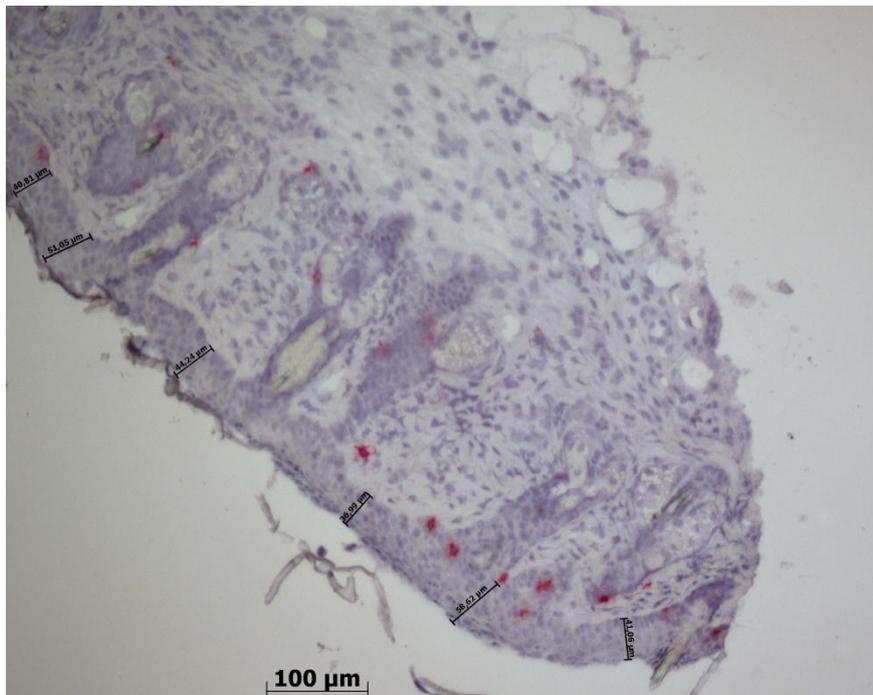


Abb. 16: Messung der Epidermisdicke an einem Ausschnitt aus einem $CD4^+$ -gefärbten histologischen Schnitt einer Maus aus der Kontrollgruppe.

3.11. Mastzellfärbung

Die Mastzellen wurden mit 0,1% Toluidinblau (Merck) in 0,5 N HCl eine Stunde lang inkubiert und anschließend zwei Minuten lang mit Leitungswasser gewaschen. Der Glykosamingehalt der Mastzellgranula sorgt für das metachromatische Färbeverhalten von Mastzellen.

3.12. Quantitative Bestimmung der Zellinfiltrate

Die quantitative Bestimmung der $CD4^+$ -, $CD8^+$ - und Mastzellen erfolgte mittels Bildausschnitten definierter Größe ($100\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$), die wie eine Schablone auf Bilder der 100-fach vergrößerten Schnitte aufgelegt wurden. Alle Schritte wurden mit Hilfe des „Axio Vision“-Programmes durchgeführt.

Die Schablone wurde pro Bildausschnitt drei Mal der Länge nach an die Epidermis-Dermis-Grenze gelegt. Es wurden je Maus drei Bildausschnitte ausgewertet und der Durchschnitt der Zellzahlen ermittelt.

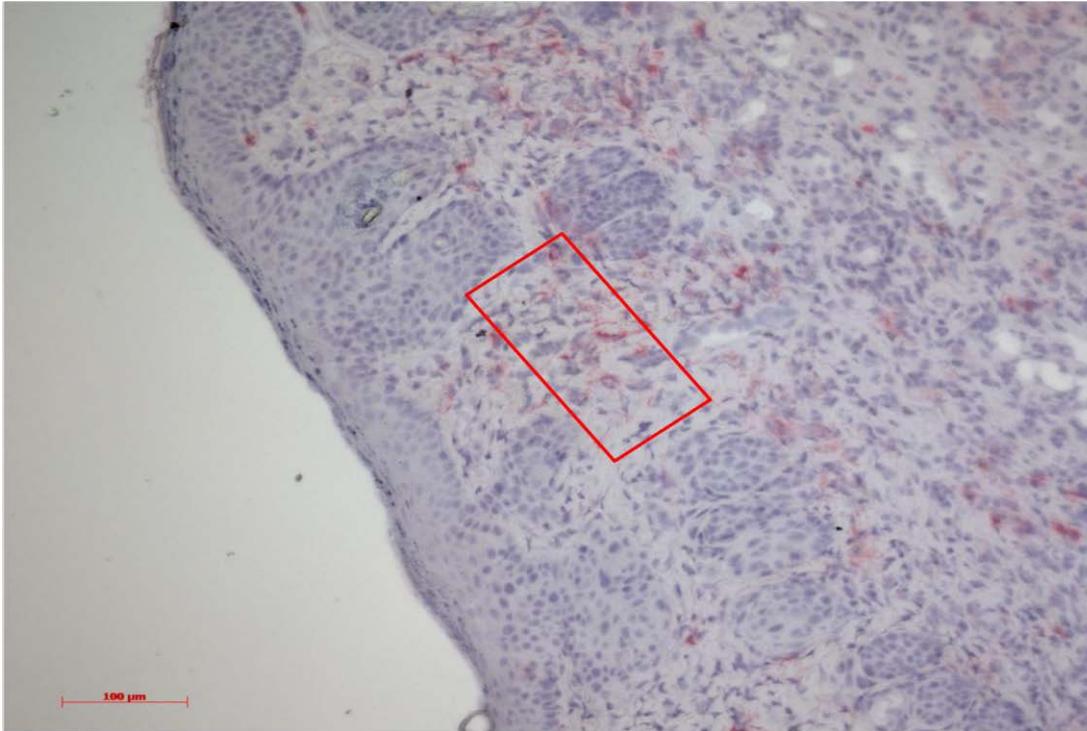


Abb. 17: *Quantitative Bestimmung der Zellinfiltrate mit Hilfe von 100μm x 200μm großen Ausschnitten. Dargestellt ist eine CD8⁺-Färbung eines histologischen Schnitts der Haut einer mit Tamoxifen behandelten Maus.*

3.13. Statistik

Die Darstellungen der Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel erstellt, für die statistische Analyse wurde SPSS 12.0G for Windows (SPSS inc.) verwendet.

Nicht-normalverteilte Daten unabhängiger Proben wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test überprüft, normalverteilte Daten mittels Student's T-Test.

$p < 0.05$ gilt als statistisch signifikant = *, $p < 0.01$ = **, $p < 0.001$ =***.

4. Ergebnisse

4.1. Hormonkompetente vs. hormoninkompetente Tiere

4.1.1. Humorale Immunantwort

Die Sensibilisierung des Immunsystems geht mit der Bildung antigenspezifischer Immunglobuline einher. Die Titer dieser Immunglobuline können als Maß für die Intensität der vorangegangenen Sensibilisierung heran gezogen werden.

Zur Quantifizierung der humoralen Immunantwort wurden die Immunglobulintiter in den Seren mittels ELISA untersucht. Gesamt-IgE, OVA-spezifisches IgE und OVA-spezifisches IgG₁ wurden als Endpunktanalyse an Tag 36 bestimmt.

Die Gesamt-IgE-Werte der hormoninkompetenten weiblichen Tiere waren am höchsten, gefolgt derer der weiblichen Tiere. Die Titer der männlichen Tiere waren am niedrigsten.

Das allergenspezifische OVA-IgE war bei den Weibchen am höchsten, gefolgt derer der hormoninkompetenten Weibchen. Die männlichen Tiere hatten erneut die niedrigsten Werte.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich für OVA-IgG₁, welches die Intensität des Immunglobulinklassenwechsels wider spiegelt. Signifikanzen wurden in keiner der oben genannten Analysen erreicht.

Das normalisierte OVA-IgE, welches den Anteil des allergenspezifischen OVA-IgE am Gesamt-IgE angibt, ist bei den weiblichen Tieren signifikant höher als bei den weiblichen ovariectomierten Tieren.

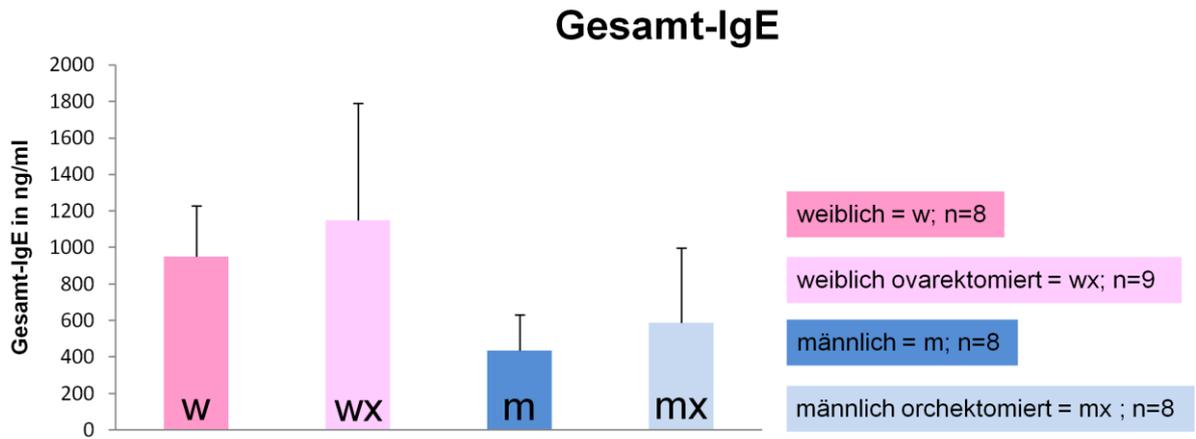


Abb. 18: Gesamt-IgE, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

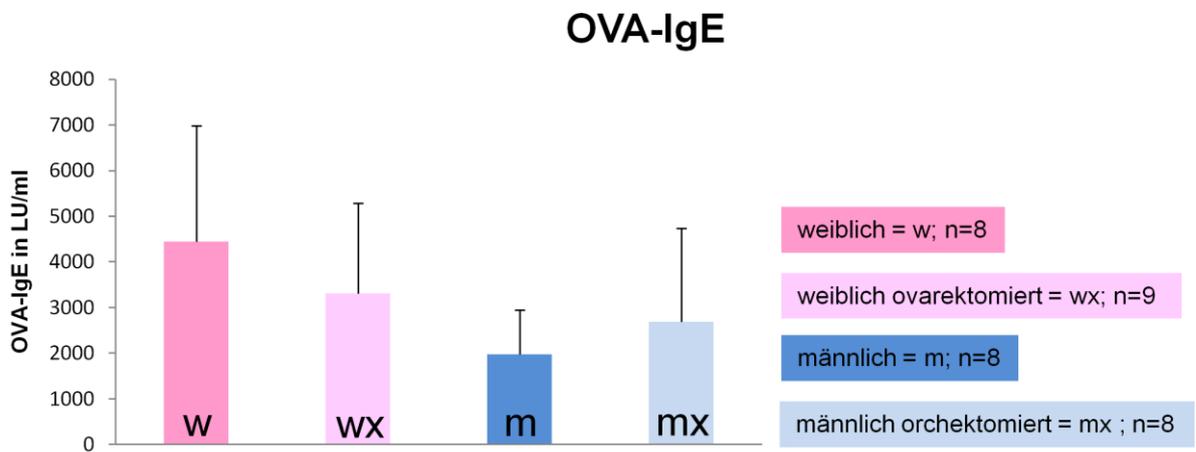


Abb. 19: OVA-IgE-Antworten, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

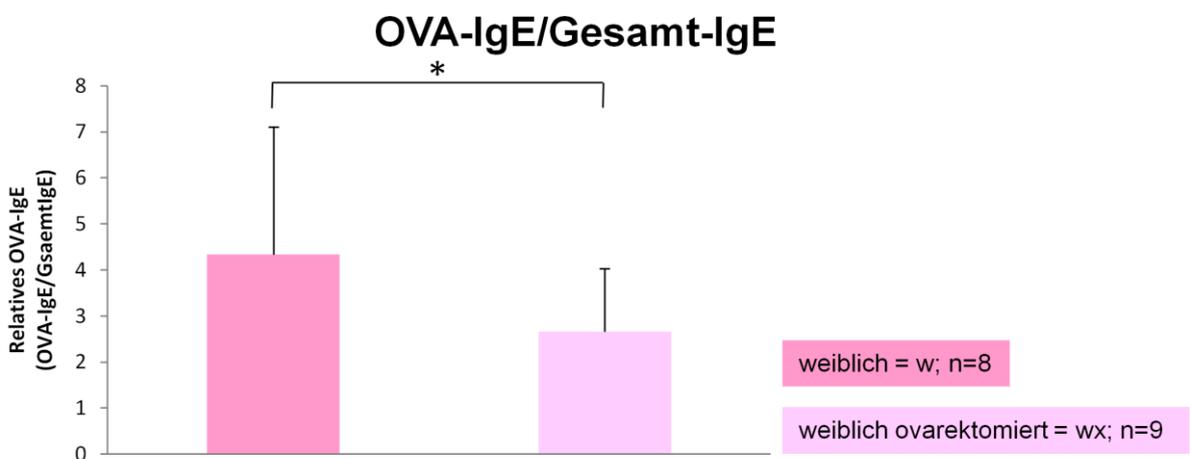


Abb. 20: Relatives OVA-IgE, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

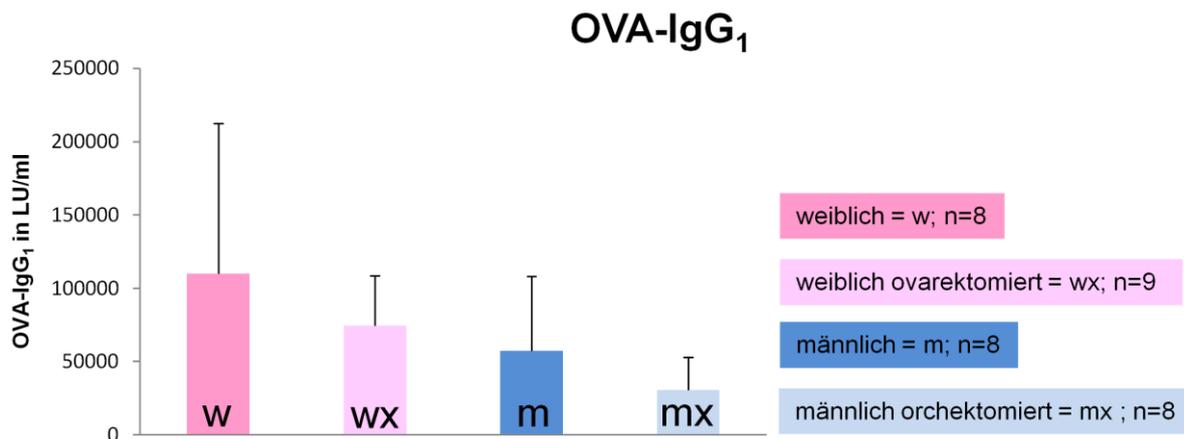


Abb. 21: OVA-IgG₁, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

4.1.2. Zytokinantwort

Die T-Zellantwort, hier die allergeninduzierte Produktion an Zytokinen wurde in-vitro mittels FlowCytomix (T_H1/T_H2 T enplex, BenderMedSystems) in den Milzzellüberständen quantifiziert. Die Milzzellkulturen wurden über 4 Tage mit OVA/αCD28 stimuliert. OVA/αCD28 stimuliert OVA-spezifische Zellen, αCD28 ist das kostimulatorische Signal zur Aktivierung spezifischer T-Zellen.

Die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 war bei den männlichen Tieren am geringsten. Die IL-4-Titer der weiblichen und der Ovarektomierten weiblichen Tiere waren mit einem p-Wert von <0.01 signifikant höher, die männlichen orchektomierten Tiere wiesen ebenfalls signifikant höhere Titer auf.

Auch die Produktion an IL-5 war bei den hormonkompetenten Weibchen signifikant höher als bei den hormonkompetenten Männchen (p<0.01), gefolgt von den ovarektomierten Weibchen und den orchektomierten Männchen, die p-Werte der beiden Gruppen war <0.05. Weniger deutlich ist das Bild IL-10 betreffend: Zwar wiesen auch hier die männlichen Tiere die niedrigsten Gehalte in den Milzzellüberständen auf, eine Signifikanz wird jedoch nicht erreicht. Die IL-10-Produktion in den Kulturen der hormoninkompetenten Weibchen war deutlich höher, die Werte der Weibchen und der hormoninkompetenten Männchen lagen etwas darunter, Signifikanzen wurden nicht erreicht.

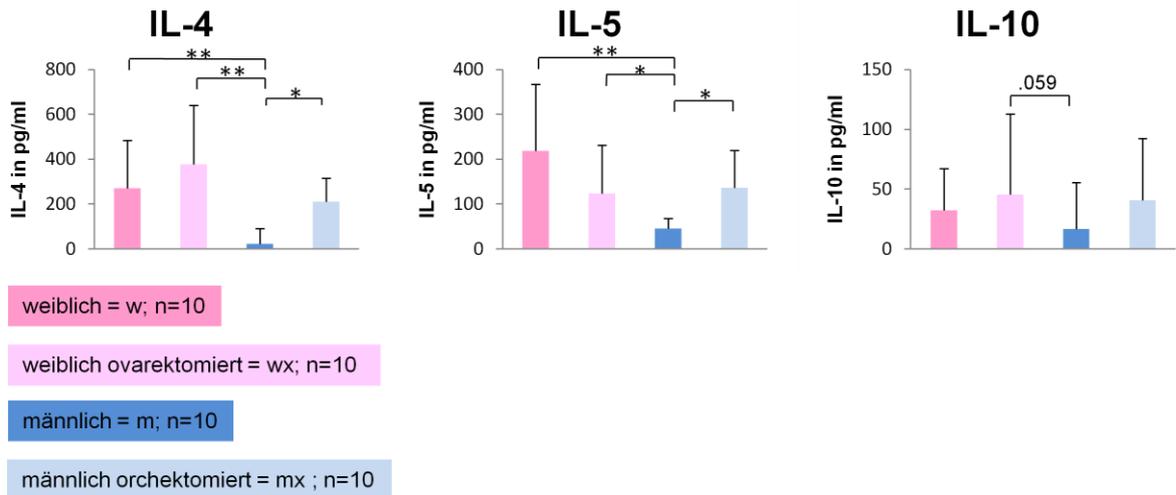


Abb. 22: T_H -2-Zytokinantworten, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

4.1.3. Estradiollevel

Das Serumestradiol wurde von Herrn Prof. Wolfgang Rohde im Institut für klinische Endokrinologie der Charité mittels Radioimmunoassay bestimmt. Die Seren stammten aus Verlaufspuren an den Tagen 1 und 21 sowie aus der Endpunktanalyse an Tag 36.

Die Estradiollevel der weiblichen Tiere lagen immer unter denen der ovarektomierten weiblichen Tiere, eine Signifikanz wird jedoch knapp verfehlt. Die männlichen Tiere wiesen insgesamt die niedrigsten Titer auf, die meist signifikant niedriger waren als die Titer der orchektomierten Männchen, oft lagen die Titer sogar unter dem Detektionslimit (2,0 pg/ml). Deren Serumestradioltiter lagen etwas über den Titern der weiblichen Tiere.

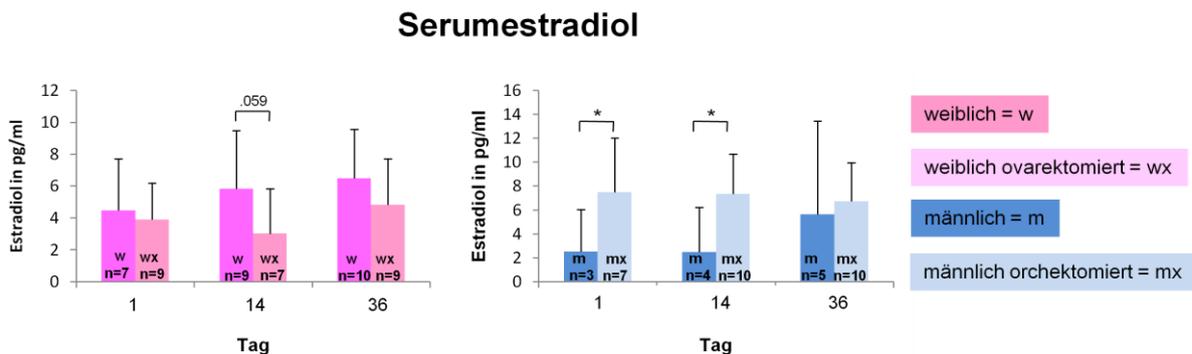


Abb. 23: Serumestradioltiter an Tag 1, 14 und 36. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

4.2. Behandelte Tiere

In diesem Teil der Arbeit wurden Hormonrezeptorantagonisten bzw. –modulatoren eingesetzt um zu untersuchen, inwiefern sich die humorale und lokale Immunantwort durch Beeinflussung der Geschlechtshormonwirkung verändert.

Die Serumimmunglobulintiter der Tiere wurden per ELISA quantifiziert. Es wurden Gesamt-IgE, OVA-IgE und OVA-IgG₁ an Tag 36 bestimmt.

Zur Quantifizierung der lokalen Immunantwort wurde an Tag 35 Ear Swelling durchgeführt.

4.2.1. Systemische Immunantwort

4.2.1.1. Humorale Immunantwort

Zur Quantifizierung der humoralen Immunantwort wurden die Immunglobulintiter in den Seren untersucht. Gesamt-IgE, OVA-spezifisches IgE und OVA-spezifisches IgG₁ wurden als Endpunktanalyse an Tag 36 bestimmt.

Die Gesamt-IgE-Werte der mit Tamoxifen behandelten Mäuse sowie der Mäuse der Cetorelixgruppe waren signifikant niedriger als die Werte der unbehandelten Kontrolltiere, wobei die Tamoxifengruppe insgesamt die niedrigsten Titer aufwies.

Auch die Werte der sehr inhomogenen Cyproteronacetatgruppe lagen mit ihrem Mittelwert unter den Werten der Kontrollgruppe.

Die Werte des allergenspezifischen OVA-IgE zeigen ein ähnliches Bild: Auch hier waren in der Gruppe der mit Tamoxifen behandelten Mäuse die niedrigsten, waren mit einem p-Wert von <0.01 sogar signifikant niedriger als die Titer der unbehandelten Kontrolltiere. Ebenfalls signifikant niedriger als die Werte der Kontrollgruppe waren die Werte der Cyproteronacetatgruppe, während die Werte der mit Cetorelix behandelten Tiere zwar unter den Werten der Kontrollgruppe lagen, jedoch wurde hier keine Signifikanz erreicht.

Am deutlichsten fiel das Ergebnis der Bestimmung des allergenspezifischen OVA-IgG₁ aus. Dieses auf die Intensität des Klassenwechsels hindeutende Immunglobulin war in der Gruppe der mit Tamoxifen behandelten Tiere mit 6055,4 LU/ml und einem p-Wert von <0.001 höchstsignifikant niedriger als die Werte der Cetorelixgruppe, die etwas unter denen der Kontrollgruppe lagen. Selbst im Vergleich zu den mit Cyproteronacetat behandelten Tieren waren die Werte der Tamoxifengruppe noch signifikant niedriger (p<0.01).

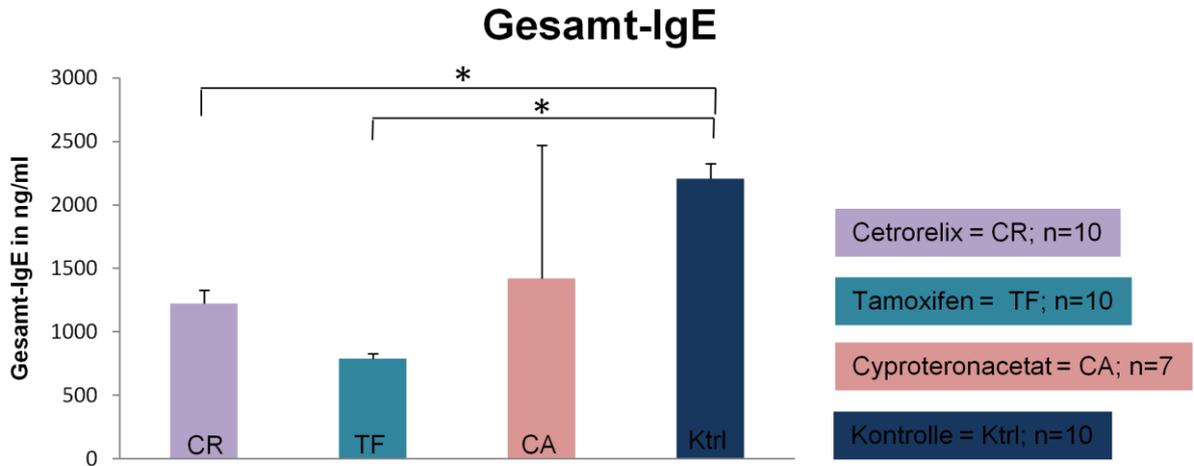


Abb. 24: Gesamt-IgE, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1, 14 und 21 intraperitoneal sensibilisiert und an Tag 35 intradermal geboostert. Sie wurden entweder mit Cetorelix (GnRH-Antagonist), mit Tamoxifen (Selektiver Estrogenrezeptormodulator) oder Cyproteronacetat (Testosteronantagonist) behandelt.

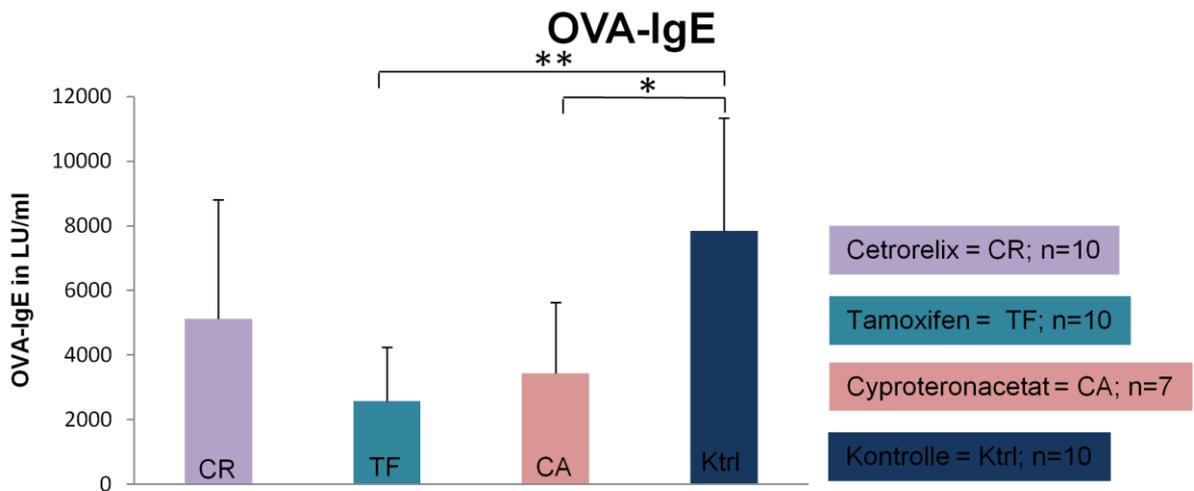


Abb. 25: OVA-IgE, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1, 14 und 21 intraperitoneal sensibilisiert und an Tag 35 intradermal geboostert. Sie wurden entweder mit Cetorelix (GnRH-Antagonist), mit Tamoxifen (Selektiver Estrogenrezeptormodulator) oder Cyproteronacetat (Testosteronantagonist) behandelt.

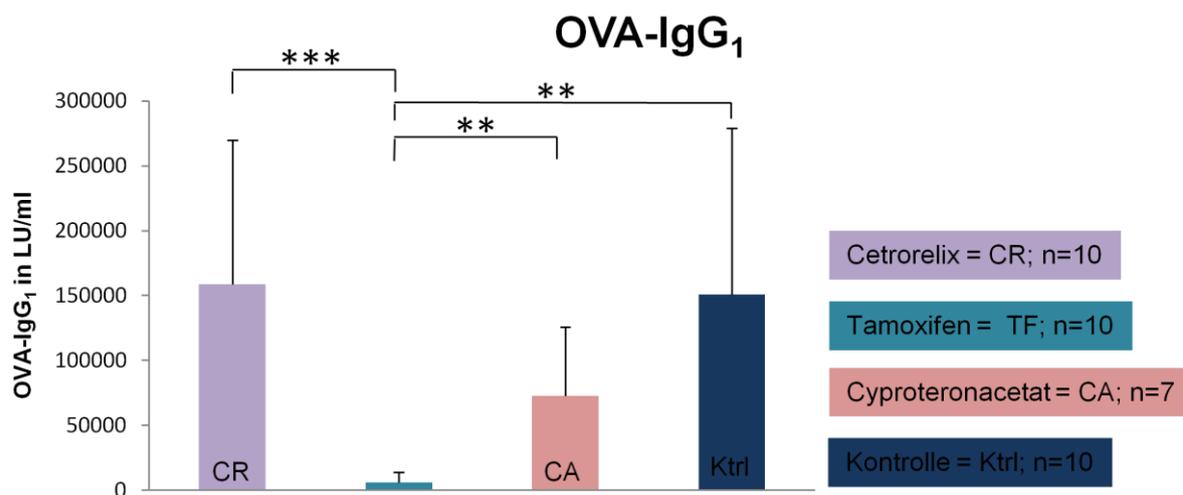


Abb. 26: OVA-IgG₁, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1, 14 und 21 intraperitoneal sensibilisiert und an Tag 35 intradermal geboostert. Sie wurden entweder mit Cetrorelix (GnRH-Antagonist), mit Tamoxifen (Selektiver Estrogenrezeptormodulator) oder Cyproteronacetat (Testosteronantagonist) behandelt.

4.2.1.2. Zytokinantwort

Die T-Zellantwort, hier die allergeninduzierte Produktion an Zytokinen wurde in-vitro mittels FlowCytomix (T_H1/T_H2 T enplex, BenderMedSystems) in den Milzzellüberständen quantifiziert. Die Milzzellkulturen wurden über 4 Tage mit OVA/αCD28 stimuliert. OVA/αCD28 stimuliert OVA-spezifische Zellen, αCD28 ist das kostimulatorische Signal zur Aktivierung spezifischer T-Zellen.

Die Produktion von IL-4, einem T_H2-Zytokin war bei mit Tamoxifen behandelten Mäusen geringer als bei den un behandelten Kontrollmäusen, eine Signifikanz ist nicht gegeben (p=0.06). Das gleiche gilt tendenziell auch für IL-6 und IL-10. Während die Gruppe der mit Cyproteronacetat behandelten Tiere stets geringere Zytokingehalte als die Kontrollgruppe aufwies, war die Produktion von IL-6 und IL-10 bei der Cetrorelixgruppe höher als die der un behandelten Kontrollgruppe. Die Level des T_H1-Zytokins IFN waren in der Kontrollgruppe am niedrigsten und in der Gruppe der mit Cetrorelix behandelten Tiere am höchsten.

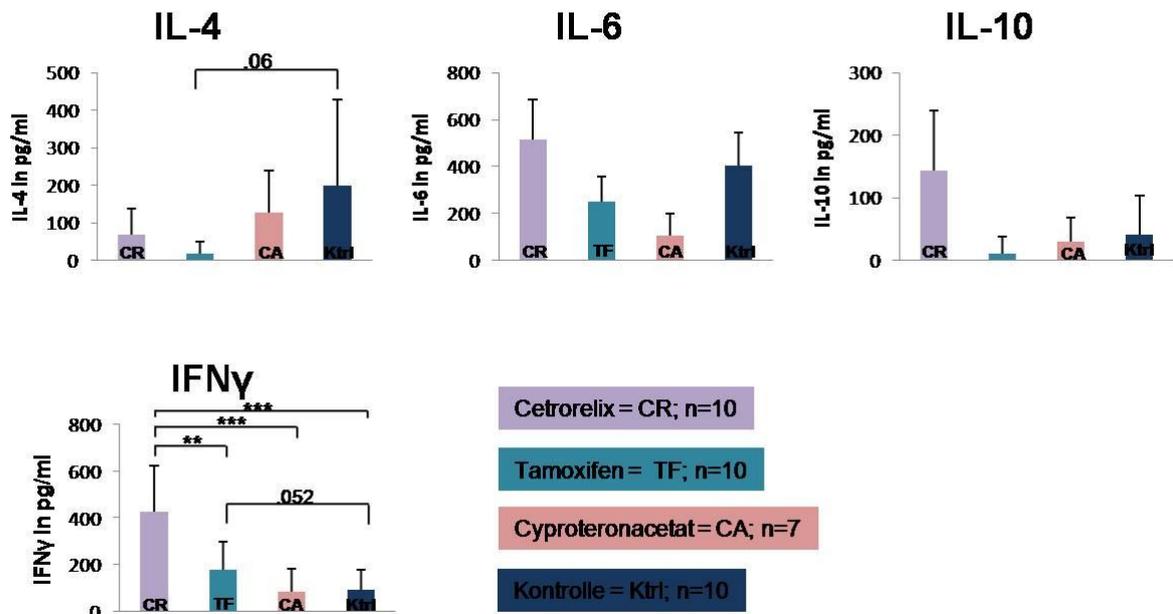


Abb. 27: T_H2 -Zytokinantwort sowie T_H1 -Zytokin $IFN\gamma$, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1, 14 und 21 intraperitoneal sensibilisiert und an Tag 35 intradermal geboostert. Sie wurden entweder mit Cetrorelix (GnRH-Antagonist), mit Tamoxifen (Selektiver Estrogenrezeptormodulator) oder Cyproteronacetat (Testosteronantagonist) behandelt.

4.2.2. Lokale Immunantwort

Die lokale Immunantwort wurde mittels Ear Swelling an Tag 35 quantifiziert. Hierfür wurde Allergen (OVA) in die Haut des rechten Ohrs gespritzt. Als Vergleich diente eine PBS-Injektion in die Haut des linken Ohres.

Die Dicke des Ohres wurde vor der Injektion (Nullwert) sowie 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden nach der Injektion bestimmt. Schließlich wurde der Nullwert von den Verlaufswerten abgezogen um den Anstieg der Schwellung zu erhalten. Es wurden jeweils 3 Werte pro Zeitpunkt gemessen und deren Mittelwert zur weiteren Berechnung verwendet.

Der geringste Anstieg der Schwellung ist nach der PBS-Injektion zu verzeichnen. Hier erreicht die Schwellung nach 2 Stunden den Höhepunkt, die Ohren schwellen schließlich wieder deutlich ab. Einen ähnlichen Verlauf zeigt das Protokoll der Tamoxifengruppe. Die Ohren schwellen zwar nach Allergeninjektion mehr an als die Ohren der PBS-Kontrolle, aber auch hier tritt nach 2 Stunden die stärkste Schwellung auf (2,21 μ m), schließlich schwillt das Ohr wieder ab.

In der Gruppe der mit Cetrorelix behandelten Mäuse hält sich die Schwellung über 6 Stunden in etwa ähnlichen Bereichen (2,9-3,3 μ m) um dann nach 24 Stunden zwar deutlich vermindert, aber dennoch nicht nahe des Nullwertes zu sein.

Am signifikantesten schwellen die rechten Ohren der Kontrolltiere an: Schon nach 1 Stunde liegen die Werte über denen der PBS-Injektions sowie der Werte der mit Tamoxifen behandelten Tiere. Während auch deren Maximalwert nach 2 Stunden (2,21 μ m) deutlich unter dem Wert der Kontrolltiere nach 2 Stunden (2,52 μ m) liegt, erreicht die Schwellung der unbehandelten Tiere nach 6 Stunden ihr Maximum (6,3 μ m). Auch nach 24 Stunden sind die Ohren deutlich geschwollen (5,34 μ m). Einen ähnlichen Verlauf mit etwas weniger ausgeprägten Schwellungen (Maximum nach 6 Stunden mit 4,19 μ m) zeigt die Gruppe der mit Cyproteronacetat behandelten Tiere.

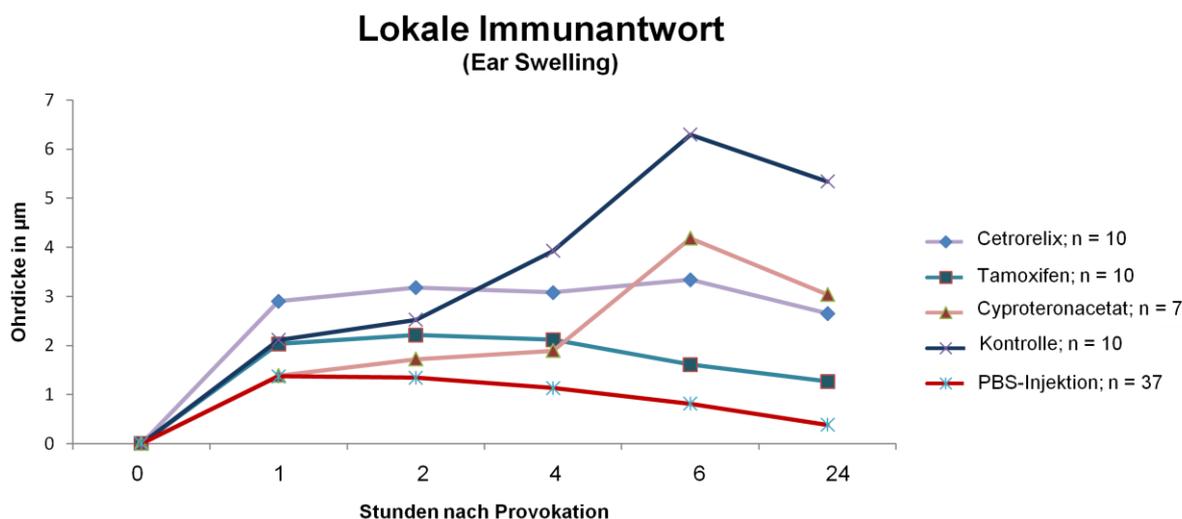


Abb. 28: Ohrdicke nach intradermaler Provokation mit Allergen (OVA) sowie nach PBS-Injektion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen nach Allergeninjektion sowie die Mittelwerte aller Tiere nach PBS-Injektion. Die Tiere wurden an Tag 1, 14 und 21 intraperitoneal sensibilisiert und an Tag 35 intradermal geboostert. Sie wurden entweder mit Cetrorelix (GnRH-Antagonist), mit Tamoxifen (Selektiver Estrogenrezeptormodulator) oder Cyproteronacetat (Testosteronantagonist) behandelt.

4.2.3. Estradiollevel

Das Serumestradiol wurde von Herrn Prof. Wolfgang Rohde im Institut für klinische Endokrinologie der Charité mittels Radioimmunoassay bestimmt. Die Seren stammten aus Verlaufspröben an den Tagen 1 und 21 sowie aus der Endpunktanalyse an Tag 36.

An Tag 1 sind im Serum der unbehandelten Kontrolltiere die höchsten Estradioltiter zu messen, gefolgt von den Tieren der mit Cetrorelix behandelten Mäuse. Die geringsten Gehalte an Estradiol sind in den Seren der mit Tamoxifen behandelten Mäuse zu finden.

Auch an Tag 21 weist die Tamoxifengruppe die niedrigsten Estradioltiter auf, wohingegen bei den mit Cyproteronacetat behandelten Tieren sowie den unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe am meisten Estradiol nachzuweisen ist.

An Tag 36 sind die Estradiollevel in allen Gruppen ähnlich hoch, wobei in der Tamoxifengruppe jedoch etwas weniger Estradiol gemessen werden konnte.

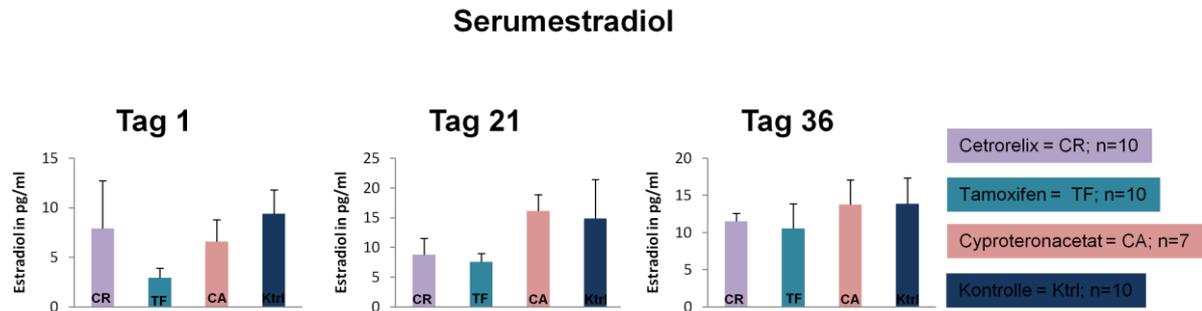


Abb. 29: Serumestradiolgehalt der Gruppen an den Tagen 1, 21 und 36. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Quantifizierung des Estradiols erfolgte im Serum der Tiere mittels RIA (RadiolimmunoAssay). Die Tiere wurden an Tag 1, 14 und 21 intraperitoneal sensibilisiert und an Tag 35 intradermal geboostert. Sie wurden entweder mit Cetrorelix (GnRH-Antagonist), mit Tamoxifen (Selektiver Estrogenrezeptormodulator) oder Cyproteronacetat (Testosteronantagonist) behandelt.

4.3. Tiere im Mausmodell der Atopischen Dermatitis

Von der mit Allergensensibilisierung einhergehenden Atopischen Dermatitis ist bekannt, dass die Prävalenz bei Mädchen und Frauen höher ist als bei männlichen Individuen. Im Hautmodell der vorliegenden Arbeit wurde auf lokaler Ebene untersucht, ob der Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen die klinische Ausprägung dieser chronischen Hauterkrankung beeinflusst und ob die Ergebnisse des vorangegangenen Versuchs auf humoraler Ebene reproduzierbar sind.

4.3.1. Systemische Immunantwort

4.3.1.1. Humorale Immunantwort

Zur Quantifizierung der humoralen Immunantwort wurden die Immunglobulintiter in den Seren untersucht. Gesamt-IgE, OVA-spezifisches IgE und OVA-spezifisches IgG₁ wurden als Endpunktanalyse an Tag 63 bestimmt.

Die Gesamt-IgE-Werte der mit Tamoxifen behandelten Mäuse lagen mit 2525,9ng/ml deutlich unter denen der unbehandelten Kontrollmäuse (3455,9ng/ml).

Das allergenspezifische OVA-IgE konnte in den Seren der mit Tamoxifen behandelten Mäuse in signifikant geringerer Menge nachgewiesen werden als in den Seren der Kontrollmäuse (32915,8LU/ml bzw. 84220,9LU/ml). Auch die Produktion des auf die Intensität des Klassenwechsels hinweisenden allergenspezifischen OVA-IgG₁ war bei den mit Tamoxifen behandelten Mäusen signifikant verringert (61168,8LU/ml und 167131,3LU/ml).

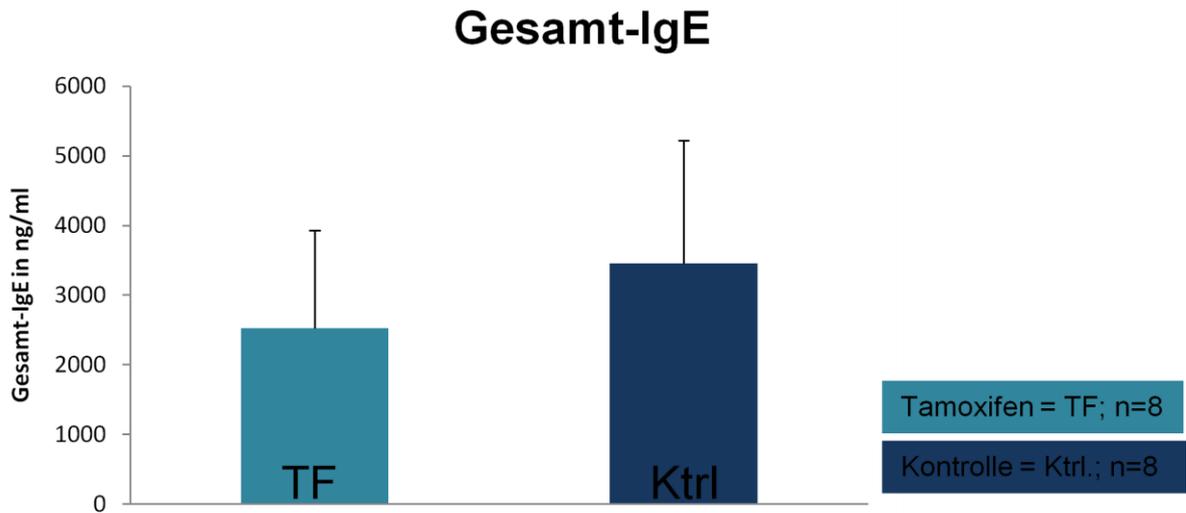


Abb. 30: Gesamt-IgE, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

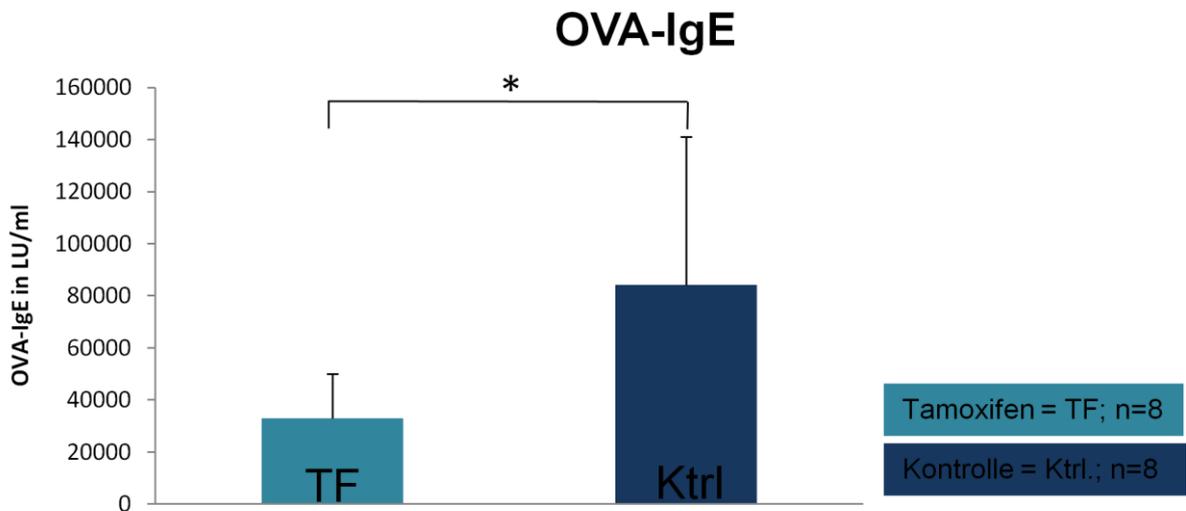


Abb. 31: OVA-IgE, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

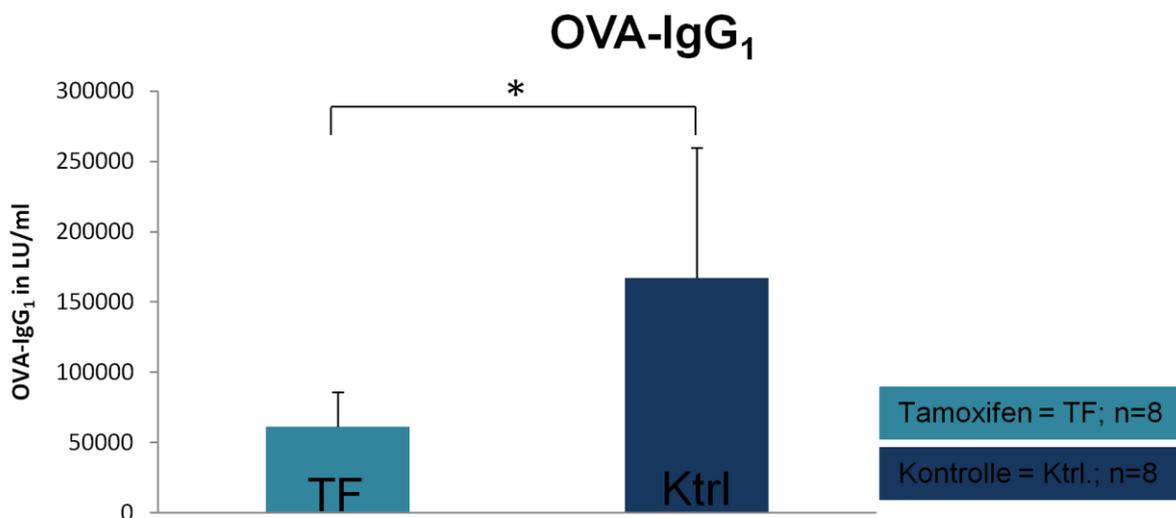


Abb. 32: OVA-IgG₁, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/Alum behandelt.

4.3.1.2. Zytokinantwort

Die T-Zellantwort, hier die allergeninduzierte Produktion an Zytokinen wurde in-vitro mittels FlowCytomix (T_H1/T_H2 T enplex, BenderMedSystems) in den Milzzellüberständen quantifiziert. Die Milzzellkulturen wurden über 4 Tage mit OVA/αCD28 stimuliert. OVA/αCD28 stimuliert OVA-spezifische Zellen, αCD28 ist das kostimulatorische Signal zur Aktivierung spezifischer T-Zellen.

Die Produktion von IL-4, einem T_H2-Zytokin ist bei mit Tamoxifen behandelten Mäusen signifikant geringer als bei den unbehandelten Kontrollmäusen. Das gleiche gilt tendenziell auch für IL-5 und in geringerem Ausmaß für IL-6. Die Level der T_H1-Zytokine wie IFN, IL-2 oder IL-1 lagen unter dem Detektionslimit (nicht dargestellt).

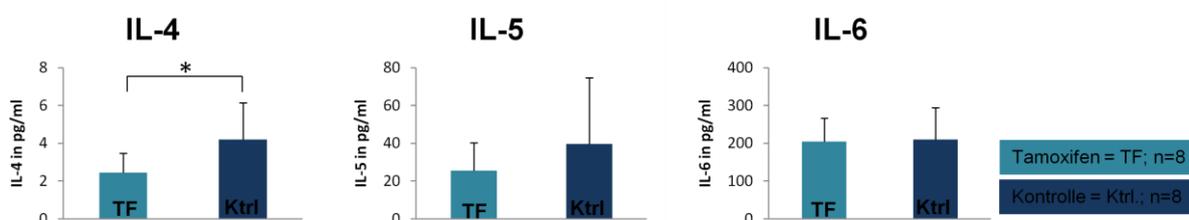


Abb. 33: T_H2-Zytokinantworten, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen. Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/Alum behandelt.

4.3.1.3. Gesamtzahl Lymphozyten

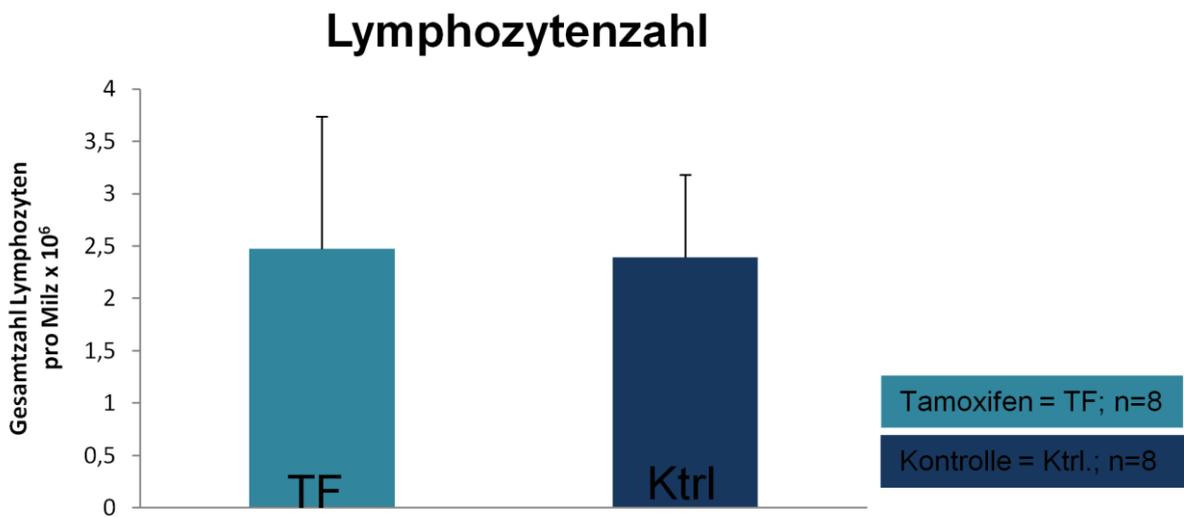


Abb. 34: Gesamtzahl Lymphozyten pro Milz, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

4.3.1.4. B-T-Zell-Ratio

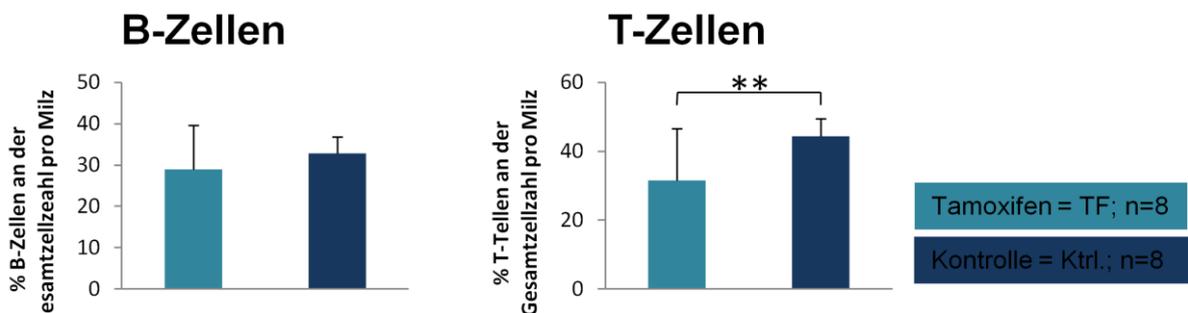


Abb. 35: B-T-Zell-Ratio pro Milz in Prozent, dargestellt sind die Mittelwerte der Gruppen.

4.3.2. Lokale Immunantwort

4.3.2.1. Klinische Ausprägung der Atopischen Dermatitis

Die Bilder, die von der Haut gemacht wurden, wurden per SkinScore beurteilt. Dieser bezieht 5 Faktoren ein: Rötung, Ödem/Papeln, Hautabschürfung, Trockenheit und Ausdehnung. Die 5 Faktoren wurden jeweils nach Schweregrad von 0 (keine Symptome) über 1 (milde Symptome), 2 (mittelschwere Symptome) und 3 (schwere Symptome) beurteilt. Schließlich wurde aus den Summen der vergebenen Schweregrade der 3 beurteilenden Personen ein Durchschnitt gebildet.

Der SkinScore der mit Tamoxifen behandelten Mäuse war signifikant niedriger als der SkinScore unbehandelter Kontrolltiere.

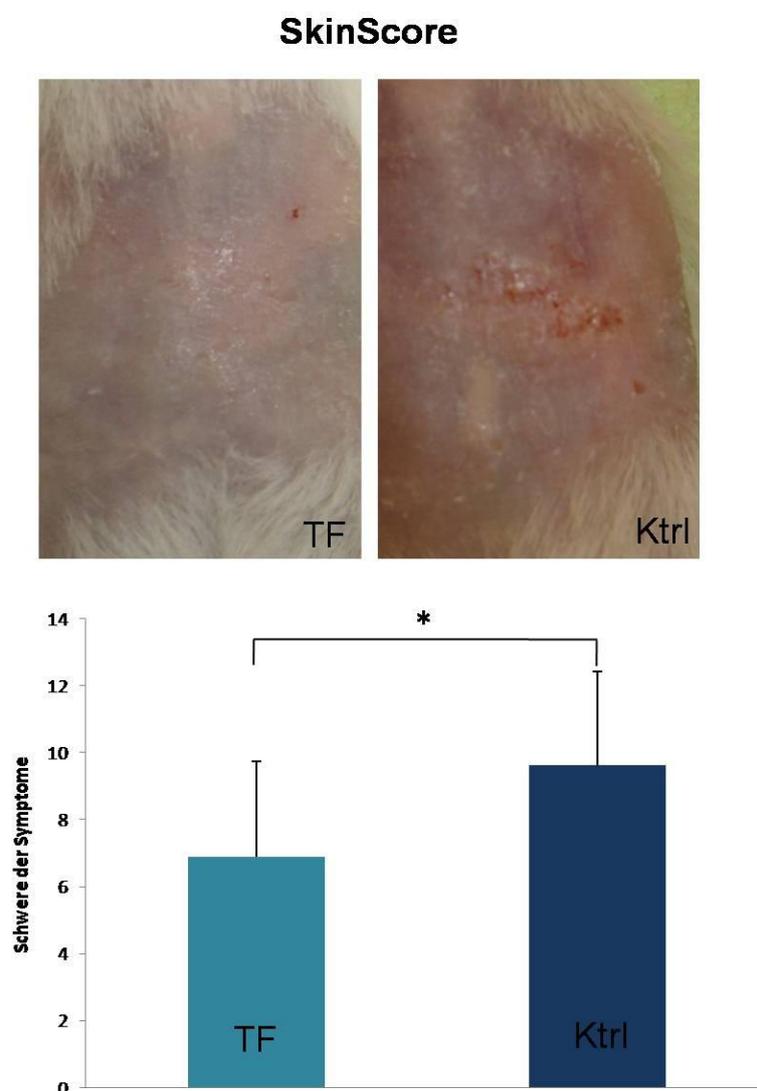


Abb. 36: Klinische Manifestation des Ekzems bei mit Tamoxifen behandelten Tieren und unbehandelten Kontrolltieren. Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

4.3.2.2. Ergebnisse der Histologie

AD-typische Hautläsionen sind histologisch durch Verdickung der Epidermis und verstärkte Infiltration der Dermis mit Entzündungszellen (hier vor allem CD4⁺ - und CD8⁺ - T-Zellen sowie Mastzellen) charakterisiert.

Um die Zellinfiltrate in der Dermis zu quantifizieren wurden positiv gefärbte Zellen in 6 Feldern (100µm x 200µm) je Maus gezählt und der Durchschnitt errechnet.

Die T-Zellen waren immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 gefärbt worden.

Die Anzahl der CD8⁺ - Zellen war in der Haut von mit Tamoxifen behandelten Mäusen verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren signifikant vermindert. Auch CD4⁺ - Zellen, zumeist in der Dermis lokalisiert, wurden in der Haut der mit Tamoxifen behandelten Mäuse in signifikant verringerter Anzahl erfasst.

Die mit Toluidinblau gefärbten Mastzellen ließen sich in beiden Gruppen in etwa gleicher Anzahl in der Dermis und Subkutis anfärben. Verglichen mit dem aus Vorversuchen bekannten Vorkommen von Mastzellen in der Haut von Mäusen ohne epikutane Allergenapplikation ist die Anzahl der Mastzellen jedoch deutlich erhöht (< 0,5 Zellen pro Feld bei Mäusen ohne epikutane Allergenapplikation, bzw. 3,2-3,6 Zellen pro Feld im vorliegenden Versuch).

Die Epidermis der Haut der mit Tamoxifen behandelten Mäuse war signifikant dünner als die Epidermis der unbehandelten Kontrollmäuse (TF: 38,4µm; Ktrl: 52,1µm).

CD8⁺ - Zellen

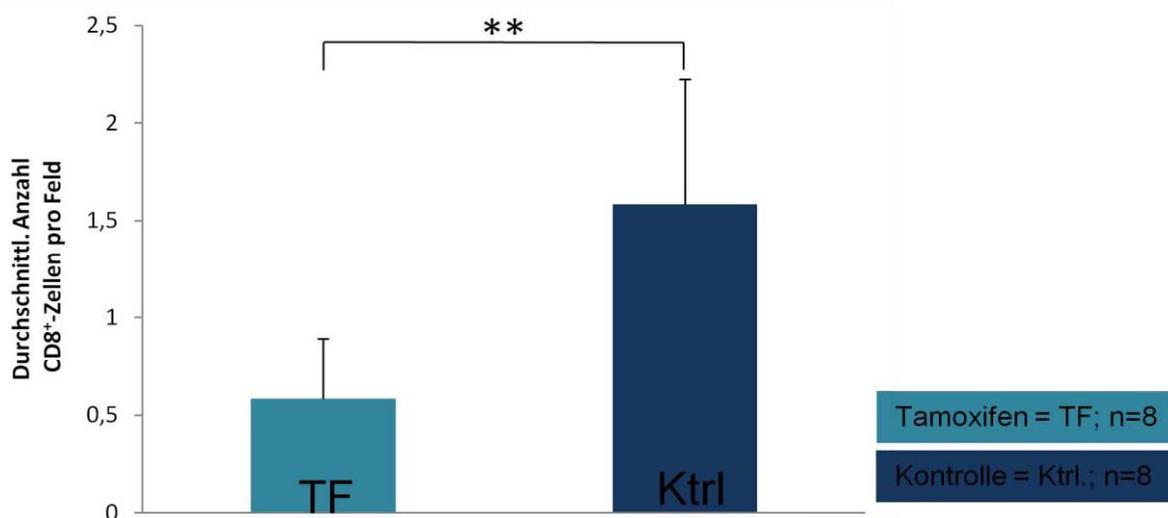
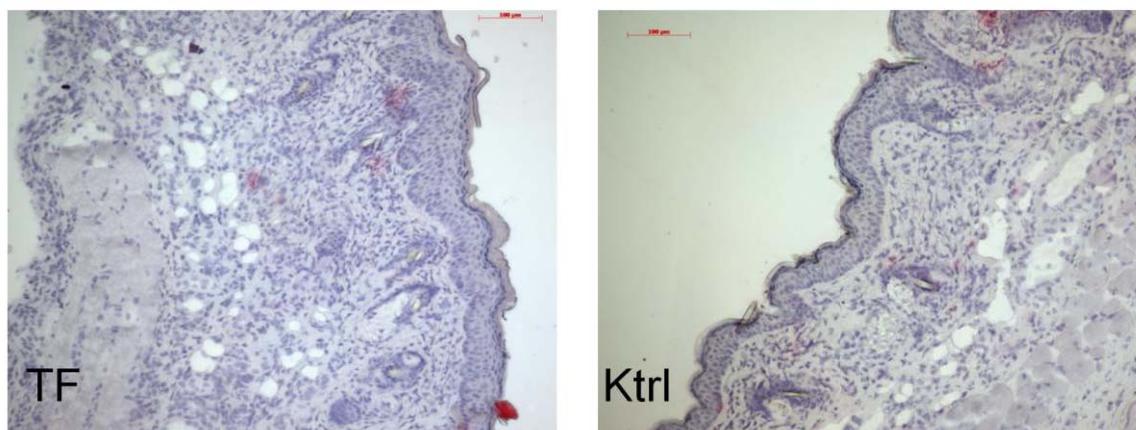


Abb. 37: Infiltration der Dermis mit CD8⁺ - Zellen. Haut von mit Tamoxifen (TF) behandelten Tieren und Haut unbehaltener Kontrolltiere (Ktrl). Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

CD4⁺ - Zellen

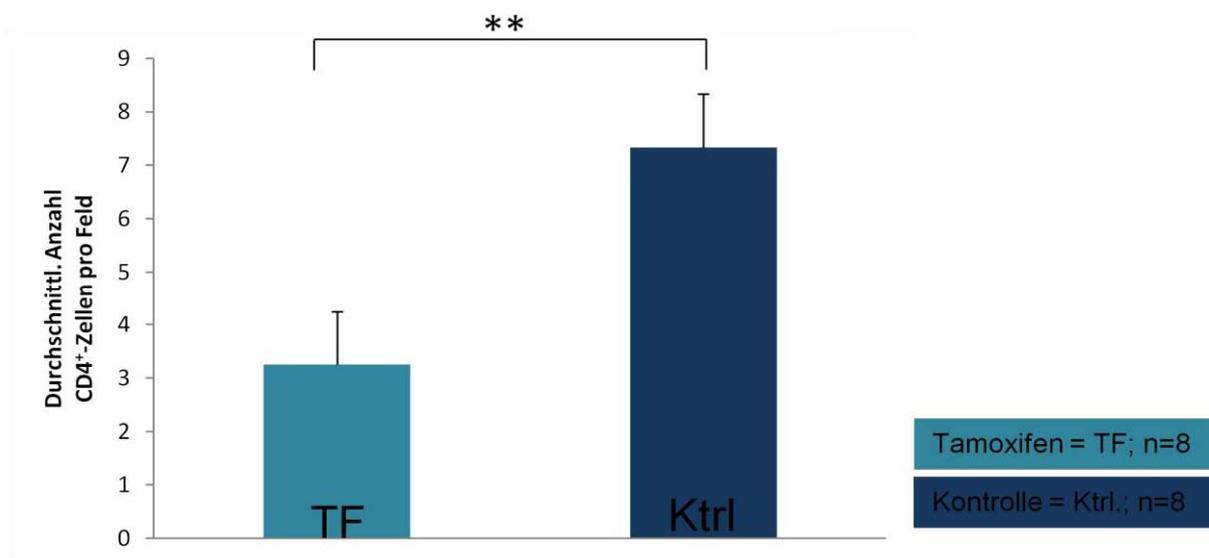
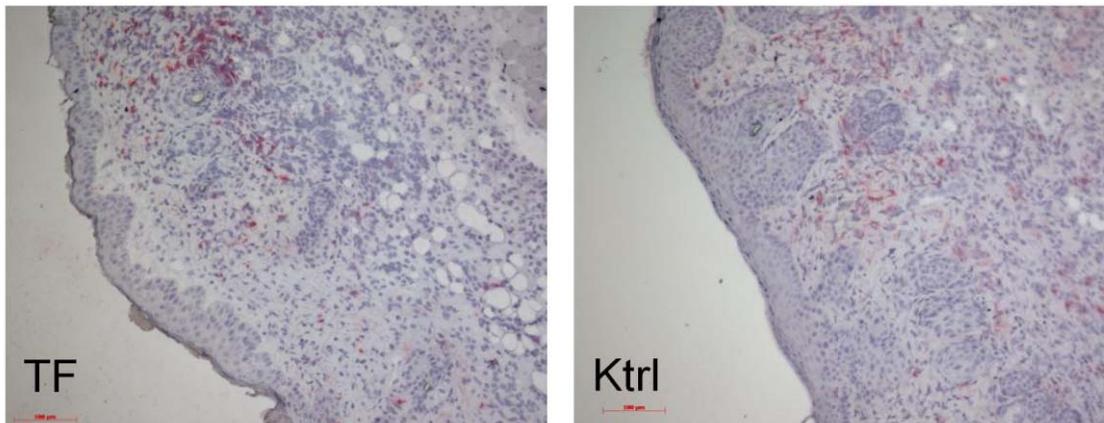


Abb. 38: Infiltration der Dermis mit CD4⁺ - Zellen. Haut von mit Tamoxifen (TF) behandelten Tieren und Haut unbehaltener Kontrolltiere (Ktrl). Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

Mastzellen

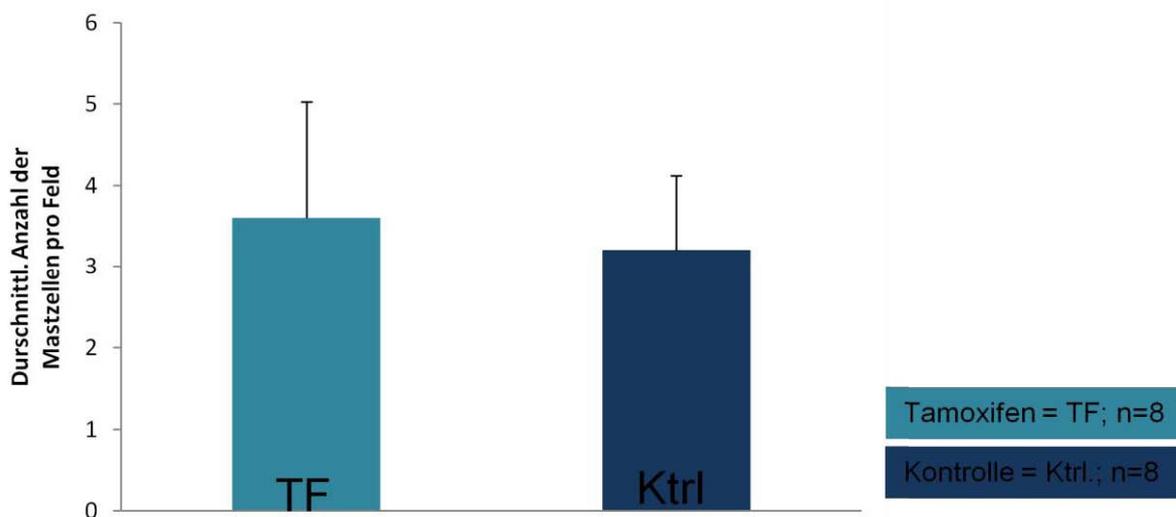
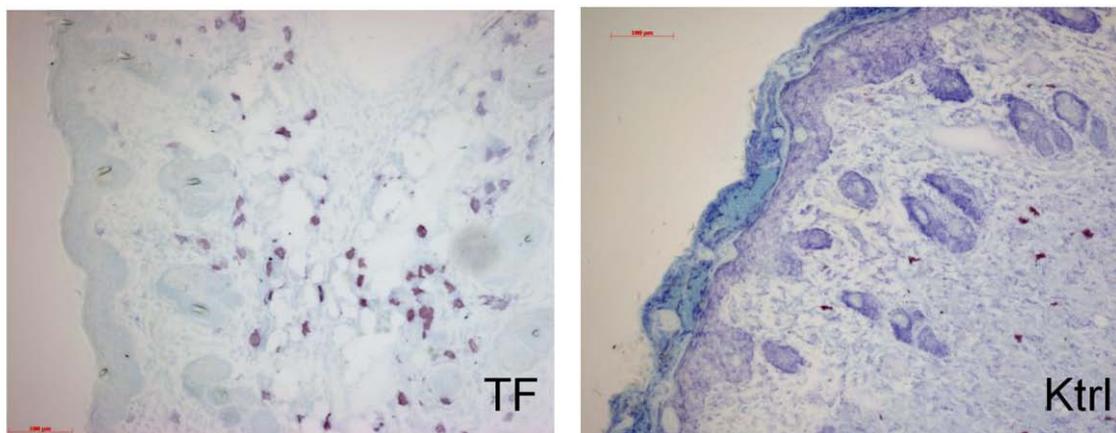


Abb. 39: Infiltration der Dermis mit Mastzellen, gefärbt mit Toluidinblau. Haut von mit Tamoxifen (TF) behandelte Tiere und Haut unbehandelte Kontrolltiere (Ktrl). Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

Epidermisdicke

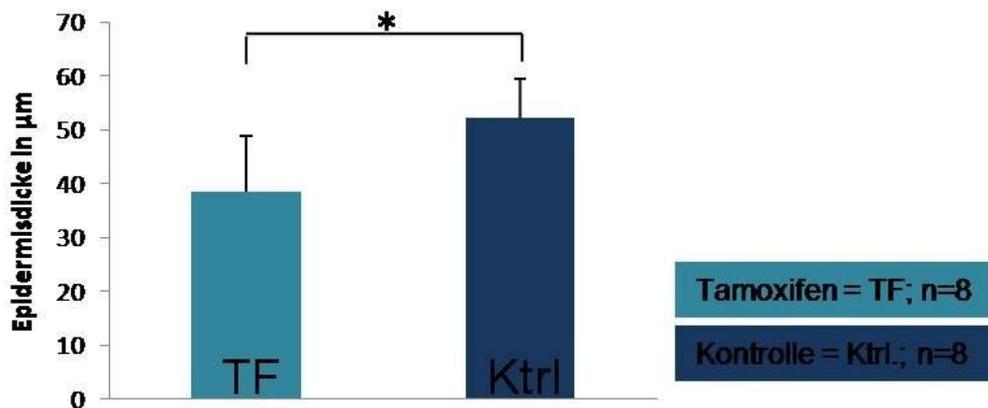
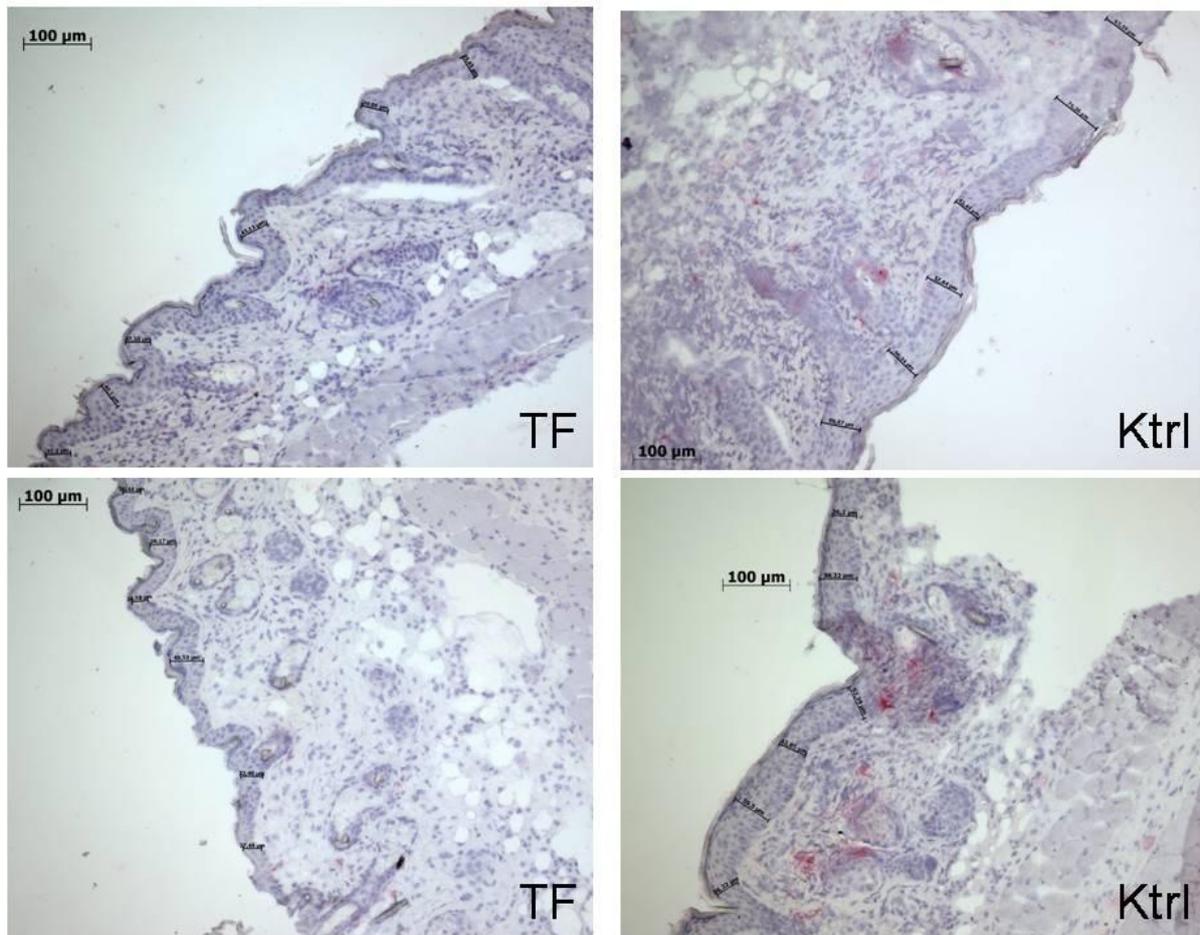


Abb. 40: Epidermisdicke der Haut von mit Tamoxifen (TF) behandelter Tiere und Haut un behandelter Kontrolltiere (Ktrl). Die Tiere wurden an Tag 1 und 14 intraperitoneal sensibilisiert und anschließend drei Mal im Abstand von zwei Wochen je eine Woche lang epikutan mit OVA/alum behandelt.

5. Diskussion

Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf das Immunsystem wird schon seit den 80-er Jahren beschrieben und diskutiert. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen weitgehend unbekannt. Bei atopischen Erkrankungen wie auch der atopischen Dermatitis ist die Inzidenz nach vollständiger Ausreifung der Geschlechtsorgane mit Ende der Pubertät in der weiblichen Bevölkerung deutlich höher. Geschlechtshormone scheinen somit auch in die bei der Pathogenese der atopischen Dermatitis vorliegenden komplexen Mechanismen zwischen lokaler und systemischer Immunantwort eingebunden zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Geschlechtshormonen auf die allergische Immunantwort näher zu untersuchen. Dies geschah in einem Mausmodell mit hormonkompetenten und hormoninkompetenten männlichen und weiblichen Balb/c Mäusen bei welchen nach Sensibilisierung mit OVA die humorale Immunantwort gemessen wurde.

Desweiteren wurden weibliche Mäuse mit Hormonrezeptorantagonisten bzw. – modulatoren behandelt und mit OVA sensibilisiert. In diesem Modell wurden humorale sowie lokale Immunantwort bestimmt.

Um den Einfluss der Geschlechtshormone auf das komplexe Geschehen der atopischen Dermatitis (AD) zu untersuchen, wurden weibliche Tiere im AD-Mausmodell mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen behandelt, sensibilisiert sowie epikutan dem Allergen OVA ausgesetzt. Es wurden sowohl klinische Ausprägung des Ekzems und die damit verbundenen Veränderungen im Immunglobulin- und Zytokinmuster auch auf humoraler Ebene untersucht.

5.1. Hormonkompetente vs. hormoninkompetente Tiere

Allergiker bilden zumeist erhöhte IgE-Antworten aus, wobei hier vor allem das allergenspezifische IgE klinisch bedeutsam ist.

Zwar liegen die Gesamt-IgE-Werte der männlichen Tiere deutlich unter denen der weiblichen Tiere, dennoch konnte keine Signifikanz erreicht werden. Die erwarteten deutlich verringerten Werte bei den ovariectomierten Tieren im Vergleich zu den intakten Weibchen blieb aus: Die intakten Weibchen wiesen die geringeren Werte auf.

Die Gesamt-IgE-Werte orchektomierter Männchen liegen über denen der männlichen Tiere. Die Werte des allergenspezifischen OVA-IgE sind vom Muster her wie erwartet, die intakten weiblichen Tiere, bei denen die höchsten Östrogengehalte vermutet wurden weisen auch die höchsten Werte auf, gefolgt derer der ovariectomierten und damit der Hauptöstrogenquelle entledigten Weibchen. Am niedrigsten sind die Werte der männlichen Tiere.

Das gleiche Muster liegt bei den OVA-IgG₁-Werten vor, auch hier fehlt jedoch die statistische Signifikanz.

Die oben genannten Ergebnisse korrelieren mit den Serumestradioltitern. Zwar weisen ovariectomierte Weibchen niedrigere Estradiolgehalte auf als intakte Weibchen, nach Eliminierung der Hauptöstrogenquelle müssten die Werte signifikant verschieden sein, dennoch fehlt hier die statistische Signifikanz. Die Tatsache, dass bei den orchektomierten männlichen Tieren die höchsten Serumestradiolgehalte nachgewiesen wurden lässt folgende Vermutung zu: Die beim Menschen und höheren Primaten beschriebene zusätzlich zur endokrinen und parakrinen Produktion von Geschlechtshormonen stattfindende Produktion von Estrogenen aus den Vorläufersteroiden DHEA-S und DHEA in peripherem Gewebe (41) ist für kein niederes Säugetier wie Ratte oder Maus beschrieben, Labrie et al. begründen dies mit dem Fehlen der Vorläufersteroiden DHEA-S und DHEA. Wohl findet bei der Maus eine Synthese von aktiven Steroiden in peripherem Gewebe statt, diese wirken nach Aussage Labries jedoch direkt am Ort der Synthese (intrakrin) ohne in die Blutbahn zu gelangen und damit per Serumanalyse nachweisbar zu sein. Die Ergebnisse Labries zur Endokrinologie der Maus stammen aus den 80er Jahren und neuere Erkenntnisse liegen nicht vor. Die oben genannten Ergebnisse, sofern sie nicht Folge eines ungeeigneten Testverfahrens könnten Hinweis auf extraovariell stattfindende und doch endokrine Östrogensynthese bei der Maus sein.

Da Östrogene gemäß der Literatur das Verschieben der T-Zell-Antwort in Richtung T_H2-Antwort bewirken, wird über die daraus folgende Produktion des T_H2-Zytokins IL-4 die Antikörperproduktion der B-Zellen stimuliert. Die Werte für das allergenspezifische OVA-IgE zeigen zwar eine deutliche Tendenz – die intakten Weibchen mit den höheren Estradioltitern weisen auch höhere OVA-IgE-Werte auf, dennoch fehlt die statistische Signifikanz. Zum besseren Verständnis wurde das relative OVA-IgE berechnet, welches den Anteil des allergenspezifischen OVA-IgE am Gesamt-IgE angibt. Hierdurch werden Faktoren, die die Bildung von Gesamt-IgE beeinflussen, wie beispielsweise Infektionen der Tiere, nicht berücksichtigt. Die Werte für das relative OVA-IgE sind bei den intakten Weibchen mit den höheren Estradioltitern signifikant höher als bei den ovariectomierten Tieren. Ein stimulierender Einfluss von Östrogen auf die Produktion von allergenspezifischem OVA-IgE ist somit deutlich. Der inhibierende Einfluss von Testosteron auf die Produktion von Antikörpern (26) wird durch den direkten Vergleich der beiden männlichen Gruppen gezeigt: Die intakten Männchen produzieren weniger Gesamt-IgE, OVA-IgE und OVA-IgG₁ als die orchektomierten männlichen Tiere, deren Testosteronproduktion durch die fehlenden Gonaden deutlich vermindert sein dürfte.

Das Verschieben der T-Zell-Antwort in Richtung T_H2 -Antwort durch Östrogen lässt sich auch im Zytokinmuster zeigen: Die T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 werden in den Zellüberständen der männlichen Tiere mit den niedrigsten Estradiolwerten am geringsten produziert. IL-4 ist signifikant niedriger als in den Kulturen der orchektomierten Männchen und mit einem p-Wert von 0.01 signifikant niedriger als die der intakten und ovariectomierten Weibchen, letztere wiesen die höchsten Gehalte auf. Testosteron scheint folglich auch Einfluss auf die T-Zell-Aktivität zu haben.

IL-5 wird in den Kulturen der intakten Weibchen am meisten produziert, eine Signifikanz ($p=0.01$) ist im Vergleich zu den Werten aus den Kulturen der intakten männlichen Tiere gegeben. Auch die hormoninkompetenten Weibchen und Männchen produzieren signifikant mehr IL-5 als die männlichen Tiere ($p=0.05$). IL-5 manifestiert die T_H2 -Antwort und inhibiert die Produktion von T_H1 -Zytokinen – IL-5 unterstützt die Antikörpersynthese folglich indirekt.

Die Produktion von IL-10, einem weiteren T_H2 -Zytokin ist in den Kulturen der intakten Männchen am geringsten, auch wenn nur eine Tendenz zur Gruppe der ovariectomierten Weibchen besteht ($p=0.059$).

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass Östrogene das T_H1/T_H2 -Gleichgewicht in Richtung T_H2 verschieben, auch wenn ein signifikanter Unterschied zwischen intakten und hormoninkompetenten Tieren ausbleibt. Die männlichen Tiere, intakt oder hormoninkompetent, produzieren *in vitro* signifikant weniger T_H2 -Zytokine als die weiblichen Tiere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weibliche Tiere im Vergleich zu männlichen Tieren eine zum größten Teil signifikant stärkere humorale Immunantwort nach Sensibilisierung mit OVA ausbilden. Dies lässt sich nicht nur durch höhere Immunglobulintiter zeigen sondern auch im veränderten Zytokinprofil. Die Verschiebung der T-Zell-Antwort in Richtung T_H2 -Antwort durch Östrogene wird aus meist signifikant verstärkter Synthese von T_H2 -Zytokinen *in vitro* deutlich. Der direkte Einfluss von IL-4 auf die Immunglobulinsynthese der B-Zellen kann durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Der immunprotektive Einfluss von Testosteron wird durch die verminderte Produktion von Immunglobulinen gezeigt und korreliert ebenfalls mit der signifikant geringeren Produktion der T_H2 -Zytokine, die T_H1/T_H2 -Balance bleibt bei den intakten männlichen Tieren gewahrt, die humorale Immunantwort der männlichen Tiere bleibt deutlich milder als bei den Weibchen.

Dass die Ovariectomie nicht zu signifikant niedrigeren Estradiolleveln und daraus folgend zu niedrigeren Immunglobulin- und T_H2 -Zytokinleveln führte bleibt überraschend. Wie bereits erläutert ist eine extraovarielle Östrogenproduktion bei niederen Säugern zwar in peripheren Geweben existent, das produzierte Östrogen bleibt dabei aber am Ort der Produktion – nach

operativer Entfernung der Ovarien sollte also auch der Estradiolgehalt im Serum der Tiere deutlich geringer sein.

Möglich ist eine unvollständige Durchführung der Ovariectomie durch den Lieferanten, mit persistierender Hormonproduktion. Eine exogene Östrogenzufuhr über das Futter kann weitgehend ausgeschlossen werden, da statt des soja- und somit phytoöstrogenreichen Haltungsfutters für Mäuse ein phytoöstrogenarmes Futter verabreicht wurde.

Selbstverständlich muss auch die Möglichkeit ungenauer Estradiolmessungen in Betracht gezogen werden. Dagegen spricht aber die Tatsache, dass Serumestradioltiter und Immunglobulintiter korrelieren: Mit fehlendem signifikanten Unterschied des Serumestradiolgehaltes bei den intakten und hormoninkompetenten Weibchen geht ein fehlender signifikanter Unterschied bei den Immunglobulintitern einher.

5.2. Einfluss von Geschlechtshormonen auf die allergische Immunantwort nach Behandlung mit hormonelektiven Antagonisten.

Es ist nicht bis ins Detail geklärt, über welche Mechanismen Östrogen die Ausbildung der allergischen Immunantwort beeinflusst. Näheren Aufschluss darüber soll die Behandlung weiblicher Balb/c Mäuse mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen (TF) bringen. Die Behandlung wurde vor der Sensibilisierung begonnen und bis zum Ende des Experiments fortgesetzt. Tamoxifen moduliert die Östrogenwirkungen an den Östrogenrezeptoren vom Typ α (ER α), welcher für die immunrelevanten Östrogenwirkungen verantwortlich sein soll.

Außerdem wird der Testosteronrezeptorantagonist Cyproteronacetat (CA) eingesetzt um die immunsuppressive Wirkung des Testosterons, welche im voran gegangenen Versuch bei männlichen Tieren gezeigt werden konnte durch Blockade der Testosteronrezeptoren zu beeinflussen. Die Blockade der Androgenwirkung in weiblichen Balb/c Mäusen soll Aufschluss darüber geben, welche Rolle Androgene (hier Testosteron) im weiblichen Organismus bei der Entstehung allergischer Erkrankungen spielen könnten.

Cetrorelix (CR) ist ein GnRH – Rezeptorantagonist. Gonadotropinreleasinghormon (GnRH) veranlasst die Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel stimulierendem Hormon (FSH) welche die Follikelbildung und somit die vom Follikel ausgehende Östrogensynthese sowie die Luteinisierung des Follikels veranlassen. Durch die Blockade der GnRH-Rezeptoren soll die Synthese von FSH und LH verhindert werden und in der Folge durch mangelndes FSH auch die Bildung von Östrogen synthetisierenden Follikeln auf dem Ovar.

Die humorale Immunantwort wurde erneut anhand der Immunglobulinantworten untersucht. Die Tiere der Tamoxifengruppe weisen signifikant niedrigere Gesamt-IgE-Werte auf, gefolgt

derer der mit dem GnRH-Rezeptorantagonisten Cetrorelix behandelten Tiere, auch diese sind signifikant niedriger als die der unbehandelten Kontrolltiere, deren Werte noch höher sind als die der mit dem Testosteronantagonisten behandelten Tiere, deren Werte außerdem sehr stark variieren.

Auch die Werte des allergenspezifischen OVA-IgE sind in der Tamoxifengruppe signifikant geringer als die Werte der unbehandelten Kontrolltiere. Die mit Cetrorelix behandelten Mäuse produzieren zwar wesentlich weniger OVA-IgE als die Tiere der Kontrollgruppe, eine Signifikanz kann jedoch nicht erreicht werden. Knapp unter den Werten der Cetrorelixgruppe bleiben die Werte der mit dem Testosteronantagonisten Cyproteronacetat behandelten Tiere. Sie sind signifikant niedriger als die Werte der Kontrollgruppe.

Am deutlichsten fällt das Ergebnis der Bestimmung des allergenspezifischen OVA-IgG₁ aus. Dieses auf die Intensität des Klassenwechsels hindeutende Immunglobulin ist in der Gruppe der mit Tamoxifen behandelten Tiere mit einem p-Wert von <0.001 höchstsignifikant niedriger als die Titer der Cetrorelixgruppe, die etwas unter denen der Kontrollgruppe liegen. Selbst im Vergleich zu den mit Cyproteronacetat behandelten Tieren sind die Titer der Tamoxifengruppe noch signifikant niedriger ($p < 0.01$).

Tamoxifen hemmt folglich über die Blockade des ER α die Östrogenwirkungen auf das Immunsystem bezüglich der Immunglobulinsynthese, welche deutlich verringert ist.

Die indirekten Östrogenwirkungen über die Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichts zugunsten des T_H2 lassen sich auch im Zytokinmuster nachweisen:

Die Produktion von IL-4, einem T_H2-Zytokin ist bei mit Tamoxifen behandelten Mäusen geringer als bei den unbehandelten Kontrollmäusen, auch wenn eine Signifikanz ist nicht gegeben ist ($p = 0.06$). Das gleiche gilt tendenziell auch für IL-6 und IL-10. Während die Gruppe der mit Cyproteronacetat behandelten Tiere stets geringere Zytokingehalte als die Kontrollgruppe aufweist, ist die Produktion von IL-6 und IL-10 in den Kulturen der mit Cetrorelix behandelten Tiere stärker als die der Kulturen der unbehandelten Kontrollgruppe. IFN γ , ein T_H1-Zytokin wurde in den Kulturen der mit Cetrorelix behandelten Tiere sowie der mit Tamoxifen behandelten Tiere signifikant bzw. fast signifikant mehr produziert, die Kulturen der unbehandelten Kontrolltiere produzierten am wenigsten IFN γ .

Gemäß der Literatur stimuliert Östrogen die Produktion von IL-4. Dieses fördert in der Folge die Synthese von IgE durch B-Zellen. Durch die Blockade des ER α durch Tamoxifen lässt sich diese Wirkung aufheben, die IL-4-Synthese ist sehr gering. Ebenso konnte die von Östrogen induzierte Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichts in Richtung der T_H2-Antwort durch die Blockade des ER α aufgehoben werden: Die mit Tamoxifen behandelten Tiere produzierten am wenigsten T_H2-Zytokine dafür lagen die IFN γ -Gehalte Milzzellkulturen deutlich über denen der unbehandelten Kontrolltiere sowie der mit dem

Testosteronrezeptorantagonisten behandelten Tiere, das T_{H1}/T_{H2} -Gleichgewicht ist durch Blockade des ER α in Richtung T_{H1} verschoben.

Nicht eindeutig sind dahingegen die Ergebnisse für die mit Cetrorelix behandelten Tiere. Zwar liegen ihre Immunglobulinwerte immer unter denen der unbehandelten Kontrolltiere, die Synthese der Zytokine lässt jedoch kein einheitliches Muster erkennen.

Wenig Aufschluss über die Hintergründe gibt die Analyse des Serumestradiols. Während die mit Tamoxifen behandelten Tiere stets die niedrigsten Werte aufweisen, was mit der Blockade des ER α begründet werden kann, denn dadurch gibt es keine Möglichkeit, die Ausschüttung von FSH und LH zur verstärkten Follikelbildung und somit Östrogensynthese über den üblichen Weg des Feedbacks auf die Hypophyse zu beeinflussen. Ein Anstieg des Serumestradiols an Tag 36 kann durch die mit der Zeit nachlassende Wirkung des slow-release Tamoxifenpellets unter der Haut begründet sein. Dennoch bleibt das Serumestradiol der Tamoxifengruppe unter den Werten der anderen Gruppen, hohe Werte lassen sich in der Gruppe der mit dem Testosteronantagonisten sowie der Kontrollgruppe messen.

Dass die Werte der mit dem GnRH-Antagonisten behandelten Tiere nicht geringer sind, ist überraschend, denn mit der Blockade der GnRH-Rezeptoren auf dem Hypothalamus sollte die FSH/LH-Ausschüttung nicht erfolgen und somit keine Östrogen synthetisierenden Follikel auf den Ovarien gebildet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine zu geringe Dosis des Medikaments, diese wurde uns jedoch vom Hersteller empfohlen. Außerdem ist auch hier eine extraovarielle Östrogensynthese in Betracht zu ziehen, denn diese bisher nur beim Menschen und höheren Primaten beschriebene Synthese unterliegt nicht der Regulation durch GnRH – bliebe also auch nach der Blockade der GnRH-Rezeptoren bestehen.

Die Serumestradioltiter der anderen Gruppen sind wie erwartet: Tamoxifen blockiert die Östrogenrezeptoren nicht gewebsspezifisch, daraus folgt, dass das komplexe System der Östrogensynthese über Feedbackmechanismen ebenfalls blockiert ist. Die Gruppe der mit Cyproteronacetat behandelten Tiere sowie die unbehandelten Kontrolltiere weisen selbstverständlich die höchsten Titer auf: Ihr Östrogenstoffwechsel wurde nicht beeinflusst.

Um die Auswirkungen der Behandlung auf die lokale Immunantwort in der Effektorphase zu untersuchen, wurde an Tag 35 ein Hauttest (Ear Swelling) durchgeführt. Hier wird Allergen in die Haut des Ohres gegeben und anhand des Ausmaßes der Schwellung werden Rückschlüsse auf das Ausmaß der lokalen Immunantwort gezogen. Diese Methode ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass an Asthma leidende Frauen von Veränderungen im Schweregrad der Asthmasymptomatik während des Zyklus berichten: Während der Follikelphase, wenn die Östrogensynthese ihr Maximum erreicht, sind die lokalen Symptome des Asthmas deutlich schwerer (15-17). Auch die Reaktion auf intradermale Allergeninjektion bei einem Allergietest (PrickTest) variiert mit dem Zyklus (20).

Der geringste Anstieg der Schwellung ist nach der PBS-Injektion zu verzeichnen. Hier erreicht die Schwellung nach 2 Stunden den Höhepunkt, die Ohren schwellen schließlich wieder deutlich ab. Einen ähnlichen Verlauf zeigt das Protokoll der Tamoxifengruppe. Die Ohren schwellen zwar nach Allergeninjektion mehr an als die Ohren der PBS-Kontrolle, aber auch hier tritt nach 2 Stunden die stärkste Schwellung auf ($2,21\mu\text{m}$), schließlich schwillt das Ohr wieder ab.

In der Gruppe der mit Cetorelix behandelten Mäuse hält sich die Schwellung über 6 Stunden in etwa ähnlichen Bereichen ($2,9\text{-}3,3\mu\text{m}$) um dann nach 24 Stunden zwar deutlich vermindert, aber dennoch nicht nahe des Nullwertes zu sein.

Am stärksten schwellen die rechten Ohren der Kontrolltiere an: Schon nach 1 Stunde liegen die Werte über denen der PBS-Injektion sowie der Werte der mit Tamoxifen behandelten Tiere. Während auch deren Maximalwert nach 2 Stunden ($2,21\mu\text{m}$) deutlich unter dem Wert der Kontrolltiere nach 2 Stunden ($2,52\mu\text{m}$) liegt, erreicht die Schwellung der unbehandelten Tiere nach 6 Stunden ihr Maximum ($6,3\mu\text{m}$). Auch nach 24 Stunden sind die Ohren deutlich geschwollen ($5,34\mu\text{m}$). Einen ähnlichen Verlauf mit etwas weniger ausgeprägten Schwellungen (Maximum nach 6 Stunden mit $4,19\mu\text{m}$) zeigt die Gruppe der mit Cyproteronacetat behandelten Tiere.

Auch hier wird der Östrogeneinfluss deutlich, zwar sind die Unterschiede während der Sofortreaktion, die mit Degranulation der Mastzellen und Freisetzung von Mediatoren wie Histamin und Prostaglandinen zu Schwellung führt nach 1 Stunde nicht signifikant, dennoch hat das Ausmaß der Ohrschwellung sowohl bei den Tamoxifen behandelten Tieren als auch bei den mit Cetorelix behandelten Tieren nach 2 Stunden das Maximum erreicht. Die Ohrhaut der mit Cyproteronacetat behandelten Tiere sowie die der unbehandelten Kontrolltiere erreichen ihr Maximum erst nach 6 Stunden und schwellen auch dann nur sehr langsam wieder ab. Die nach der PBS-Injektion auftretende Schwellung ist auf Zellinfiltration nach Gewebsverletzung zurückzuführen, allergische Immunvorgänge können hier ausgeschlossen werden.

Das im Ausmaß wenig verschiedene Anschwellen der Ohrhaut nach einer Stunde lässt auf einen sehr geringen Einfluss von Östrogenen auf die Mastzell-vermittelte Sofortreaktion schließen. Zwar konnten Zaitso et al. in-vitro nachweisen, dass bei Vorhandensein von Estradiol Mastzellen stärker degranulieren (28), dies kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht in-vivo bestätigt werden. Die schnelle Mastzell-vermittelte Sofortreaktion ist meist nach etwa einer Stunde abgeschlossen, die später auftretenden Maxima in der Cyproteronacetatgruppe sowie in der Kontrollgruppe sind demnach der T-Zell vermittelten Immunantwort zuzuschreiben. T-Zellen, die auf die Antigenpräsentation durch Antigen präsentierende Zellen (APZ) angewiesen sind, gelangen Zeit verzögert und erst nach

erfolgter Antigenpräsentation in Lymphorganen in die Haut des Ohrs. Sowohl CD4⁺-T-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen wirken dann durch die Synthese von Interleukinen und dadurch Stimulation von Makrophagen sowie andere nicht-lytische Aktivität am Ort des Geschehens und gewährleisten somit ein Fortbestehen der Schwellung, die auch nach 24 Stunden noch deutlich ist.

Aus den früh eintretenden Schwellungsmaxima der Tiere aus der Tamoxifen- und Cetrorelixgruppe, beide hatten die niedrigsten Serumestradiolwerte kann geschlossen werden, dass Östrogene auch die T-Zell-Antwort über die Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichts und damit periphere CD4⁺-T-Zellen hinaus modulieren. So bleibt eine intensive T-Zellinfiltration wie in den anderen Gruppen vermutet wahrscheinlich aus.

Es wurde beschrieben, dass die Entstehung naiver CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zellen durch Östrogene beeinflusst wird (29), Studien dazu diskutieren jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Zur Klärung der veränderten T-Zell-Mechanismen unter Östrogeneinfluss müssten weitere detaillierte Studien folgen.

Die oben genannten Ergebnisse festigen die Annahme, dass Östrogene verstärkenden Einfluss auf die humorale sowie auf die lokale Immunantwort haben. Die intensiviertere Produktion an Immunglobulinen sowie die dazu stimulierende Verschiebung des T_H1/T_H2-Gleichgewichts in Richtung T_H2 konnten durch Modulation an den Östrogenrezeptoren vom Typ α aufgehoben werden. Es wurden Immunglobuline in viel geringerem Ausmaß synthetisiert und die T-Helferantwort verschob sich zu Gunsten der T_H1-Antwort. Die lokale Immunantwort war bei den mit Tamoxifen behandelten Tieren deutlich geringer ausgeprägt. Es kam zwar zu einer Schwellung des Ohrs nach intradermaler Allergeninjektion, dennoch blieb eine ausgeprägte T-Zellantwort wie sie bei den unbehandelten Kontrolltieren nach 6 Stunden zu beobachten war aus.

Die mit Cetrorelix behandelten Tiere wiesen zwar deutlich niedrigere Immunglobulintiter auf als die Tiere der Kontrollgruppe, ihr Zytokinmuster war jedoch wenig aufschlussreich. So waren in den Milzzellüberständen der Kulturen nach Allergenstimulation die Milzzellen nach OVA-Stimulation sowohl hohe Gehalte der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 nachweisbar, ebenso produzierten sie aber auch höchst signifikante Mengen des T_H1-Zytokins IFN γ .

Auch in dieser Gruppe blieb eine intensive T-Zellantwort nach lokaler intradermaler Allergenchallenge aus. Zu den Wirkungsmechanismen von Cetrorelix im Immunsystem müssen zur Klärung der Ergebnisse weitere Studien folgen. Vergleichsdaten von Studien zu Cetrorelixanwendung in der immunologischen Forschung liegen derzeit nicht vor.

Die immunprotektive Wirkung von Testosteron die anhand niedriger Immunglobulintiter bei männlichen Balb/c Mäusen in der vorangegangenen Studie gezeigt werden konnten, ließen

sich bei weiblichen Balb/c Mäusen nicht reproduzieren. Die mit dem Testosteronantagonisten behandelten Tiere wiesen stets niedrigere jedoch ähnliche Immunglobulintiter wie die unbehandelten Kontrolltiere auf. Ginge man von einer immunprotektiven Wirkung sehr geringer Mengen Testosteron im weiblichen Organismus aus, müssten die Titer der Kontrolltiere unter denen der mit dem Rezeptorblocker Cyproteronacetat behandelten Tiere liegen.

Bei beiden Gruppen war die lokale Immunantwort nach 6 Stunden am deutlichsten, was für eine intensive T-Zellantwort spricht.

Zusammenfassend ist Tamoxifen in der Lage ist, die allergische Immunantwort durch die Modulation am ER α drastisch abzuschwächen und die immunologisch relevanten Wirkungen von Östrogen teilweise fast vollständig zu blockieren. ER α kann als immunologisch relevanter Östrogenrezeptor bezeichnet werden und sollte als neuer therapeutischer Ansatzpunkt in der Allergologie eingehender untersucht werden.

5.3. Tiere im Mausmodell der Atopischen Dermatitis

Der vorangegangene Versuch zeigt einen mildernden Einfluss des Selektiven Östrogenrezeptormodulators (SERM) Tamoxifen auf die humorale und lokale Immunantwort. Aufgrund der aus epidemiologischen Studien hervor gehenden höheren Inzidenz der Atopischen Dermatitis (AD) in der weiblichen Bevölkerung liegt ein Einfluss von Östrogenen auch auf die Ausbildung und Ausprägung dieser schweren chronischen Hauterkrankung nahe.

Die AD ist gekennzeichnet durch komplexe Mechanismen und Interaktionen zwischen systemischer und lokaler Immunantwort. Die mit 70-80% am häufigsten vorkommende extrinsische Form der AD geht mit IgE-vermittelter Sensibilisierung einher, betroffene Patienten weisen höhere IgE-Antworten sowie verstärkte T_H2-Zytokinproduktion auf. Während eines akuten Schubs zeigen die Patienten lokale Symptome wie Trockenheit, Juckreiz und Rötung der betroffenen Hautstellen die infolge der Zellinfiltration der Haut mit aktivierten T-Zellen auftritt.

Ziel des Versuchs war es, Tamoxifen im Mausmodell der Atopischen Dermatitis einzusetzen um die systemisch bereits gezeigten Eigenschaften des SERM auf lokaler Ebene zu bestätigen.

Die Ergebnisse sind eindeutig. Obwohl nicht signifikant, sind die Gesamt-IgE-Titer in der Gruppe der mit Tamoxifen behandelten Mäuse geringer als die der Kontrolltiere. Beim allergenspezifischen OVA-IgE und OVA-IgG₁ wird schließlich sogar Signifikanzniveau erreicht. Die Ergebnisse des vorangegangenen Versuchs konnten somit reproduziert

werden, Tamoxifen hebt den allergiefördernden Einfluss von Östrogenen durch Modulation am ER α weitgehend auf.

Auch das T_H2-Zytokin IL-4 wird in signifikant geringerer Menge in der Milzzellkultur nach Stimulation mit OVA produziert, IL-5 und IL-6 ebenfalls, wenn auch nicht signifikant.

Daraus lässt sich schließen, dass Tamoxifen in der akuten Phase der Atopischen Dermatitis die dem klinischen Bild zugrunde liegenden systemischen immunologischen Vorgänge deutlich abschwächt.

Das klinische Bild des akuten Schubs wurde mit Hilfe eines SkinScores verglichen der die Kriterien Schwellung, Rötung, Verkrustung, Trockenheit und Ausmaß anhand der Wertigkeiten 0-3 (keine Symptome, milde Symptome, mittelschwere Symptome, schwere Symptome) qualifiziert. Die klinische Ausprägung der Atopischen Dermatitis ist bei den mit Tamoxifen behandelten Mäusen signifikant milder als bei den unbehandelten Kontrolltieren. Letztere wiesen teilweise offene Stellen in der Haut auf, die auf starken Juckreiz hinweisen.

Die bei Patienten meist verdickte Epidermis ist ebenfalls ein Kriterium für die Ausprägung der AD. Die Messung der Epidermisdicke im histologischen Schnitt der Haut zeigte, dass die Epidermisdicke der mit Tamoxifen behandelten Mäuse signifikant weniger verdickt war, als die der Kontrolltiere.

Die Quantifizierung der Zellinfiltrate in der Haut wurde mittels immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 und anschließender Zellzählung mit Hilfe der „Axio Vision“ Software am Computer durchgeführt. Hierbei werden gefärbte Zellen pro Feld gezählt und aus mehreren Feldern der Durchschnitt gebildet.

Die mit Tamoxifen behandelten Tiere wiesen sowohl signifikant weniger CD4⁺-Zellen als auch CD8⁺-Zellen in der Haut auf.

Die Mastzellzahlen der beiden Gruppen unterscheiden sich unwesentlich: Hier waren bei der Gruppe der mit Tamoxifen behandelten Tiere durchschnittlich 3,6 Mastzellen pro Feld zu zählen, bei der Kontrollgruppe 3,2.

Die Ergebnisse der Histologie zeigen einen antiinflammatorischen Effekt von Tamoxifen auf die klinische Manifestation der Atopischen Dermatitis mit entsprechenden Veränderungen der humoralen und zellulären Mechanismen der Immunantwort. Der Einfluss von Östrogen auf die humorale sowie die lokale Immunantwort wird durch Modulation am Östrogenrezeptor ER α verändert.

Der im vorangegangenen Versuch angedeutete Einfluss von Östrogenen auf die T-Zellantwort zeigt sich erneut in der durch Tamoxifen verringerten T-Zellinfiltration der Haut. Die zugrunde liegenden Mechanismen wie beispielsweise verringerte T-Zelleinwanderung müssen in weiteren Studien näher untersucht werden.

Die Anzahl der Lymphozyten pro Mausmilz ist nicht signifikant verschieden, wohl ist aber der Anteil der T-Zellen an der Gesamtzahl prozentual gesehen signifikant höher.

Dass Östrogen ebenfalls die T-Zelldifferenzierung beeinflusst wird aus den Ergebnissen des Versuchs deutlich. Auf welcher Ebene dies geschieht und welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Unter Berücksichtigung der komplexen Mechanismen und Interaktionen aller Bestandteile des Immunsystems lassen sich aus der gesamten Arbeit folgende Rückschlüsse ziehen: Geschlechtshormone haben auf den verschiedenen Ebenen des Immunsystems Einfluss auf das Entstehen und die Ausprägung allergischer Erkrankungen.

Es konnte gezeigt werden, dass Testosteron bei männlichen Balb/c Mäusen das Ausmaß der humoralen Immunantwort hemmt und Orchiektomie diese Wirkung aufhebt. Diese immunprotektive Wirkung des Testosterons konnte bei weiblichen Balb/c Mäusen jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der Einfluss von Östrogenen auf die allergische Immunantwort zeigte sich auf verschiedenen Ebenen: Weibliche Balb/c Mäuse produzieren deutlich mehr Immunglobuline als die männlichen Tiere, das Gleiche gilt für die Immunglobulinsynthese stimulierenden T_H2 -Zytokine. Ovariectomie konnte den stimulierenden Einfluss von Östrogen auf das Immunsystem in dieser Studie nicht aufheben, mögliche Gründe hierfür wurde bereits an anderer Stelle diskutiert.

Auch die Mechanismen bei der lokalen Immunantwort werden durch Östrogene beeinflusst: Obwohl die Sofortreaktion auf ein injiziertes Allergen in allen Gruppen vergleichbar war, konnte gezeigt werden, dass bei mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen behandelten Tieren sowie Tieren die mit dem GnRH-Antagonisten behandelt wurden, die T-Zellantwort ausblieb. Diese sorgte in den Gruppen, in denen Östrogen frei wirken konnte für eine deutliche T-Zellantwort.

Die Beeinflussung der T-Zellen durch Östrogene wird auch im Atopischen Dermatitis Modell deutlich: Die mit Tamoxifen behandelten Tiere wiesen das mildere klinische Bild auf und auch in der Histologie konnte gezeigt werden, dass Tamoxifen die Infiltration der Haut mit T-Zellen abschwächt. Die Bedeutung der bei diesen Mäusen gefundenen T-Zellsubsets muss in weiteren Studien geklärt werden.

5.4. Abschließende Betrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hoffnung auf einen neuen Ansatz bei der Therapie atopischer Erkrankungen. Selbstverständlich müssen die zugrunde liegenden

Mechanismen weiterhin detailliert untersucht werden, gerade im Hinblick auf den Einsatz von Tamoxifen. Dieses seit geraumer Zeit in der Brustkrebstherapie eingesetzte Medikament kann Thrombosen verursachen und Endometriumkarzinome durch fehlende Gewebsspezifität auslösen. Auch Resistenzen gegen das in der Langzeittherapie eingesetzte Präparat sind bekannt. Vor diesem Hintergrund sollte vor allem über den Einsatz von Raloxifen nachgedacht werden, einem gewebspezifischen Präparat ohne die genannten Nebenwirkungen und Resistenzen.

Die lokale Anwendung von Tamoxifen zur Therapie der Atopischen Dermatitis wäre ein Weg die Gefahr von Nebenwirkungen zu vermindern, es ist jedoch nicht klar, welchen Effekt Tamoxifen ohne vorangegangene Metabolisierung in der Leber hat. Auch hier müsste zunächst Forschung im Mausmodell erfolgen.

Das Ziel der Forschung im Mausmodell soll die Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus sein und bleiben. Hierbei bleibt kritisch abzuwägen ob die Ergebnisse trotz der geringen Datenmenge zur Endokrinologie der niederen Säuger Rückschlüsse auf den Menschen zulassen.

6. Zusammenfassung

Die Inzidenz allergischer Erkrankungen hat in den vergangenen Jahrzehnten stark zugenommen und damit das Interesse der Forscher an der genauen Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen. Die Ursachen der bereits in den 80er Jahren beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschiede bei allergischen Erkrankungen sind bis heute nicht bis ins Detail geklärt. Die vorliegende Arbeit sollte zur Klärung der Rolle von Östrogen Testosteron im Bezug auf die Entwicklung und klinischen Manifestierung allergischer Erkrankungen beitragen.

Zunächst wurden die geschlechtsspezifischen Unterschiede im Mausmodell untersucht. Hormonkompetente männliche und weibliche Balb/c Mäuse sowie ovariectomierte und orchektomierte Balb/c Mäuse wurden mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und das Ausmaß ihrer humoralen Immunantwort mittels Bestimmung von IgE, allergenspezifischem IgE und IgG₁ sowie Bestimmung der Zytokinsynthese in vitro untersucht.

In weiterführenden Untersuchungen wurde mittels hormonselektiver Antagonisten versucht, die Wirkung von Östrogenen und Testosteron gezielt zu beeinflussen. Es wurden weibliche Balb/c Mäuse mit dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix behandelt um die Östrogensynthese auf der Hypophysen-Hypothalamus-Achse zu blockieren, eine weitere Gruppe erhielt den Selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen und eine dritte Gruppe erhielt den Testosteronrezeptorantagonisten Cyproteronacetat. Die Tiere wurden erneut mit OVA sensibilisiert, zur Bestimmung der humoralen Immunantwort wurden Immunglobuline und Zytokine bestimmt, die lokale Immunantwort wurde mittels Hauttest (Ear Swelling) untersucht.

In einem dritten Versuch wurde im Atopischen Dermatitis (AD) Mausmodell untersucht, welchen Einfluss Tamoxifen auf das Entstehen und die Manifestation der Atopischen Dermatitis hat. Diese chronische, juckende Hauterkrankung wird sehr viel häufiger bei Mädchen und Frauen diagnostiziert und die zugrunde liegenden Ursachen sind auf erhöhte IgE-Antworten und Imbalancen in der Zytokinproduktion der T-Lymphozyten gekennzeichnet. Weibliche Balb/c Mäuse wurden mit Tamoxifen behandelt, mit OVA sensibilisiert und schließlich wurde durch Kontakt der Haut mit Allergen ein Ekzem ähnlich dem während eines akuten Schubs der Atopischen Dermatitis ausgelöst. Die humorale Immunantwort wurde über die Bestimmung der Immunglobulinantworten sowie des Zytokinmusters analysiert, zusätzlich wurde die Lymphozytenpopulation in der Milz qualitativ bestimmt. Das klinische Bild des ausgelösten Ekzems wurde mittels SkinScore untersucht, immunhistochemische Färbungen der Haut sollten Aufschluss über die Infiltration der Haut mit CD4⁺- CD8⁺- und Mastzellen geben.

Die Bestimmung der geschlechtsabhängigen Immunantwort zeigt, dass Östrogen einen stimulierenden Einfluss auf das Entstehen allergischer Erkrankungen hat. Dies drückte sich nicht nur in deutlich höheren Antikörperantworten bei den weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen Tieren aus, sondern auch im Aufheben dieser Effekte durch die Behandlung mit dem SERM Tamoxifen.

Die immunprotektive Wirkung von Testosteron konnte bei männlichen Tieren gezeigt werden, die im Vergleich zu den hormoninkompetenten männlichen Tieren sehr viel niedrigere Antikörperantworten ausbilden.

Der Einfluss von Östrogen auf die Differenzierung von T-Lymphozyten ist bisher nicht eindeutig geklärt. In den oben genannten Studien konnte gezeigt werden, dass die T-Zellantwort nach lokaler Injektion des Allergens bei mit Tamoxifen behandelten Mäusen sowie mit Cetrorelix behandelten Mäusen gehemmt ist. Dies zeigte sich nicht nur im Ausbleiben der Spätreaktion nach lokaler Allergenapplikation am Ohr, sondern auch in der geringeren T-Zellinfiltration der Haut Tamoxifen behandelter Tiere im Mausmodell der Atopischen Dermatitis. Korrelierend wurden Imbalancen im Zytokinmuster sowie in der B- und T-Zell-Ratio festgestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Östrogene bei der Entwicklung und der Manifestierung allergischer Erkrankungen eine begünstigende Rolle spielen. Die regulatorischen Eigenschaften von Testosteron konnte bei männlichen Tieren gezeigt werden, welche Rolle dies aber in weiblichen Individuen spielt konnte nicht geklärt werden. Vor allem gewebsspezifische pro- und anti-inflammatorische Interaktionen von Östrogenen müssen im komplexen Entstehen atopischer Erkrankungen näher untersucht werden um therapeutische Ansätze mit Antiöstrogenen für Patienten zu verifizieren.

7. Summary

Influence of Sex Hormones on the Allergic Immune Response

The incidence of allergic diseases has been increasing during the past decades; consequently researchers have concentrated their efforts in determining the exact underlying mechanisms. A possible influence of sex hormones on allergic diseases has already been described as far back as the nineteen eighties, but lacking detailed clarification.

The present work is expected to clarify the role of estrogens and testosterone in development and clinical manifestation of allergic diseases.

The sex dependent differences have been investigated in a mouse model. Intact and neutered male and female Balb/c mice have been sensitised with Ovalbumin (Ova) and their humoral immune response was later measured by ELISA, determining IgE, allergen-specific IgE and IgG as well as cytokine production in vitro.

Furthermore, female Balb/c mice have been treated with hormone-selective antagonists to influence the impact of estrogens and testosterone: Cetrorelix (a GnRH-Antagonist) was used to block estrogen production on the hypothalamus-pituitary-axis, another group obtained Tamoxifen (a selective estrogen receptor modulator, SERM) treatment and the third group was treated with cyproterone acetate, a testosterone antagonist. Mice were sensitised using the same protocol, the humoral immune response and the cytokine production was determined after assessing the local immune response via ear swelling.

In the third trial, the influence of Tamoxifen on the development and manifestation of Atopic Dermatitis (AD) was investigated in a mouse model. AD is a pruritic inflammatory skin disease and is diagnosed in female individuals more often than in male individuals. The underlying reasons are: increased IgE-Levels and imbalances in cytokine production of T-Lymphocytes.

Female Balb/c mice were treated with Tamoxifen and sensitized with Ova. Subsequently, allergen was applied epicutaneously in order to initiate AD-like symptoms. The humoral immune response was assessed by determining the immunoglobulin response as well as the cytokine pattern. The clinical outcome of the eczema was evaluated via Skin Score, immunohistochemical staining of skin samples were made to obtain information about the infiltration of the skin with CD4⁺, CD8⁺ and mast cells.

The assessment of the sex-dependent allergic immune response indicates a stimulating influence on the development of allergic diseases. This could be shown in clearly higher antibody responses in female animals compared with male animals as well as in successful compensation of these effects via treatment with Tamoxifen.

The immunoprotective impact of testosterone could be shown in male animals which had considerably lower antibody titers compared to neutered male animals.

An impact of estrogens on T-Cell differentiation could not be demonstrated. In the trials mentioned it became apparent that the T-Cell response was restrained in Tamoxifen treated mice as well as in Cetrorelix treated mice after injecting allergen locally. This could be shown in the absence of a late-phase reaction after application of allergen intradermally and in the reduced T-Cell infiltration in the skin of Tamoxifen treated mice running in the AD-mouse model. Correlating, imbalances in cytokine pattern and B-T-Cell-ratio have been found.

The results indicate a promoting influence of estrogens on the development and manifestation of allergic diseases. Regulatory qualities of testosterone became clear in male animals, yet its role in female individuals couldn't be clarified.

Especially tissue-specific pro and anti-inflammatory interactions of estrogens have to be investigated intensively in the complex development of atopic diseases in order to verify a therapeutic approach for patients.

A Anhang

A.1 Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
Alum	Aluminiumhydrochlorid
APC	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
E1	Estron
E2	Estradiol
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogenrezeptorbindungselement
FcεR I	Fcε Rezeptor I
FcεR II	Fcε Rezeptor II
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
GPgR	G-Protein gekoppelter Peptidhormonrezeptor
HRP	Horse raddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICD	International Classification of Diseases (Internationale Klassifikation der Krankheiten)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin

KG	Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
OVA	OVAalbumin
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Tween 20
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
TBS	Tris buffered saline
T _H	T-Helfer
TMB	Tetramethylbenzidin

A.2 Abbildungen

Abb. 1: Zell-Zell-Interaktionen beim Klassenwechsel	3
Abb. 2: Regulation der Geschlechtshormonproduktion	7
Abb. 3: Perhydrocyclopentanophenanthren, Grundgerüst der Steroidhormone	8
Abb. 4: Die Steroidsynthese beim Menschen.....	8
Abb. 5: Die humanen Östrogenrezeptoren α und β	9
Abb. 6: Strukturformel von Cetrorelix	11
Abb. 7: Strukturformel von Tamoxifen.....	11
Abb. 8: Strukturformel von Cyproteronacetat	12
Abb. 9: Die Hautschichten	14
Abb. 10: Sequentielle Aktivierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen im Verlauf der atopischen Dermatitis	15
Abb. 11: Versuchsprotokoll des ersten Versuchsteils.....	18
Abb. 12: Versuchsprotokoll des zweiten Versuchsteils	19
Abb. 13: Versuchsprotokoll des dritten Versuchsteils.....	19
Abb. 14: Prinzip des RIA.....	20
Abb. 15: Prinzip des Sandwich-ELISA	21
Abb. 16: Messung der Epidermisdicke.....	25
Abb. 17: Quantitative Bestimmung der Zellinfiltrate.....	26
Abb. 18: Gesamt-IgE, Versuchsteil 1	28
Abb. 19: OVA-IgE-Antworten, Versuchsteil 1	28
Abb. 20: Relatives OVA-IgE, Versuchsteil 1	28
Abb. 21: OVA-IgG ₁ , Versuchsteil 1	29
Abb. 22: T_H2 -Zytokinantworten, Versuchsteil 1	30
Abb. 23: Serumestradioltiter, Versuchsteil	30
Abb. 24: Gesamt-IgE, Versuchsteil 2	32
Abb. 25: OVA-IgE, Versuchsteil 2	32
Abb. 26: OVA-IgG ₁ , Versuchsteil 2	33
Abb. 27: T_H2 -Zytokinantwort sowie T_H1 -Zytokin IFN γ , Versuchsteil 2	34
Abb. 28: Ear Swelling	35
Abb. 29: Serumestradiolgehalt, Versuchsteil 2.....	36
Abb. 30: Gesamt-IgE, Versuchsteil 3	38
Abb. 31: OVA-IgE, Versuchsteil 3	38
Abb. 32: OVA-IgG ₁ , Versuchsteil 3	39
Abb. 33: T_H2 -Zytokinantworten, Versuchsteil 3	39

Abb. 34: Gesamtzahl Lymphozyten pro Milz	40
Abb. 35: B-T-Zell-Ratio pro Milz.....	40
Abb. 36: Klinische Manifestation des Ekzems.....	41
Abb. 37: Infiltration der Dermis mit CD8 ⁺ - Zellen.....	43
Abb. 38: Infiltration der Dermis mit CD4 ⁺ - Zellen.....	44
Abb. 39: Infiltration der Dermis mit Mastzellen	45
Abb. 40: Epidermisdicke der Haut.....	46

A.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektronischer Zellzähler	CASY 1, Modell TT	Schärfe Labortechnik
ELISA-reader	Dynex mrx version 1.33	Dynatech laboratories
ELISA-washer	Columbus plus	TECAN
FACS	FACS Calibur	Bectordickinson
Inkubator	HERA cell	Heraeus
Kamera	Cybershot DSC T5	Sony
Kyrostat	Shandon Cryotome FSE	Thermo scientific
Mikroskop	Axioskop	Zeiss
Mikroskop und Kamera	Axioplan2 Imaging und Axio Cam HRc	Zeiss
Sterilbank	HERA safe	Heraeus
Wärmeplatte	NuOVA II	Thermolyne
Wasserbad		Memmert
Zentrifugen	Biofuge fresco Multifuge 4KR 5417R Minifuge RF	Heraeus Heraeus Eppendorf Heraeus

A.4 Software

Software	Hersteller
Axio Vision LE Applcation 4.5.0.0	Carl Zeiss Imaging Solutions
Revelation Version G 3.2	Dynatech
SPSS 12.0G for windows	SPSS inc.
Flow Cytomix Pro 2.1	Bendermed Systems
Excel 2007	Microsoft

A.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial		Hersteller
Injektionskanüle	0,45 x 25mm, 26G x 1', Sterican 100	B Braun
Spritze	1ml	BD
Filterpapierscheiben	Für Finn Chambers 7,5 mm Durchmesser	Epitest Ltd Oy
Finn Chambers		Epitest Ltd Oy
kohäsive elastische Fixierbinde	Peha-haft® 2cm x 20 cm	Hartmann
Vinyl Einbettschalen	Tissue Tek	Sakura
O.C.T. medium	Tissue Tek	Sakura
Objektträger	Super frost plus	R.Langenbrinck
Deckgläschen		Menzel-Gläser
Zellsiebe	100µm und 50µm	BD falcon
Einmalrasierer		Wilkinson

96-well Platte		NUNC
24-well Zellkulturplatte		BD falcon
Reagiergefäße, Pipettenspitzen und weiterer Laborbedarf wurden über Eppendorf, Falcon und Sarstedt bezogen.		

A.6 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz		Hersteller
Albumin	From chicken egg white Grade V	SIGMA
Antikörperlösung	Dako RealTM	Dako
Avidin-Biotin blocking Kit		Vector
BMS820FF mouse	TH1/TH2 10plex	Bendermed Systems
Bovines Serumalbumin	Fraction V	Serva
Detection System Alkaline Phosphatase/RED	Dako REAL K 5005	Dako
Dulbecco's PBS	Without Ca, Mg	PAA Laboratories
Eosin-Phloxim-Lösung		Dr. K. Hollborn&Söhne
Fetales Kälberserum		Biochrom
Goat serum normal	DakoCytomation, X0907	Dako
Imject Alum		Pierce
Ionomycin	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	Sigma
Kaisers Glycerin Gelatine		Merck
Ketamin®	Ketaminhydrochlorid (50mg/ml)	DeltaSelect
Milchpulver		Roth
Papanicolaou Lösung	1a Harris' Hämatoxylinlösung	Merck
Penicillin/Streptomycin	10.000E/10.000µg/ml	Biochrom
ProTaqS Tris Kochsalz-Puffer-Konzentrat	pH 7,6	BIOCYC
RBC lysis buffer		e-Bioscience
Rompun®	Xylazinhydrochlorid (2%)	Bayer
RPMI	1640 medium; w 2.0 g/l NaHCO ₃ , w stable glutamine	Biochrom
TMB	Tetramethylbenzidindihydrochlorid	Sigma T3405
Toluidinblau O		Merck

A.7 Antikörper und Sekundäre Reagenzien

Antikörper		Hersteller
Purified Rat anti-mouse	Klon 84.1c (6.1mg/ml)	DRFZ
Purified mouse IgE, κ	Klon C38.2; immunglobulin isotype standard (0,5mg/ml)	BD Pharmingen
Rat anti-mouse IgE-Biotin	Klon EM 95.3 (604µg/ml)	DRFZ
Purified Rat anti-mouse IgE	Klon R35-72 (0,5mg/ml)	BD Pharmingen
OVA-Biotin	2mg/ml	DRFZ
IgG ₁ -Biotin	Klon 85-1 (500µg/ml)	BD Pharmingen
Purified hamster anti-mouse CD28	Klon 37.51 (2mg/ml)	DRFZ
Purified rat anti-mouse CD4 (L3T4)	Klon RM4-5 (31.25µg/ml)	BD Pharmingen
Purified rat anti-mouse CD8a	Klon 53-6.7	BD Pharmingen
Goat anti-rat Ig"-biotin	Polyklonal (0,5mg/ml)	BD Pharmingen

A.8 Puffer und Lösungen

OVA/Alum	Für die i.p. Applikation: OVA (0,2µg/ml in PBS), 1:2 emulgiert in Alum Für e.c. Applikation: OVA (10µg/ml in PBS) 1:2 emulgiert in Alum
Ketamin/Xylazin-Narkoselösung	3:1:6 in NaCl
Natriumcarbonatpuffer	45mM NaHCO ₃ 9,1 M Na ₂ CO ₃
Lösungen für ELISA Block	3% Milchpulver in PBS 3% BSA in PBS
TMB-Puffer (pH 5,5)	51,4 mM Na ₂ HPO ₄ 24,3 mM C ₆ H ₈ O ₇
Nährmedium, modifiziert	RPMI 1640; w 2.0g/l NaHCO ₃ W stable glutamine 10%FCS 100 U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin
PBS/EDTA	PBS 2 mM EDTA
Ionomycin	Ionomycin 2 mMol in DMSO

Referenzen

1. Pschyrembel. 2002. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. de Gruyter NY,
2. Janeway C, T.P., Walport M, Schlomchik M. 2005. Immunobiology, the Immune System in Health and Disease. Garland Science, New York,
3. C.Janeway, P.T., M.Walport and M.Schlomchik. 2005. Immunobiology, the Immunsystem in Health and Disease. Garland Science NY,
4. M.Worm, B.M.H. 1997. Molekulare Mechanismen der IgE-Regulation. *Der Hautarzt* 773-782.
5. Worm M, H.B.M. 1997. Molekulare Mechanismen der IgE-Regulation. *Der Hautarzt* 48:773-782.
6. Siebenkotten G, E.C., Wabl M, Radbruch A. 1992. The murine IgG1 / IgE class switch programm. *Eur J Endocrinol* 22:1827-1834.
7. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 3:721-732.
8. Charpin, D., D. Vervloet, H. Razzouk, J.P. Kleisbauer, and A. Lanteaume. 1988. Sex-difference in reporting allergic symptoms. *Clin Allergy* 18:509-510.
9. D'Souza, D.N., R.E. Harlan, and M.M. Garcia. 1999. Sexual dimorphism in the response to N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and morphine on behavior and c-Fos induction in the rat brain. *Neuroscience* 93:1539-1547.
10. Montefort, S., H.M. Lenicker, S. Caruna, and H. Agius Muscat. 1998. Asthma, rhinitis and eczema in Maltese 13-15 year-old schoolchildren -- prevalence, severity and associated factors [ISAAC]. International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Clin Exp Allergy* 28:1089-1099.
11. Zannolli, R., and G. Morgese. 1997. Does puberty interfere with asthma? *Med Hypotheses* 48:27-32.

12. Almqvist, C., M. Worm, and B. Leynaert. 2007. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA(2)LEN review. *Allergy*
13. Ninan, T.K., and G. Russell. 1992. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *Bmj* 304:873-875.
14. Siroux, V., F. Curt, M.P. Oryszczyn, J. Maccario, and F. Kauffmann. 2004. 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* 114:491-498.
15. Chandler, M.H., S. Schuldheisz, B.A. Phillips, and K.N. Muse. 1997. Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and beta 2-receptors. *Pharmacotherapy* 17:224-234.
16. Pauli, B.D., R.L. Reid, P.W. Munt, R.D. Wigle, and L. Forkert. 1989. Influence of the menstrual cycle on airway function in asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 140:358-362.
17. Hanley, S.P. 1981. Asthma variation with menstruation. *Br J Dis Chest* 75:306-308.
18. Skobeloff, E.M., W.H. Spivey, R. Silverman, B.A. Eskin, F. Harchelroad, and T.V. Alessi. 1996. The effect of the menstrual cycle on asthma presentations in the emergency department. *Arch Intern Med* 156:1837-1840.
19. Withers, G.D., P. Kubes, G. Ibbotson, and R.B. Scott. 1998. Anaphylaxis-induced mesenteric vascular permeability, granulocyte adhesion, and platelet aggregates in rat. *Am J Physiol* 275:H274-284.
20. Kalogeromitros, D., A. Katsarou, M. Armenaka, D. Rigopoulos, M. Zapanti, and I. Stratigos. 1995. Influence of the menstrual cycle on skin-prick test reactions to histamine, morphine and allergen. *Clin Exp Allergy* 25:461-466.
21. Hamano, N., N. Terada, K. Maesako, G. Hohki, T. Ito, T. Yamashita, and A. Konno. 1998. Effect of female hormones on the production of IL-4 and IL-13 from peripheral blood mononuclear cells. *Acta Otolaryngol Suppl* 537:27-31.
22. Hamano, N., N. Terada, K. Maesako, T. Numata, and A. Konno. 1998. Effect of sex hormones on eosinophilic inflammation in nasal mucosa. *Allergy Asthma Proc* 19:263-269.
23. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki. 1996. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 106:410-415.
24. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki. 1999. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42:328-337.
25. Viselli, S.M., K.R. Reese, J. Fan, W.J. Kovacs, and N.J. Olsen. 1997. Androgens alter B cell development in normal male mice. *Cell Immunol* 182:99-104.
26. da Silva, J.A. 2002. Relationships between glucocorticoids and gonadal steroids in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966:158-165.
27. Vliagoftis, H., V. Dimitriadou, W. Boucher, J.J. Rozniecki, I. Correia, S. Raam, and T.C. Theoharides. 1992. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int Arch Allergy Immunol* 98:398-409.
28. Zaitso, M., S.-I. Narita, K.C. Lambert, J.J. Grady, D.M. Estes, E.M. Curran, E.G. Brooks, C.S. Watson, R.M. Goldblum, and T. Midoro-Horiuti. 2007. Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-[alpha] and calcium influx. *Molecular Immunology* 44:1977-1985.
29. Straub, R.H. 2007. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 28:521-574.
30. Sthoeger, Z.M., N. Chiorazzi, and R.G. Lahita. 1988. Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. *J Immunol* 141:91-98.
31. Grossman, C. 1985. Interactions between the Gonadal-Steroids and the Immune System. *Science* 227:257-261.

32. Hellings, P.W., P. Vandekerckhove, R. Claeys, J. Billen, A. Kasran, and J.L. Ceuppens. 2003. Progesterone increases airway eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 33:1457-1463.
33. Astorquiza, M.I., E. Maldonado, and C. Cisternas. 1991. Sex modifies IgE antibody response. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1:49-52.
34. Yamatomo, T., M. Okano, T. Ono, E. Nakayama, T. Yoshino, A.R. Satoskar, D.A. Harn, Jr., and K. Nishizaki. 2001. Sex-related differences in the initiation of allergic rhinitis in mice. *Allergy* 56:525-531.
35. Riffo-Vasquez, Y., A.P. Ligeiro de Oliveira, C.P. Page, D. Spina, and W. Tavares-de-Lima. 2007. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 37:459-470.
36. Chi, L., W. Zhou, A. Prikhozhan, C. Flanagan, J.S. Davidson, M. Golembo, N. Illing, R.P. Millar, and S.C. Sealfon. 1993. Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 91:R1-6.
37. Hedin, U., G. Daum, and A.W. Clowes. 1998. Heparin inhibits thrombin-induced mitogen-activated protein kinase signaling in arterial smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 27:512-520.
38. Willars, G.B., A. Heding, M. Vrecl, R. Sellar, M. Blomenrohr, S.R. Nahorski, and K.A. Eidne. 1999. Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization. *J Biol Chem* 274:30146-30153.
39. Van Goor, F., L.Z. Krsmanovic, K.J. Catt, and S.S. Stojilkovic. 2000. Autocrine regulation of calcium influx and gonadotropin-releasing hormone secretion in hypothalamic neurons. *Biochem Cell Biol* 78:359-370.
40. Darby, S., J. Stockley, M.M. Khan, C.N. Robson, H.Y. Leung, and V.J. Gnanapragasam. 2007. Expression of GnRH type II is regulated by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 14:613-624.
41. Labrie, F., V. Luu-The, A. Belanger, S.X. Lin, J. Simard, G. Pelletier, and C. Labrie. 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol* 187:169-196.
42. Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87:905-931.
43. Enmark, E., M. Peltto-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjold, and J.A. Gustafsson. 1997. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265.
44. Menasce, L.P., G.R. White, C.J. Harrison, and J.M. Boyle. 1993. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 17:263-265.
45. Kato, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masushige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima, D. Metzger, and P. Chambon. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491-1494.
46. emea, E.M.A. 13. April 1999. Cetrotide - Cetrorelixacetate. In UK.
47. Bayer-Schering. 2006. Fachinformation eines Arzneimittels. In.
48. Leung, D.Y., M. Boguniewicz, M.D. Howell, I. Nomura, and Q.A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113:651-657.
49. Leung, D.Y., and T. Bieber. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet* 361:151-160.
50. Levy, R.M., J.M. Gelfand, and A.C. Yan. 2003. The epidemiology of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 21:109-115.
51. Beltrani, V.S., and M. Boguniewicz. 2003. Atopic dermatitis. *Dermatol Online J* 9:1.
52. Larsen, F.S., N.V. Holm, and K. Henningsen. 1986. Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 15:487-494.
53. Soderhall, C., I. Marenholz, T. Kerscher, F. Ruschendorf, J. Esparza-Gordillo, M. Worm, C. Gruber, G. Mayr, M. Albrecht, K. Rohde, H. Schulz, U. Wahn, N. Hubner,

- and Y.A. Lee. 2007. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biol* 5:e242.
54. H.Kerl, C.G., L.Cerroni und H.H. Wolff. 2003. Histopathologie der Haut. Springer Verlag, Berlin Heidelberg,
 55. Tamer, E., G. Ikizoglu, G.G. Toy, and N. Alli. 2003. Comparison of nickel patch test reactivity in phases of the menstrual cycle. *Int J Dermatol* 42:455-458.
 56. Goncalo, M., H.S. Oliveira, C. Monteiro, I. Clerins, and A. Figueiredo. 1999. Allergic and systemic contact dermatitis from estradiol. *Contact Dermatitis* 40:58-59.
 57. Panhans-Gross, A., H. Gall, M. Dziuk, and R.U. Peter. 2000. Contact dermatitis from estradiol in a transdermal therapeutic system. *Contact Dermatitis* 43:368-369.
 58. Koch, P. 2001. Allergic contact dermatitis from estradiol and norethisterone acetate in a transdermal hormonal patch. *Contact Dermatitis* 44:112-113.
 59. Corazza, M., L. Mantovani, A. Montanari, and A. Virgili. 2002. Allergic contact dermatitis from transdermal estradiol and systemic contact dermatitis from oral estradiol. A case report. *J Reprod Med* 47:507-509.
 60. Karpuzoglu-Sahin, E., Y. Zhi-Jun, A. Lengi, N. Sriranganathan, and S. Ansar Ahmed. 2001. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. *Cytokine* 14:208-217.
 61. Maret, A., J.D. Coudert, L. Garidou, G. Foucras, P. Gourdy, A. Krust, S. Dupont, P. Chambon, P. Druet, F. Bayard, and J.C. Guery. 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 33:512-521.
 62. Erlandsson, M.C., E. Gomori, M. Taube, and H. Carlsten. 2000. Effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on thymus, T cell reactivity, and inflammation in mice. *Cell Immunol* 205:103-109.
 63. Dhaher, Y.Y., B.D. Greenstein, M.A. Khamashta, and G.R. Hughes. 2001. Effects of oestradiol and the oestrogen antagonist ICI 162,780 on the delayed type hypersensitivity (DTH) index and on serum levels of IgM and IgG in ovariectomised Balb/C and MRL/Mp-Lpr/Lpr mice, a model of systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmunity* 33:237-243.
 64. Sakazaki, F., H. Ueno, and K. Nakamuro. 2006. 17beta-estradiol enhances contact hypersensitivity and IFN-gamma expression in inflamed skin of BALB/c mice. *Toxicol Lett* 166:60-66.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Frau Prof. Dr. Margitta Worm (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Universitätsmedizin Berlin) und Herrn Prof. Dr. Michael F.G. Schmidt (Institut für Immunologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin) für die Ermöglichung der Arbeit, die Überlassung des Themas sowie die freundliche und engagierte Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit und das Ermöglichen der Teilnahme am „Sex and Gender in Medicine Symposium“ im Oktober 2007.

Frau PD Dr. Katja Prella (Bayer-Schering-Gruppe) für die großzügige Bereitstellung von Cetrorelix und die schnelle und effektive Hilfe bei Fragen und Engpässen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rohde für die Bestimmung des 17 β -Estradiols im Institut für Klinische Endokrinologie der Charité und die ausgezeichnete und geduldige Diskussion über die Ergebnisse.

Frau Dr. Magda Babina für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit beim Veröffentlichen der Daten sowie die Begutachtung dieser Dissertation sowie Dr. Salima Mrabet-Dhabi für ihre persönliche und fachliche Unterstützung.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe für die wunderbare Zeit an der Charité, die beeindruckende Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen, Problemen bei der Versuchsdurchführung und äußeren Form der schriftlichen Arbeit. Hier gilt mein besonderer Dank Dennis Ernst, Carolin Heunemann und Pascal Klaus sowie Björn Hartmann, die mir über die Arbeit hinaus das Forschersein zur großen Freude gemacht haben.

Daniel und Dietmar, Ann-Marijke und Jil, die mich während der Entstehung der Arbeit durch ihre Freundschaft und ein Leben fernab des Labors immer wieder motiviert haben.

Dr. Markus und Susanne Käppeler für mein tiermedizinisches Dasein und das Erinnern daran in Zeiten des Labors.

Von Herzen möchte ich meiner Familie für die bedingungslose und fürsorgliche Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung danken und Rainer für mein großes Glück.

Selbständigkeitserklärung:

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Düsseldorf, den 03.09.2008

Friederike A. Kirn