

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von
Hauerschen Kinderspital

Forschungszentrum Kubus
des Dr. von Hauerschen Kinderspitals

Direktor: Prof. Dr. Dr. med. Christoph Klein

Thema der Dissertation:

Differenzierung der Th17-Zellen im
Nabelschnurblut unter Berücksichtigung
mütterlicher Atopie

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Carmen Hinnerwisch

aus
Nürnberg

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. Bianca Schaub

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Przybilla
Priv.Doz. Dr. Matthias F. Kramer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Atopie.....	6
1.1.1. Definition	6
1.1.2. Asthma als Beispiel für atopische Erkrankung im Kindesalter.....	6
1.1.3. Bedeutung mütterlicher Atopie	8
1.2. Das Immunsystem	9
1.2.1. Das angeborene Immunsystem.....	9
1.2.2. Das erworbene Immunsystem.....	10
1.2.3. Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems	10
1.2.3.1. Interleukine	10
1.2.3.2. Interferone.....	11
1.2.3.3. TNF- α	11
1.2.4. Die frühe Entwicklung des Immunsystems	12
1.2.5. TLR/NOD-Signalweg.....	13
1.2.6. Mitogene Stimulation	15
1.3. Th17-Zellen.....	16
1.3.1. Immunregulation von Th17-Zellen.....	16
1.3.2. Rolle der Th1 und Th2-Zellen.....	16
1.3.3. Warum gibt es überhaupt Th17-Zellen?	17
1.3.4. Abgrenzung und Plastizität von Th17-Zellen.....	19
1.3.5. Differenzierung von Th17-Zellen	20
1.3.6. Der Transkriptionsfaktor der humanen Th17-Zellen: RoRC	21
1.3.7. Th17-relevante Zytokine.....	22
1.3.7.1. IL-17.....	22
1.3.7.2. IL-21.....	23
1.3.7.3. IL-23.....	23
1.3.8. Rolle der Th17-Zellen im Nabelschnurblut	24
1.3.9. Rolle von Th17-Zellen bei Asthma und anderen atopischen Erkrankungen	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1. Charakteristika der PAULINA Kohorte	26
2.2. PAULINA Protokoll.....	27

2.2.1. Blutentnahme	27
2.2.1.1. Detektion mütterlicher Zellen im Nabelschnurblut durch Karyotypisierung	27
2.2.2. Isolierung der weißen Blutkörperchen aus dem Nabelschnurblut.....	28
2.2.3. Zellkultur und Stimulation	29
2.3. Genexpression.....	30
2.3.1. RNA-Extraktion.....	30
2.3.2. cDNA-Gewinnung.....	31
2.3.3. Primerdesign	31
2.3.3.1. Leitzytokin der Th17-Zellen: IL-17.....	33
2.3.3.2. Transkriptionsfaktoren der Th17-Zellen: RoRC3 und RoRC4.....	35
2.3.3.3. IL-21.....	40
2.3.3.4. IL-23R	42
2.3.4. Real-time RT-PCR.....	46
2.3.5. Protokoll der real-time RT-PCR.....	48
2.3.6. Gelelektrophorese	50
2.4. Statistik	52
2.4.1. Auswertung der Schmelzkurven und ct-Werte des Biorad iCyclers.....	52
2.4.2. Auswertung im Gruppenvergleich	55
2.4.3. Statistische Testverfahren.....	56
3. Ergebnisse.....	57
3.1. Epidemiologie	57
PAULINA-Studie.....	57
3.2. Realtime-RT-PCR	59
3.2.1. Test auf Normalverteilung	60
3.2.2. Normalverteilung aller untersuchten Gene	61
3.2.3. Normalverteilung der Gene in CBMC in der atopischen Untergruppe	61
3.2.4. Normalverteilung der Gene in CBMC von nicht-atopischen Müttern	62
3.2.5. Deskriptive Statistik der untersuchten Gene.....	63
3.2.5.1. Übersichtstabelle der kompletten Gruppe.....	63
3.2.5.2. Deskriptive Statistik der untersuchten Gene in CBMC von nicht- atopischen Müttern	64
3.2.5.3. Deskriptive Statistik der untersuchten Gene in CBMC von atopischen Müttern.....	65

3.2.6. Statistik der detektierbaren Gene in den Nabelschnurblutproben	66
3.2.7. Expression in den Th17-relevanten Genen nach Stimulation.....	67
3.2.8. Vergleich der atopischen mit der nicht-atopischen Gruppe	70
3.2.8.1. Genexpression von IL-17	73
3.2.8.2. RoRC3	74
3.2.8.3. RoRC4	75
3.2.8.4. IL-23R	76
3.2.9. Zensierte Daten	76
3.2.10. Ppg- und LpA-Stimulation.....	81
3.2.11. Korrelationen	82
4. Diskussion.....	85
4.1. Überblick der Hauptergebnisse	85
4.2. Geringe Expression von Th17-Zellen im Nabelschnurblut	86
4.3. Proliferation von Th17-Zellen im Nabelschnurblut nach mitogener/mikrobieller Stimulation	87
4.4. Bedeutung der Atopie	91
4.4.1. Expression der Th17-relevanten Gene unter Berücksichtigung mütterlicher Atopie	92
4.4.2. Berücksichtigung von elterlichen Einflussfaktoren.....	92
4.4.3. Epidemiologische Faktoren unter Berücksichtigung mütterlicher Atopie .	95
4.5. Bewertung der PAULINA-Studie	96
4.6. Schlussfolgerungen.....	97
4.7. Ausblick.....	100
5. Zusammenfassung.....	102
6. Anhang.....	105
6.1. Tabellenverzeichnis	105
6.2. Abbildungsverzeichnis	107
6.3. Abkürzungsverzeichnis	110
6.4. Epidemiologische Daten	112
6.5. Einverständniserklärung zur Teilnahme an der PAULINA-Studie	113
6.6. Fragebogen zur PAULINA-Studie (perinatal)	114
6.7. Danksagung.....	119
6.8. Quellenverzeichnis.....	120

1. Einleitung

Im Folgenden wird der Begriff der Atopie geklärt und auf die Bedeutung atopischer Erkrankungen hingewiesen. Zum anderen wird das menschliche Immunsystem in groben Zügen vorgestellt, um auf dieser Basis ausführlich die Differenzierung und Funktion einer Untergruppe der T-Helferzellen, der Th17-Zellen, darzulegen.

1.1. Atopie

1.1.1. Definition

Der Begriff Atopie (vom griech. *atopía*: die Ortlosigkeit) beschreibt eine familiär auftretende Neigung zu allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen, sobald der Organismus über Haut oder Schleimhäute in Kontakt zu eigentlich harmlosen Umweltstoffen tritt. Die Sensibilisierung, also die immunpathologische Erstreaktion mit einem Antigen, verläuft in der Regel asymptomatisch und damit für die Betroffenen unerkannt. Oftmals kommt es zu dem Phänomen der Kreuzallergie, wobei der Organismus der atopischen Patienten auf mehrere Allergene, die strukturell ähnliche Epitope aufweisen, mit einer Überempfindlichkeitsreaktion antwortet. Im Gegensatz zum allergischen Kontaktekzem können bei der Atopie die Symptome auch an nicht-exponierten Körperstellen („ortlos“) auftreten. Bei Atopikern werden charakteristischerweise pathologisch hohe Immunglobulin-E-Werte (IgE) im Serum nachgewiesen.

Zu den atopischen Erkrankungen werden die allergische Rhinitis /Rhinokonjunktivitis, die Neurodermitis (atopisches Ekzem) und das allergische Asthma gezählt.

1.1.2. Asthma als Beispiel für atopische Erkrankung im Kindesalter

Atopische Erkrankungen zählen in den Industrieländern zu den häufigsten chronischen Krankheiten des Kindesalters. Oftmals leiden Kinder nicht nur unter atopischem Asthma mit erhöhtem Gesamt-IgE, manche weisen unabhängig davon auch erhöhte Konzentrationslevel von spezifischen Serum-IgE auf oder reagieren in Hauttests empfindlich auf Umweltallergene [1].

Ätiologisch spielen eine genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse eine Rolle. Die von Strachan 1989 [2] beschriebene Hygienehypothese ist eine gängige, oftmals modifizierte Theorie, die besagt, dass die Zunahme an atopischen Erkrankungen in der westlichen Welt mit den durch Wohlstand verbesserten hygienischen Bedingungen und kleineren Familien zusammenhängen könnte. Häufige Infektionen eines Kindes innerhalb einer Familie, bedingt durch eine größere Geschwisteranzahl, mögen in früheren Zeiten einen Schutz vor atopischen Erkrankungen bewirkt haben. Eine Weiterentwicklung dieser Hygienehypothese besagt, dass die Exposition des Neugeborenen oder frühkindlichen Organismus gegenüber mikrobiellen Stimuli (TLR-Agonisten) einen Umschwung weg von der Th2- und hin zur Th1-vermittelten Immunantwort bewirkt [3]. Dadurch wird das Risiko, eine allergische Erkrankung zu entwickeln, gemindert. Dementsprechend zeigen epidemiologische Daten, dass in den reichen Industrieländern mit hohen Hygienestandards gewöhnliche Infektionskrankheiten zwar seltener werden, Allergien und Autoimmunkrankheiten jedoch im inversen Verhältnis dazu an Häufigkeit zunehmen [4].

Wenn man die USA als Musterbeispiel für ein industrialisiertes Land anführt, so steht dort Asthma schon an 3. Stelle der Klinikeinweisungen bei Patienten unter 18 Jahren, direkt nach Pneumonie und traumatischen Verletzungen.

Von knapp 74.000 Kindern in den USA wurde bei 13,9% schon einmal die Diagnose Asthma gestellt, 9,7% von ihnen hatten zum Zeitpunkt des Interviews noch Asthma [5]. Insgesamt ist laut dem „Centre for Disease Control and Prevention“ die Prävalenz von Asthma von 3,5% im Jahre 1980 auf 5,5% im Jahre 2003 angestiegen, in einer weiterführenden Untersuchung wurde für den Zeitraum von 2001 bis 2009 ein Anstieg der Prävalenz von 7,4% auf 8,6% ermittelt [6].

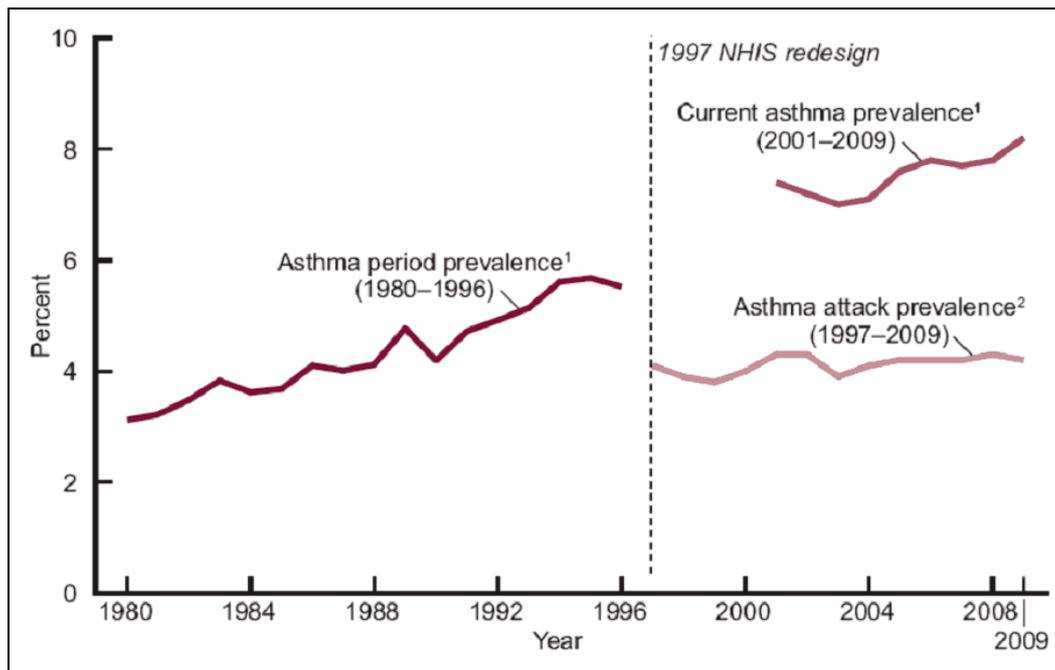


Abb. 1: US National Health Statistics Report: Asthmaprävalenz von 1980-1996, Prävalenz von Asthmaattacken und akute Asthmaprävalenz in allen Altersgruppen bis 18 Jahre (nach Akinbami, Moorman et al. 2011)

Nach bisherigen Schätzungen der GINA (Global Initiative for Asthma) sind aktuell weltweit 300 Mio. Menschen von Asthma betroffen (GINA Report 2009).

Die wirtschaftliche Belastung durch ärztliche Behandlung und spätere berufliche Leistungsausfälle ist ebenso unbestritten wie der Leidensdruck der schon früh chronisch erkrankten Kinder. Zur Behandlung des Asthmas existieren bereits evidenzbasierte, wirkungsvolle und fein abgestufte Therapiepläne. Wichtig wäre in diesem Fall ein Fortschritt in der Prävention von Asthma und ganz allgemein von atopischen Erkrankungen. Die immunologischen Mechanismen zur Entstehung von Atopie sind hierbei noch nicht im Detail verstanden. Im Rahmen der PAULINA-Studie soll ein Beitrag zum weiteren Verständnis dieser Erkrankungen geleistet werden.

1.1.3. Bedeutung mütterlicher Atopie

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die an der Th17-Differenzierung beteiligten Gene im Nabelschnurblut atopischer Mütter im Vergleich zu dem nicht-atopischer Mütter Unterschiede in der Expression aufweisen. Grundlage dieser Fragestellung ist die Tatsache, dass mütterliche und elterliche Atopie einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung kindlicher Atopie darstellt [7]. So konnte im

Nabelschnurblut von Kindern atopischer Mütter bereits eine Einschränkung der T-regulatorischen Zellen (Tregs) festgestellt werden: nach Stimulation waren sowohl die Anzahl der Tregs in den mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts (CBMC) als auch die Expression ihrer Marker GITR und LAG3 bei der Gruppe der atopischen Mütter vermindert. Auch eine funktionelle Einschränkung der Tregs konnte nachgewiesen werden. Bei dieser starken Wirkung der mütterlichen Atopie auf das Immunsystem ihrer Neugeborenen war es interessant zu sehen, dass die väterlicher Atopie (zumindest in dieser Studie) keinen Einfluss auf die Ergebnisse nimmt [8]. Eine rein genetisch bedingtes höheres Atopierisiko scheint dadurch etwas unwahrscheinlicher. Auch wenn genaue Mechanismen noch zu klären sind, so scheint es doch eindeutig, dass das intrauterine Zytokinmilieu (das sich bei atopischen und nicht-atopischen Müttern unterscheidet) einen prägenden Einfluss auf die Entwicklung des kindlichen Immunsystems nimmt. Gut erforscht ist bereits die Th2-vermittelte Immunreaktion bei Atopie.

Im Folgenden soll untersucht werden, ob mütterliche Atopie einen Einfluss auf die Th17-Zellen des neonatalen Immunsystems hat.

1.2. Das Immunsystem

Im Folgenden soll ein kurzer allgemeiner Einblick in die Funktionsweise des Immunsystems gegeben werden und eine detailliertere Charakterisierung der Th17-Zellen erfolgen.

1.2.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Anteilen, die in einer komplexen Kettenreaktion unmittelbar auf Krankheitserreger reagieren können. Zu diesem angeborenen Immunsystem gehören zelluläre Bestandteile (Granulozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen) sowie humorale (zahlreiche Zytokine und das kaskadenartige Komplementsystem mit seinem Membranangriffskomplex). Diese Anteile des Immunsystems werden auch „unspezifisch“ genannt, da sie nicht zielgerichtet auf bestimmte Krankheitserreger reagieren. Auch anatomische und physiologische Barrieren wie intakte Epithelien und ein bakterienfeindliches pH-Milieu stellen eine Form der unspezifischen Immunabwehr dar. Bakterien können

über Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt werden und der Phagozytose zum Opfer fallen oder durch Sauerstoffmetabolite und das Komplementsystem außer Gefecht gesetzt werden. Auf die Toll-like-Rezeptoren wird in Kapitel 1.2.5 noch näher eingegangen. Durch die Freisetzung von Zytokinen werden außerdem wichtige Teile der Entzündungsreaktion vermittelt [9].

1.2.2. Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem hat sich phylogenetisch aus dem angeborenen Immunsystem heraus entwickelt. Es ist wesentlich komplexer aufgebaut und arbeitet effizienter und zielgerichtet gegen bestimmte Pathogene, daher rührt auch die alternative Bezeichnung als „spezifisches“ Immunsystem.

Zu den zellulären Bestandteilen zählen die T-Zellen mit ihren Untergruppen, auf die im Kapitel 1.3 noch näher eingegangen wird. Grob unterscheidet man die T-Zellen nach der Ausbildung spezifischer Oberflächenrezeptoren (CD = *cluster of differentiation*). Es gibt CD4+-Lymphozyten (auch T-Helferzellen/Th-Zellen genannt) und CD8+-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen).

Zur humoralen Abwehr werden die B-Zellen gezählt, die von CD4+-Lymphozyten zur klonalen Expansion aktiviert werden. Deren Tochterzellen entwickeln sich entweder zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen.

1.2.3. Zytokine – Botenstoffe des Immunsystems

Zytokine sind im Gewebe und Blut vorkommende Glykoproteine, welche die Aktivität, Differenzierung und Proliferation von Zellen beeinflussen. Man unterscheidet 4 Untergruppen von Zytokinen: Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF) und koloniestimulierende Faktoren (CSF). Für das Verständnis der vorliegenden Arbeit werden nun die ersten 3 Untergruppen kurz vorgestellt, da in späteren Kapiteln die Rede von Th17-assoziierten Zytokinen wie IL-17, IFN- γ oder TNF- α sein wird.

1.2.3.1. Interleukine

Interleukine dienen, wie der Name schon andeutet, der Kommunikation zwischen den Leukozyten (lat. *inter*= zwischen; lat. *leukos*= weiß), aber auch zwischen

anderen Zellen des Immunsystems wie z.B. den Makrophagen. Insgesamt sind bis heute über 30 verschiedene Interleukine bekannt, die nach Reihenfolge ihrer Entdeckung und/oder ihrer Funktion benannt wurden (z.B. IL-1, IL-1 β , IL-2 usw.) Sie haben sehr unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem. Manche können die Immunantwort dämpfen und die Proliferation von Zellen verhindern, andere regen zu Wachstum, Reifung und Teilung von Immunzellen an.

In dieser Doktorarbeit werden jene Interleukine vorgestellt, die in Zusammenhang mit der Differenzierung von Th17-, Th1- und Th2- Zellen stehen.

1.2.3.2. Interferone

Interferone sind (zum Teil glykosylierte) Proteine, die hauptsächlich von Lymphozyten, Makrophagen oder Fibroblasten gebildet werden. Je nach Bildungsort unterscheidet man alpha-, beta-, gamma- und tau-Interferone. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Abwehr von viralen Infektionen und Tumorerkrankungen. IFN- γ zum Beispiel wird von Th1-Zellen gebildet (nachdem diese Kontakt mit antigenpräsentierenden Makrophagen hatten) und verstärkt wiederum in einem positiven Rückkopplungsmechanismus die bakterizide und antimikrobielle Effizienz der Makrophagen.

1.2.3.3. TNF- α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird hauptsächlich von Makrophagen produziert und ausgeschüttet. Es findet sich aber auch in Lymphozyten, Mastzellen, Fibroblasten, Neuronen, Herzmuskelzellen und Endothelzellen. TNF- α ist ein 233 Aminosäuren langes, transmembranöses Protein und regelt die Aktivität verschiedener Immunzellen. Durch TNF- α können Apoptose induziert, Proliferation und Differenzierung von Zellen angeregt und weitere Zytokine ausgeschüttet werden. Potente Stimuli für die Freisetzung von TNF- α sind der Kontakt mit Lipopolysacchariden, bakteriellen Antigenen und IL-1 β . Hohe systemische Konzentrationen an TNF- α können eine Schocksymptomatik auslösen. Therapeutisch finden TNF- α -hemmende Medikamente wie Etanercept oder Infliximab Anwendung. Etanercept wird beispielsweise bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen oder Psoriasis eingesetzt, Infliximab wird zusätzlich auch zur Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen verwendet.

1.2.4. Die frühe Entwicklung des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem entwickelt sich schon im Alter von 3-4 Wochen mit embryonalen pluripotenten erythroiden und granulomakrophagischen Vorläuferzellen. In der 4. Gestationswoche wandern diese Progenitorzellen zur Leber, die ab einem Gestationsalter von 5-6 Wochen zum Hauptort der Hämatopoese wird. In der fetalen Leber können schon in Woche 7 proliferierende Prothymozyten als Vorläufer der späteren T-Zellen gefunden werden. Die Prothymozyten exprimieren den T-Zell-Marker CD3 in Woche 10, zuvor unterscheiden sie sich durch den frühen T-Zell-Marker CD7 von der myeloiden oder erythroiden Zelllinie. Thymus, Milz und Knochenmark spielen ab der 11./12. Woche eine Rolle in der Hämatopoese.

In den Wochen 18-24 kommen in der Milz B-Zellen, T-Zellen und Monozyten/Makrophagen zu gleichen Anteilen vor. Die T-Zellen der Milz reagieren in diesem Stadium schon mit Proliferation auf Stimulation mit dem Mitogen PHA. Daher wird die Milz schon im Gestationsalter von 18 Wochen als voll immunkompetent angesehen. Als ein Ort der extrathymischen Differenzierung von T-Zellen wird der fetale Gastrointestinaltrakt angesehen.

Die IFN- γ -Produktion in Antwort auf polyklonale Stimuli steigert sich ungefähr vom 1. bis zum 5. Lebensjahr, wo schon eine mit Erwachsenen vergleichbare Konzentration an Th-Zellen erreicht wird. Im Gegensatz dazu wird die Th2-Zytokin-Antwort schon früher gesteigert, nämlich ab dem 4. Lebensmonat mit einem Gipfel in der späten Kindheit. Danach fallen die Th2-Produktionslevel auf ein erwachsenes Niveau. Im Alter von ungefähr 15 Jahren wird eine „erwachsene“ Konzentration an T-Gedächtniszellen erreicht [10].

Das Wissen über die Rolle speziell von Th17-Zellen in der Entwicklung des kindlichen Immunsystems ist noch sehr begrenzt. Auf die mögliche Rolle von Th17-Zellen im Nabelschnurblut wird später noch eingegangen.

1.2.5. TLR/NOD-Signalweg

Toll-like-Rezeptoren (TLR) werden zum angeborenen Immunsystems gerechnet. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem, wenn es darum geht zwischen „Selbst“ (also körpereigenen Strukturen) und „Nicht-Selbst“ (körperfremden Strukturen) zu unterscheiden. Es handelt sich um Rezeptoren auf antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, die Strukturbestandteile von Bakterien und Viren erkennen, welche spezifisch auf diesen Krankheitserregern vorkommen – sogenannte PAMPs (*pathogen associated patterns*). Die Aktivierung dieser TLR durch PAMPs führt im Zellkern zur Aktivierung von Genen, welche die Immunabwehr gegen diese Pathogene in Gang setzen. Seit den 90er Jahren wurden verschiedene TLRs entdeckt, die intrazellulär unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren.

In dieser Doktorarbeit spielen für die Stimulationsbedingungen in der Zellkultur hauptsächlich TLR2 und TLR4 sowie der NOD-Pathway (*nucleotide binding oligomer*) eine Rolle.

Aktivierung von TLR2 und NOD durch Peptidoglykan (Ppg)

TLR2 erkennt ein breites Spektrum an mikrobiellen Komponenten, darunter Lipoproteine wie das Peptidoglykan, mit dem bei unseren Experimenten gearbeitet wurde. Der Grund dafür, dass TLR2 eine auffallend große Zahl an Pathogenstrukturen erkennt, wird von Takeda et al. dadurch erklärt, dass der Rezeptor funktionell mit 2 weiteren TLRs (TLR1 und 6) assoziiert ist [11].

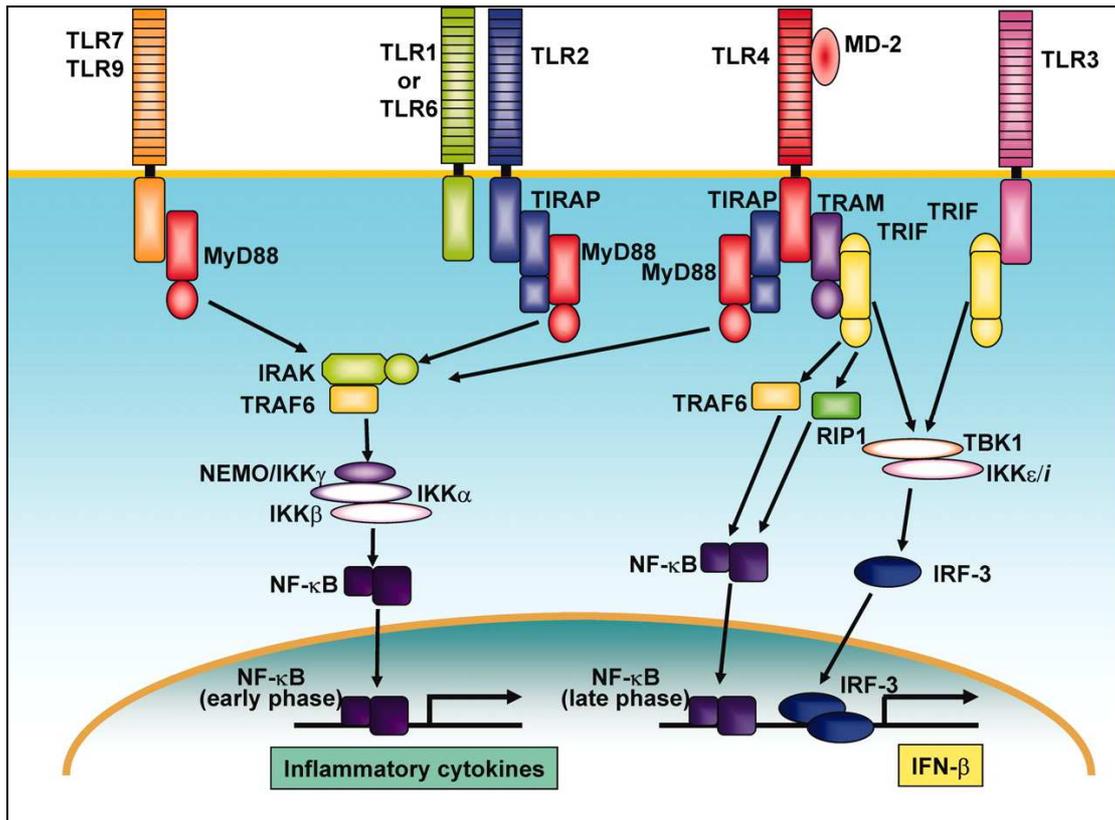


Abb. 2: Beispiel für Aktivierung einer Zelle durch TLR: TLR2 (in Komplex mit TLR1 oder TLR6) und TLR4 aktivieren u.a. den MyD88-Pathway. Gemeinsame Endstrecke ist der Transkriptionsfaktor NF-κB, der proliferationsfördernde und entzündungsvermittelnde Gene hochreguliert (aus: Takeda: „Toll-like receptors in innate immunity“ Int Immunol 2005)

Über den Transkriptionsfaktor NF-κB (*nuclear factor kappa B*) werden Gene hochreguliert, die für T-Zell-Reifung und -Proliferation wichtig sind.

Das NOD (*nucleotide binding oligomer*) liegt im Gegensatz zu den membranständigen TLRs intrazellulär. Man unterscheidet zwischen NOD1 und NOD2, die wichtig für die angeborene Immunabwehr sind. NOD erkennen bakterielles Peptidoglykan und aktivieren ebenfalls über NF-κB eine proinflammatorische Signalkaskade [12].

Aktivierung von TLR4 durch Lipid A (LpA)

TLR4 ist der wichtigste Rezeptor für die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS). LPS ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und wurde als „Endotoxin“ bereits vor über 100 Jahren von Richard Pfeiffer, einem Mitarbeiter Robert Kochs, bei der Erforschung der Choleravibrionen entdeckt [13]. Darunter fällt auch das in unseren Experimenten verwendete Lipid A (LpA), die bioaktive Komponente des LPS

und Zellwandbestandteil aller gramnegativer Bakterien. Das mikrobielle Produkt, von dem schon sehr geringe Mengen ausreichen, wird über einen Komplex von TLR4 und CD14 an die Zelloberfläche gebunden [14]. Intrazellulär werden weitere Signale – wie auch bei anderen TLR – über MyD88, die IL-1R assoziierte Kinase (IRAK) und NF- κ B vermittelt [15], was letztlich zur Inflammation und Differenzierung von T-Zellen führt.

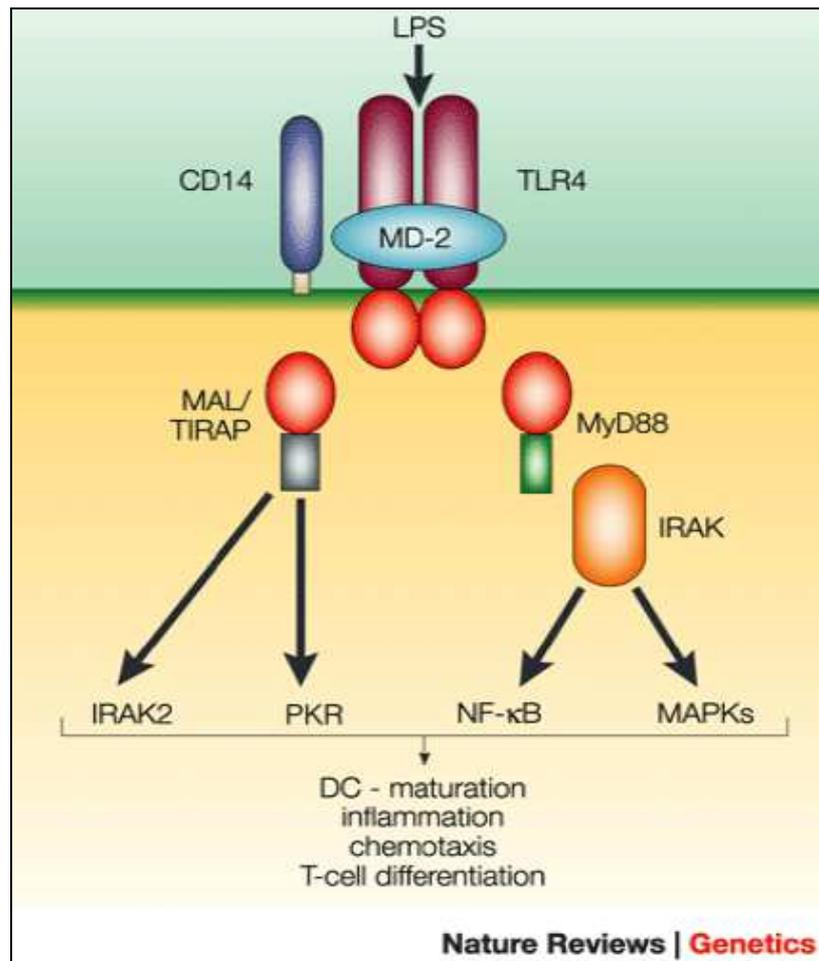


Abb. 3: TLR4-vermittelte Aktivierung von Immunzellen: über einen Proteinkomplex aus CD14 und TLR4 wird LPS/LpA an die Zelloberfläche gebunden und löst eine Aktivierung über MyD88 oder MAL/TIRAP aus. Am Ende der Kaskade steht die durch NF- κ B vermittelte Proliferation und Differenzierung von T-Zellen (aus: Buel J: „Mice, microbes and models of infection.“ Nature Reviews Genetics 2003 [16])

1.2.6. Mitogene Stimulation

Im Gegensatz zu Antigenen, die B- und T-Zellen über spezifische Rezeptoren stimulieren, bewirken Mitogene („mitose auslösend“) eine Zellproliferation über die

sogenannte polyklonale, unspezifische Aktivierung. Ein bekanntes Mitogen ist das Phytohämagglutinin (PHA), das zu den Lektinen, einer Gruppe zuckerbindender Proteine gezählt wird. PHA bindet an die in der Zellmembran verankerten Glykoproteine von T-Lymphozyten. Intrazellulär werden die Proteinkinasen MAPK (*mitogene activated protein kinases*) durch eine Serie von Phosphorylierungen aktiviert [17]. Die aktiven MAPK wandern vom Zytosol in den Zellkern, wo sie selbst Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit eine Zellproliferation auslösen [18].

1.3. Th17-Zellen

1.3.1. Immunregulation von Th17-Zellen

Eine gängiges Erklärungsmodell in der Immunologie ist seit langer Zeit, dass sich naive CD4+ T-Zellen, die noch nicht in Kontakt mit Antigenen gekommen sind, in ihrer Entwicklung zunächst in 2 große Untergruppen aufteilen. Es entstehen entweder die Effektor-T-Zellen (Th1- und Th2-Zellen), deren Bestimmung darin liegt, den Organismus vor schädlichen Fremdartigen zu schützen. Oder es entstehen die Tregs, die relevant für die Balance des Immunsystems sind. Sie sollen den Organismus vor selbstgefährdender überschießender Immunreaktion gegenüber exogenen Antigenen und vor Autoimmunreaktionen schützen.

Wie erst vor wenigen Jahren bekannt wurde, können sich aus naiven CD4+ T-Zellen nicht nur die Th1- und Th2-, sondern auch Th17-Zellen entwickeln [19] [20]. Richtungsweisend in der Entwicklung der noch undifferenzierten Zellen ist das jeweils umgebende Zytokinmilieu. Dieses Zytokinmilieu ist nicht statisch, sondern verändert sich je nach Lebensbedingung (unterschiedliche Zytokinkonzentrationen z.B. bei Entzündungsprozessen, Stress, chronischer Erkrankung, Atopiestatus, Alter...). Die Th17-Zellen erhielten ihren Namen durch ihr charakteristisches Produkt: das IL-17.

1.3.2. Rolle der Th1 und Th2-Zellen

Seit der Beschreibung des Th1/Th2-Modells von Mosmann und Coffman 1986 [21] dominierte dieses Schema die Immunologie. Vermutungen, dass es noch weitere T-Helferzellen geben könnte, wurden erst 10 Jahre später bestätigt. Bei der

Untersuchung bestimmter Zytokine (der IL-17/IL-12/IL-23-Achse, die zunächst dysregulierten Th1-Zellen zugeschrieben wurde [22] [23]) im Zuge der Ergründung pathophysiologischer Mechanismen von Autoimmunerkrankungen im Mausmodell wurden die Th17-Zellen als neues Effektor-T-Zell-Subset entdeckt [24].

Th1-Zellen werden seit langem mit der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene in Zusammenhang gebracht, also bestimmter Bakterien und Protozoen, die sich in den Phagosomen der Makrophagen dem enzymatischen Abbau widersetzen. Das wichtigste Zytokin der Th1-Zellen ist das IFN- γ . Über Th1-Zellen werden auch Autoimmunerkrankungen und chronisch inflammatorische Erkrankungen wie M. Crohn, Multiple Sklerose oder Sarkoidose vermittelt [25].

Th2-Zellen hingegen sind zuständig für den Schutz des Organismus vor Parasiten wie Helminthen und Nematoden. Auch spielen sie eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von allergischen Reaktionen und bei Asthma. Wichtige Leitzytokine für die Th2-Zellen sind IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, die z.B. bei der Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten eine Rolle spielen [26].

Th1- und Th2-Zellen koordinieren ebenfalls das „antibody-class-switching“ der B-Zellen und führen somit zu einer weiteren gezielten Abwehr der Krankheitserreger. Zusammenfassend kann man festhalten, dass das Th1/Th2-Modell sehr effizient in der Abwehr spezifischer Pathogene arbeitet [27].

1.3.3. Warum gibt es überhaupt Th17-Zellen?

Es erscheint einleuchtend, dass sich unter Evolutionsdruck mindestens eine weitere Klasse von T-Helfer-Zellen entwickeln musste, die jene Pathogene bekämpft, die von Th1- und Th2-Zellen nicht erfasst werden.

Die Th17-Zellen üben nach dem heutigen Stand der Forschung eine Anzahl teils gegenläufiger Funktionen im menschlichen Immunsystem aus. Sie wirken proinflammatorisch durch die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen und durch Chemokin- und Zytokinproduktion. Die Neutrophilenaktivierung geschieht entweder direkt über IL-8-Ausschüttung [28] oder indirekt über die Induktion von CSF und IL-8 an ortsständigen Zellen im Gewebe [29]. In den Epithelzellen der Atemwege werden durch Th17-Zellen die Produktion von Chemokinen (wie CCL-20) und Muzinen und antimikrobiellem Peptid (wie *human beta defensin-2*) [30] [31] stimuliert. Dies dient der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene. Dazu gehören vor

allem Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Citrobacter rodentium* und Pilze [32].

Entsprechendes lässt bei *Helicobacter pylori*-Infektion anhand erhöhter IL-17-mRNA und IL-17-Protein in Biopsien von Mukosaläsionen feststellen. IL-17 spielt daher eine protektive Rolle bei bakteriellen Infektionen. Bei experimentell vermindertem IL-17-Spiegel fielen auch die Neutrophilenrekrutierung und dem entsprechend die bakterielle Clearance geringer aus [33]. IL-17 scheint ein wichtiger Vermittler speziell der neutrophil dominierten Antwort auf bakterielle Infektionen zu sein [34].

Die Th17-Zellen haben auch einen Einfluss auf Autoimmunprozesse. Bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn, der eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen der westlichen Welt darstellt, wurde z.B. eine signifikant erhöhte IL-17-Gewebekonzentration im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt [35]. Auch werden sie in Zusammenhang mit Rheumatoider Arthritis, MS, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis und Uveitis gesehen [36].

Ferner spielen sie auch eine Rolle bei der Transplantatabstoßung [37].

	Protektive Funktion	Immunpathologie
Th17	<ul style="list-style-type: none"> Extrazelluläre Bakterien und manche Pilze (über die Produktion von granulozytenaktivierenden Chemokinen) 	<ul style="list-style-type: none"> Chronisch inflammatorische und Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, SLE, COPD, ...)
Th1	<ul style="list-style-type: none"> intrazelluläre Bakterien und manche Viren (über Aktivierung von Makrophagen oder zytotoxischen T-Zellen) 	<ul style="list-style-type: none"> Granulomatöse Erkrankungen Organspezifische Autoimmunerkrankungen (Hashimoto, M. Crohn, ...)
Th2	<ul style="list-style-type: none"> Helminthen (über Zytokine IL-4, IL-13 und Eosinophilenaktivierung durch IL-5) 	<ul style="list-style-type: none"> Allergie (über IL-4 und IL-13, die „IgE-switching“ bewirken und Eosinophile aktivieren)
Treg	<ul style="list-style-type: none"> Selbsttoleranz (über Supprimierung der peripheren Effektor-T-Zell-Reaktion auf Autoantigene) Kontrolle exzessiver Immunreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> Immundefizienz (durch Überaktivität) Autoimmunerkrankungen (durch Inaktivität bei Foxp3-Mutationen) Krebs (über Unterdrückung tumorspezifischer Effektor-T-Zellen)

Tabelle 1: Darstellung (vereinfacht) der protektiven und immunpathologischen Funktion der CD4+T-Zell-Untergruppen (nach Romagnani, „Regulation of T-cell response“ 2006 [38])

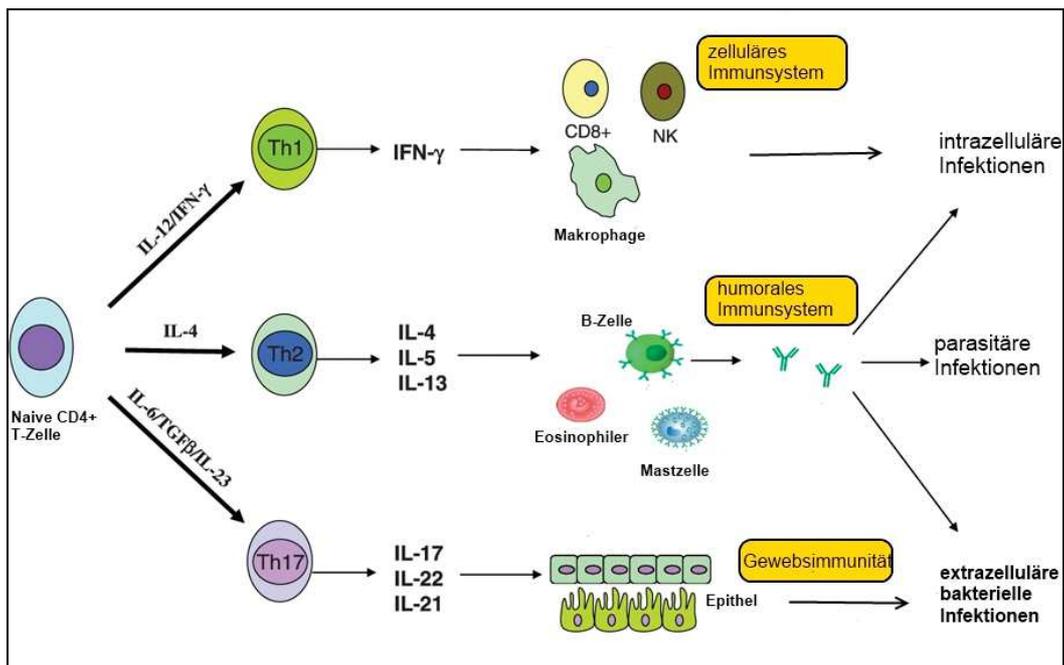


Abb. 4: Verschiedene zytokinvermittelte Differenzierungswege der naiven CD4+-T-Zelle. Zelluläre (Th1-vermittelte), humorale (Th2-vermittelte) und das Epithel betreffende Immunität (möglicherweise Th17-vermittelt); modifiziert nach Ouyang et al. 2009 [39]

1.3.4. Abgrenzung und Plastizität von Th17-Zellen

Nach Entdeckung der Th17-Zellen wurden in zahlreichen Studien die Differenzierungsbedingungen für die einzelnen T-Zell-Linien untersucht, um diese exakter von einander unterscheiden zu können. Es zeigte sich, dass bestimmte Zytokine oder Zytokinkombinationen die naiven T-Zellen in eine „Richtung“, wie z.B. zu dem Th17-Phänotyp führen und dabei zugleich die Entwicklung eines anderen T-Zell-Typs supprimieren. Einige interessante Studienergebnisse sollen hierzu erwähnt werden:

Das Th1-Produkt IFN-γ und das Th2-Produkt IL-4 supprimieren aktiv die Th17-Entwicklung [40]. Die Entwicklung der Th17-Zellen wird also dort verhindert, wo Th1- und Th2-Zellen vorherrschen. Die Wirkung von TGF-β auf naive T-Zellen wird durch IFN-γ und IL-4 aufgehoben. Dies deutet auf einen Mechanismus zur Entwicklung unterschiedlicher T-Zell-Linien hin [41].

TGF-β und IL-6 unterstützen die Differenzierung von Th17-Zellen. Dieser Prozess wird durch IL-1β und TNF-α noch verstärkt. Die Transkriptionsfaktoren T-bet (Th1)

und GATA-3 (Th2) kommen in Th17-Zellen nicht vor [42]. TGF- β ist ein wichtiger Differenzierungsfaktor sowohl für die regulatorischen T-Zellen als auch für die Th17-Zellen [43].

Dennoch gibt es auch starke Ähnlichkeiten zwischen Th17 und Th1-Zellen, so dass man möglicherweise von einer gemeinsamen Entwicklung ausgehen kann. Eine alleinige Abgrenzung der Th-Zellen untereinander durch Zytokinprofile und/oder Transkriptionsfaktoren ist schwierig, da diese Zellen je nach äußeren Einflüssen einer funktionellen Plastizität unterliegen. So gibt es Zellen, die unter bestimmten Stimulationsbedingungen (IL-12) sowohl IL-17A als auch IFN- γ sezernieren, diese werden auch als Th17/Th1-Typ zu bezeichnen [44].

Einen Einblick in eine zudem außergewöhnlich hohe Flexibilität der Effektor-T-Zellen konnten Veldhoen et al. bieten. In ihren Experimenten wurde nachgewiesen, dass selbst bereits ausdifferenzierte Th2-Zellen in einem bestimmten Zytokinmilieu (in diesem Fall TGF- β) ihren Th2-Phänotyp ändern und sich zu sogenannten „Th9-Zellen“ umprogrammieren lassen. Diese Tatsache muss bei der Zuordnung von T-Zellen zu einer bestimmten Zelllinie bedacht werden [45].

In einigen Studien, wie beispielsweise von Roark et al., werden die gamma-delta-T-Zellen als neues Subset beschrieben und in Zusammenhang mit IL-17 gebracht [46]. Eine Abgrenzung von Th17-Zellen zu anderen T-Zell-Subpopulationen kann durch Kombination von Transkriptionsfaktor, Oberflächenrezeptoren und produzierten Zytokinen möglich sein [47].

1.3.5. Differenzierung von Th17-Zellen

Wie auch bei den Th1- und Th2-Zellen hängt die Differenzierung der Th17-Zellen entscheidend von dem umgebenden Zytokinmilieu ab. Hierbei ist sowohl die Kombination also auch die Konzentration der Zytokine von Bedeutung.

Um die Differenzierung der Th17-Zellen umfassend darzustellen, muss zwischen den im Mausexperiment nachgewiesenen Differenzierungsvorgängen und den humanen unterschieden werden.

Humane Th17-Zellen werden charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors RoRC (*RAR-related orphan receptor C*) und die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR6 und IL-23R [48] sowie des Lektinrezeptors CD161 [49].

Th17-Zellen entwickeln sich aus CD4+ CD161+ Vorläuferzellen und werden durch IL-1 β und IL-23 zur weiteren Differenzierung aktiviert [50]. Auch IL-6 unterstützt die Entwicklung, wenn es zusätzlich dazugegeben wird.

Die Studienlage zu TGF- β in der humanen Th17-Differenzierung ist widersprüchlich, aber es bestehen Hinweise darauf, dass TGF- β (zumindest in geringer Dosierung) benötigt wird. Vermutlich spielt TGF- β in der Differenzierung humaner Th17-Zellen nur indirekt eine Rolle, da es die T-bet-Expression und somit die Th1-Entwicklung hemmt [51].

Bei murinen Th17-Zellen (mit dem Transkriptionsfaktor RoR γ t) spielen ebenfalls IL-6, IL-23 und IL-1 β eine wichtige Rolle in der Differenzierung. Lange wurde vermutet, dass TGF- β unabdingbar für die murinen Th17-Zellen sei. Dies wurde jedoch kürzlich in einer Studie widerlegt – auch im murinen Modell scheint TGF- β nur durch Hemmung der Th1-Entwicklung die Th17-Zellen indirekt zu fördern [52].

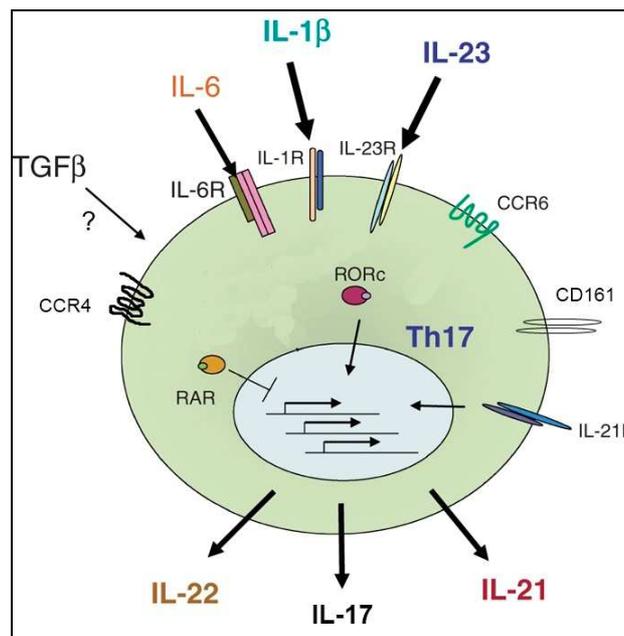


Abb. 5: Humane Th17-Zelle mit Transkriptionsfaktor, Oberflächenrezeptoren, für die Differenzierung wichtige Zytokine und Effektorzytokine; modifiziert nach Ouyang et al. 2009 [53]

1.3.6. Der Transkriptionsfaktor der humanen Th17-Zellen: RoRC

Die Abkürzung RoRC steht für *RAR-related orphan receptor C*. Der Transkriptionsfaktor RoRC bindet an die DNA und gehört zu der NR1-Unterfamilie nukleärer Hormonrezeptoren. In Mausversuchen (hier wird RoRC als RoR γ t

bezeichnet, wobei das „t“ für „Thymus“ steht) ergaben sich Hinweise darauf, dass das Protein die Expression von Fas-Ligand (ein Apoptose-auslösendes Protein) und IL-2 inhibiert [54]. Dieser Inhibitionsmechanismus ist wichtig für den Reifungsprozess von Thymozyten, den Vorläuferzellen von T-Lymphozyten.

Da von RoRC mehrere Isoformen bekannt sind (s. Methodenteil) wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Formen des Transkriptionsfaktors, genannt RoRC3 und RoRC4, untersucht.

1.3.7. Th17-relevante Zytokine

Th17-Zellen verfügen (wie auch Th1-Zellen) über T-Zellrezeptorabhängige und – unabhängige Mechanismen zur Zytokinexpression. T-Zellrezeptoren (TZR) auf Th17 sind IL-12R β 1 und IL-23R.

IL-23 bewirkt aber auch TZR-unabhängig die Ansprechbarkeit für IL-18 und IL-1, die ebenfalls eine Zytokinproduktion herbeiführen können.

Effektorzytokine von Th17-Zellen sind: IL-17A, IL-17F, das Heterodimer IL-17A/F, IL-6 und IL-21.

Insgesamt zeigt sich hier ein auf die einzelne Zelle bezogenes recht heterogenes Sekretionsmuster. Möglicherweise können die Th17-Zellen daher noch weiter in Subgruppen unterschieden werden.

1.3.7.1. IL-17

Das humane IL-17 kommt als glykosyliertes Homodimer mit einer Größe von 20-30 kD vor [55].

IL-17A und IL-17F sind eng miteinander verwandt und gleichen sich zu 50% bezüglich der Aminosäuresequenz. Die beiden Glykoproteine können auch das Heterodimer IL-17A/F bilden. IL-17A gilt als die potenteste Form von IL-17 in Bezug auf die *in vitro*-Zytokininduktion in Epithelzellen und Fibroblasten [56].

IL-17 regt Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen dazu an, IL-6, IL-8, G-CSF und Prostaglandin E2 zu sezernieren. IL-17 besitzt daher eine Wirkung auf die Reifung, Proliferation und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten. In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass IL-17 auch bei der Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen in den Bronchien unterstützend wirkt.

Die mRNA für IL-17-Rezeptoren wird von einer Vielzahl menschlicher Zelltypen exprimiert, darunter Lungenepithelzellen, B-Zellen, T-Zellen, Myelomonocyten und embryonale Nierenzellen [57].

1.3.7.2. IL-21

IL-21 ist ein Produkt der Th17-Zellen. Es wird hauptsächlich von humanen aktivierten CD4⁺-Zellen exprimiert und ist dort vor allem in den Th2- und Th17-Untergruppen zu finden. Der IL-21-Rezeptor wird auf der Oberfläche von T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen ausgeprägt. IL-21 aktiviert seine Zielgene nach dem Andocken an IL-21R über den Jak/STAT-Pathway (Jak1, Jak3, STAT3).

IL-21 hat einen Einfluss auf das allergierelevante IgE: IL-21-*knock-out*-Mäuse zeigten nach Antigenexposition höhere Level an IgE und niedrigere Level an IgG1 als Wildtypmäuse [58].

In weiteren Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit IL-21 erfolgreich die proinflammatorischen Zytokine und die IgE-Level bei allergischer Rhinitis senkt.

IL-21 wurde auch für Phase-1-Studien in der Krebsimmunotherapie eingesetzt, da es Hinweise darauf gibt, dass IL-21 die CD8⁺-Effektorfunktion verstärkt [59].

In einer Nabelschnurblutstudie zu T-Helfer-Zellen und ihrer Rolle bei Atopie wurde IL-21 durchgehend bei allen CBMC nachgewiesen, war jedoch nicht mit späterer Allergie assoziiert (gemessen an Allergietest und Symptomen im Alter von 12 und 24 Monaten). IL-21 wurde stark hochreguliert in Anwesenheit von IL-23 und IL-1 β . IL-21 im Nabelschnurblut kann abgesehen von den Th17-Zellen auch von naiven Th0-Zellen oder zirkulierenden T-folikulären Zellen stammen [60].

1.3.7.3. IL-23

IL-23 ist ein heterodimeres Zytokin der IL-12-Zytokinfamilie. Mit IL-12 hat es eine Rezeptoruntereinheit p40 gemeinsam und exprimiert mit p19 noch eine eigene spezifische Untereinheit [61]. Der Rezeptor von IL-23 setzt sich zusammen aus einer Untereinheit von IL-12R (IL12R β 1) und einer spezifischen Untereinheit (IL-23R) [62].

Von humanem IL-23 weiß man, dass es die IFN- γ -Produktion und die Proliferation von T-Zellen induziert. IL-23 gilt sogar als Hauptinduktor humaner IL-17-Produktion

[63], in naiven CD8+ T-Zellen induziert rekombinantes humanes IL-23 spezifisch die Sekretion von IL-17 [64]. IL-23 wird benötigt für die in-vivo-Differenzierung von Th17-Zellen [65]. Der IL-23-Rezeptorkomplex konnte in ruhenden naiven T-Zellen nicht nachgewiesen werden. IL-23 induziert ein spezifisches Zytokinprofil in aktivierten human naiven T-Zellen, das sich vom IL-12-Profil unterscheidet.

1.3.8. Rolle der Th17-Zellen im Nabelschnurblut

Das Immunsystem des Neugeborenen ist geprägt von den Anforderungen, die das intrauterine Milieu zuvor an den Fetus gestellt hat. Es musste während der Schwangerschaft einen Schutz vor potentiellen Infektionen bieten, vor Viren und Bakterien, die über die Plazentaschranke von der Mutter auf das Kind übergehen können [66]. Zudem sollten Th1-vermittelte proinflammatorische Immunreaktionen vermieden werden, die eine alloimmune Reaktion zwischen Mutter und Fetus hervorrufen und im schlimmsten Fall zur Abstoßung der Frucht führen können [67].

Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, warum das Immunsystem des Neugeborenen stark zu Gunsten der Th2-Immunantwort ausgerichtet ist, obwohl beide Zelltypen vorhanden und funktionstüchtig sind. Durch das verminderte Vorkommen von Th1-assoziierten Zytokinen wie TNF, IL-1 β oder IFN- γ [68] dachte man zunächst, das Immunsystem des Neugeborenen wäre generell schwächer ausgeprägt. Auch die ungenügende Immunantwort Neugeborener auf Impfstoffe in den ersten Lebenswochen und -monaten schien dies zu bestätigen – diese Reaktion ist jedoch auch Th1-vermittelt. Überraschend zeigte sich dann in einem Vergleich von Erwachsenen und Neugeborenen bezüglich der Stimulus-induzierten Produktion von Th2-spezifischen Zytokinen (wie IL-6, IL-10, IL-23), dass das frühe Immunsystem das des Erwachsenen teilweise sogar übertrifft [69].

Nach der Geburt stellt der Übergang vom sterilen intrauterinen Milieu in eine Außenwelt voller Fremdartigen die größte Herausforderung an das kindliche Immunsystem dar. Eine ausgeprägte proinflammatorische Immunantwort wäre auch hier wiederum fatal [70].

Die Produktion bestimmter Zytokine (IL-6, IL-10, IL-23) durch Monozyten und Antigen-präsentierende Zellen ist bei Neugeborenen wesentlich stärker ausgeprägt als bei Erwachsenen. Über IL-23-Signale wird auch IL-17 vermehrt gebildet. IL-23 mag eine wichtige Rolle im Immunsystem von Neugeborenen spielen und eine

IL23/IL-17-Achse eventuell einen „suboptimalen“ IL12/IFN- γ -Pathway ausgleichen [71].

1.3.9. Rolle von Th17-Zellen bei Asthma und anderen atopischen Erkrankungen

Die Rolle der Th17-Zellen bei Asthma ist derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung.

Wichtig ist zunächst eine Unterscheidung der unterschiedlichen Asthmaformen. Es gibt neben dem „typischen“ allergischen, IgE-abhängigen Asthma mit eosinophiler Entzündung auch Formen, die durch Stress, körperliche Anstrengung, Kälte, Medikamente etc. induziert werden. Auch die Pathophysiologie von Asthma ist komplex und bedingt unter Umständen verschiedenen therapeutische Ansätze. Gerade die Asthmaform, die nicht eosinophil, sondern neutrophil geprägt ist, hat sich oftmals als besonders schwerwiegend und steroidresistent erwiesen [72]. Bekannt ist, dass bei dieser neutrophilen Entzündungsreaktion der Atemwege die Th17-Zellen eine herausragende Rolle spielen [73] [74] [75].

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen schwerem bis sehr schwerem Asthma und den Th17-Zellen [76].

Auch bei der Untersuchung von atopischen Asthmatikern wurde nach Provokation mit Hausstaubmilbenextrakt eine vermehrte IL-17-Aktivität-Produktion im Vergleich mit nicht-atopischen Asthmatikern und einer Kontrollgruppe festgestellt [77].

Bei Asthmatikern war die Expression von IL-17 in kondensierter Ausatemluft deutlich hochreguliert im Vergleich zu nichtrauchenden gesunden Probanden [78].

IL-17 bei atopischem Ekzem

Auf Basis der Tatsache, dass eine verminderte IL-17-Antwort in Krankheiten mit chronischen Hautinfektionen resultiert, untersuchten Eyerich et al. die Rolle von IL-17 bei atopischem Ekzem. Sie stellten fest, dass bei Patienten mit bakteriell superinfiziertem atopischem Ekzem die IL-17-abhängige Hochregulierung von antimikrobiellem Peptid ungenügend war. Diese entspricht der klinischen Beobachtung, dass Patienten mit chronischem atopischen Ekzem an hartnäckigen *Staph.aureus*-Hautinfektionen leiden [79].

In einer Nabelschnurblutstudie wurde herausgefunden, dass hohe Konzentrationen an IL-17 mit einem höheren Risiko verbunden sind, schon im ersten Lebensmonat ein infantiles Ekzem zu entwickeln [80].

IL-17 bei allergischer Rhinitis

Im Serum von Kindern mit allergischer Rhinitis wurden im Vergleich mit gesunden Probanden erhöhte Level an IL-17 produzierenden Zellen festgestellt und in einer weiterführenden Studie ein signifikanter Zusammenhang der IL-17-Level u.a. mit der Symptomschwere dargelegt [81].

In einer japanischen Studie wurde die Hochregulierung des IL-17-Rezeptors bei Allergenexposition bei Patienten mit allergischer Rhinitis beschrieben. Jedoch handelt es sich hier um den Rezeptor IL-17beta, der vorwiegend IL-17B und IL-17E bindet [82].

2. Material und Methoden

2.1. Charakteristika der PAULINA Kohorte

Im Rahmen der PAULINA-Studie (**P**ediatric **A**lliance for **U**nselected **L**ongitudinal **I**nvestigation of **N**eonates for **A**llergies) wurden Nabelschnurblutproben von Neugeborenen aus München und Umgebung untersucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der bayerischen Landesärztekammer genehmigt.

In Zusammenarbeit mit dem Kreißsaalteam der Universitätsfrauenklinik der LMU München (Maistrasse Klinikum Innenstadt) wurden in dieser prospektiven Geburtskohortenstudie von Januar 2005 bis Februar 2007 n= 161 Probanden rekrutiert und die Blutproben innerhalb von 24h in unserem Labor weiterverarbeitet.

Es erfolgte eine Zuordnung der Probanden zu einer „atopischen“ und einer „nicht-atopischen“ Gruppe. Mütterliche Atopie wurde definiert als Arzt diagnose Asthma und/oder allergische Rhinitis und/oder atopische Dermatitis.

Durch Isolation der frischen weißen mononukleären Blutzellen und deren Exposition mit Mitogenen und Stimuli des erworbenen Immunsystems sollte festgestellt werden, wie das Immunsystem Neugeborener von atopischen und nicht-atopischen Müttern auf diese Antigene reagiert.

2.2. PAULINA Protokoll

Reagentien

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure, zur Antikoagulation der Blutproben (komplexiert Calcium)

Liquemin Heparin, ebenfalls zu Antikoagulation (verstärkt Antithrombin III)

Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) synthetisches Polymer aus Saccharose und Epichlorhydrin

Humanserum 10% (Sigma Aldrich, München, Deutschland)

PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) Phosphat-gepufferte Salzlösung, ermöglicht das Arbeiten bei konstantem pH-Wert

RPMI 1640: Zellkulturmedium für Leukozyten

Lysepuffer

Trizol: phenolhaltiges Lösungsmittel

Trypanblau: dient der Färbung von Zellen

2.2.1. Blutentnahme

Zunächst wurden die Mütter bzw. Eltern von ärztlicher Seite über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Abnahme von Nabelschnurblut (s. Anhang).

Die Entnahme des venösen Nabelschnurbluts erfolgte im Kreissaal der Universitätsfrauenklinik der LMU München direkt nach der Geburt durch eine Hebamme oder einen ärztlichen Geburtshelfer. Es wurden drei bis vier 10ml-Röhrchen von kindlichem Blut gewonnen. Die Röhrchen wurden zuvor mit dem antikoagulierenden Liquemin versehen. Zusätzlich wurde noch ein 1ml-EDTA-Röhrchen mit Nabelschnurblut abgenommen. Von der Mutter erhielten wir für unsere Untersuchungen 4,9ml Serum aus einer peripheren Vene.

2.2.1.1. Detektion mütterlicher Zellen im Nabelschnurblut durch Karyotypisierung

Um eine Kontamination des Nabelschnurblutes mit mütterlichem Blut auszuschließen, wurde in einer Pilotstudie kindliches Blut auf mütterliche Zellen untersucht.

Nach der Isolierung wurden die mononukleären Nabelschnurblutzellen mit für 30 min mit Colcemid (Invitrogen, Karlsruhe), einem Spindelgift, inkubiert. Danach wurde durch Zentrifugieren ein Niederschlag gewonnen, in 0,54%igem KCl resuspendiert und bei 37°C für weitere 25 min inkubiert.

Die Zellen wurden mit 33%iger Eisessiglösung in Methanol fixiert und auf Glasscheibchen aufgetragen. Die X- und Y-Chromosomen wurden mittels eines zweifarbigen alpha-Satelliten-Kits (Rainbow Scientific, Banbury, UK) angefärbt. Nun konnten mütterliche Zellen mit einem XX-Karyotyp von fetalen Zellen mit XY-Karyotyp unterschieden werden.

Bei diesem Vorexperiment ergab sich keine relevante Kontaminationsrate von kindlichem durch mütterliches Blut.

2.2.2. Isolierung der weißen Blutkörperchen aus dem Nabelschnurblut

Die Verarbeitung der frischen Blutproben erfolgte jeweils innerhalb von 24h.

Das Blut wurde im Verhältnis 2:1 mit PBS verdünnt und schließlich in 4 Tubes vorsichtig auf das Separationsmedium Ficoll-Hypaque pipettiert (Verhältnis Blut-PBS-Gemisch : Ficoll-Hypaque = 3 : 1). Das Trennprinzip mit Ficoll beruht auf der unterschiedlichen Schwebedichte der einzelnen Zellen oder Zellbestandteile.

Durch Zentrifugieren (30 min, 20° C, 1400 rpm) konnten die mononukleären Zellen durch den Ficoll-Gradienten von den Erythrozyten getrennt und daraufhin als oben liegender, milchigweißer Ring abpipettiert werden.

Anschließend wurden die Zellen mit dem Nährmedium RPMI gewaschen, der Überstand abzentrifugiert (10 min 20° C, 1100 rpm) und der Zellniederschlag erneut mit 10 ml RPMI gemischt.

Von diesem Gemisch wurden 50 µl entnommen und mit den gleichen Mengen Lysepuffer und Trypanblau versetzt. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop bestimmt. Die Niederschläge der erneut zentrifugierten Proben wurden daraufhin mit 10%igem Humanserum so verdünnt, dass eine einheitliche Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml vorlag.

2.2.3. Zellkultur und Stimulation

Stimuliert wurden die mononukleären Zellen mit 3 Substanzen, die verschiedentlich auf die Immunzellen wirken. In Dosisfindungsstudien wurden die Konzentrationen der verschiedenen Stimuli bereits vorher optimiert.

R e a g e n t i e n

PHA in einer Konzentration von 5µg/ml

LpA (*Salmonella minnesota*) in einer Konzentration von 0,1µg/ml

Ppg (*Staphylococcus aureus*) in einer Konzentration von 10µg/ml

(alle Sigma Aldrich, München, Deutschland)

PHA (Phytohämagglutinin)

Ein potentes Mitogen, das – im Gegensatz zu Antigenen – die T-Zellen unspezifisch zur Teilung anregt.

LpA (Lipid A)

Bei LpA handelt es sich um die Lipidkomponente des Lipopolysaccharids (LPS), die als Endotoxin von gramnegativen Bakterien wirkt.

LPS wirkt über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) v.a. auf antigenpräsentierende Zellen (APZ).

Eine Signalkombination von Antigen, Kostimulation und nachfolgender Ausschüttung entsprechender Zytokinen bewirkt eine klonale Expansion der T-Zellen. LPS ist ein bekannter Stimulus der Th1-Antwort [83].

Ppg (Peptidoglykan)

Ppg ist auch als Mureinsäure bekannt, ein Polymer aus Zuckermolekülen und Aminosäuren, das in der Zellwand vieler Bakterien vorkommt.

Es handelt sich um einen TLR2- und NOD2-Liganden (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*).

Die isolierten Lymphozyten wurden nun jeweils mit einem der drei verschiedenen Stimuli und einem unstimuliertem Medium (M) auf einer 6-Loch-Platte angesetzt. Sie wurden für 72h bei 37° C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert.

Nach 72h konnten die Zellen mit einem Scraper manuell „geerntet“ werden. Nach der Zentrifugierung wurde der Überstand für spätere Zytokinmessungen abgetrennt, bei -20° C gelagert und die übrigen Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml TRIzol (Invitrogen) versetzt. TRIzol bewirkt die Auflösung der Zellwände und wird somit zur RNA-Extraktion hinzugezogen (Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion). Die homogenisierten Proben wurden bei -80° C gelagert.

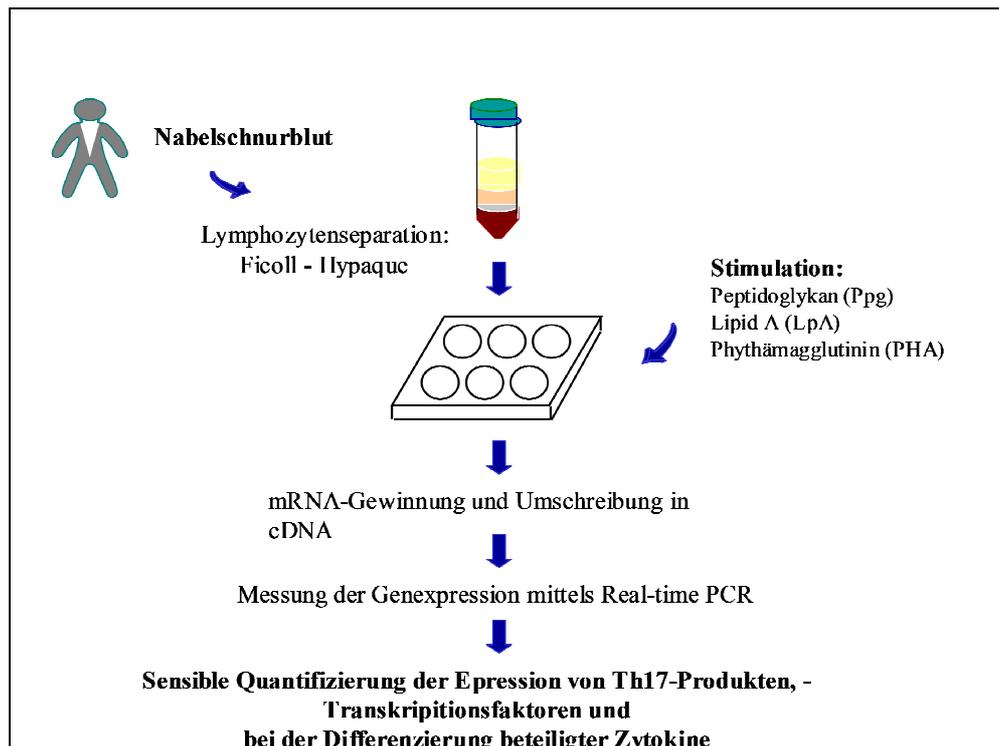


Abb. 6: kurze Darstellung der Methodik

2.3. Genexpression

2.3.1. RNA-Extraktion

Verwendetes Kit:

Qiagen QuantiTect

Reagentien:

RNA-Isolierung mit TRI Reagent
 cDNA-Umschreibung mit Reverse
 Transkriptase
 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem Auftauen der bei -80° C gelagerten Proben. Es wurden 0,2 ml des Lösungsmittels Chloroform hinzugefügt und das Gemisch nach 10 min Wartezeit gekühlt zentrifugiert (4° C, 15 min, 1200 rpm). Nach Abpipettieren der wässrigen Phase wurden 0,5 ml 100%iges Isopropanol und 1 µl Glykogen zugesetzt. Nach erneutem Zentrifugieren und Entfernung des Überstandes wurde 75%iges Ethanol beigefügt und das Ganze wieder zentrifugiert. Der RNA-Niederschlag wurde dann auf einem 42° C heißem Wärmeblock für 10-30 min getrocknet. Danach wurden die Proben mit RNase freiem Wasser resuspendiert, bei 55-60° C inkubiert und schließlich weiterverarbeitet oder wieder bei -80° C gelagert.

2.3.2. cDNA-Gewinnung

Nach dem Auftauen wurde mit Hilfe eines Photometers die RNA-Menge der Proben gemessen. 1 µg RNA wurde jeweils für die Umwandlung in eine dementsprechende Menge cDNA verwendet.

2 µl eines ersten Mastermix' – bestehend aus 1 µl Oligonukleotid mit Primerfunktion und 1µl dNTP – wurden zur RNA gegeben. In einem RNA-Cycler wurde das Produkt für 5 min auf 65° C erhitzt.

Ein zweiter Reverse-Transkriptase-Mastermix (bestehend aus 1µl RT, 4 µl QRT 5-fach-Puffer und 1 µl RT-Primer-Mix) wurde hinzugefügt.

Die Umschreibung fand dann im Cycler bei 42° C für 15 min statt, bei 95° C für 3 min wurde die RT danach inaktiviert.

1µg RNA lag am Ende in Form von 20 µl cDNA verdünnt vor, somit wurde eine Konzentration von 50 ng/µl erreicht.

2.3.3. Primerdesign

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms „Vector NTI“ (Invitrogen, Karlsruhe) selbst designt und bei Invitrogen bestellt. Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden zuvor auf der NCBI-Homepage (in der Genomdatenbank „EntrezGene“) gesucht und in Vector-NTI eingefügt.

Für das Primerdesign bewährten sich folgende Standardregeln:

- Primerlänge jeweils nur 18-27 bp
- Am 3'-Ende der Primer nur Cytosin oder Guanin
- Schmelztemperatur (T_m) zwischen 54 und 65 °C; wobei die Differenz in T_m von Forward- und Reverseprimer nicht über 0,5 °C liegen durfte
- Die Primer sollten hinter der Signalsequenz ATG liegen
- Primer-Dimere oder Hairpinloops sollten nicht vorkommen
- Der Guanin/Cytosin-Anteil sollte bei 40-60% liegen und in Forward- und Reverseprimer ähnlich sein
- Die Sequenz -GGG oder -CCC am 3'-Ende eines Primers sollte vermieden werden, da das Annealing sonst zuviel Energie verbraucht
- Forward- und Reverseprimer sollten in verschiedenen Exons liegen, um einer Interferenz mit der DNA vorzubeugen

Als Kontrollgen wurde 18S-rRNA gewählt. Diese ribosomale RNA der 18S-Untereinheit zeichnet sich durch ein konstant positives PCR-Ergebnis aus und weist auch bei verschiedenen Basisbedingungen (z.B. unterschiedliche Stimuli) nur eine geringe Schwankungsbreite auf. In einem Pilotprojekt für Nabelschnurblut wurde 18S getestet und hat sich als verlässliches *housekeeping gene* erwiesen.

Die Primer wurden von ihrer ersten Konzentration ausgehend (1mM) in 2 weiteren Schritten mit DEPC-Wasser auf 0,1mM und 1 µM verdünnt.

2.3.3.1. Leitzytokin der Th17-Zellen: IL-17

Genbeschreibung

IL-17 liegt auf Chromosom 6, hat 3 Exons und eine Gesamtlänge von 4252bp.

1 Transkript ist beschrieben in den Gendatenbanken „Vega“ [84] , „Ensembl“ [85] und „EntrezGene“ [86].

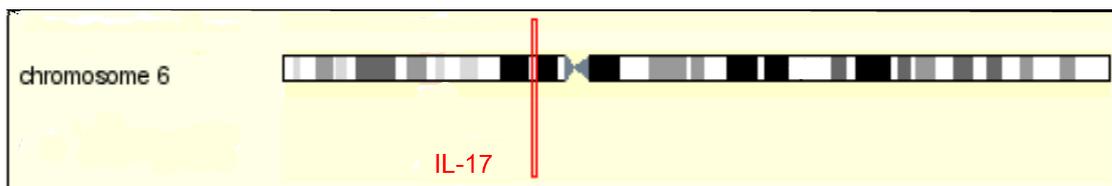


Abb. 7: Lage von IL-17 auf Chromosom 6

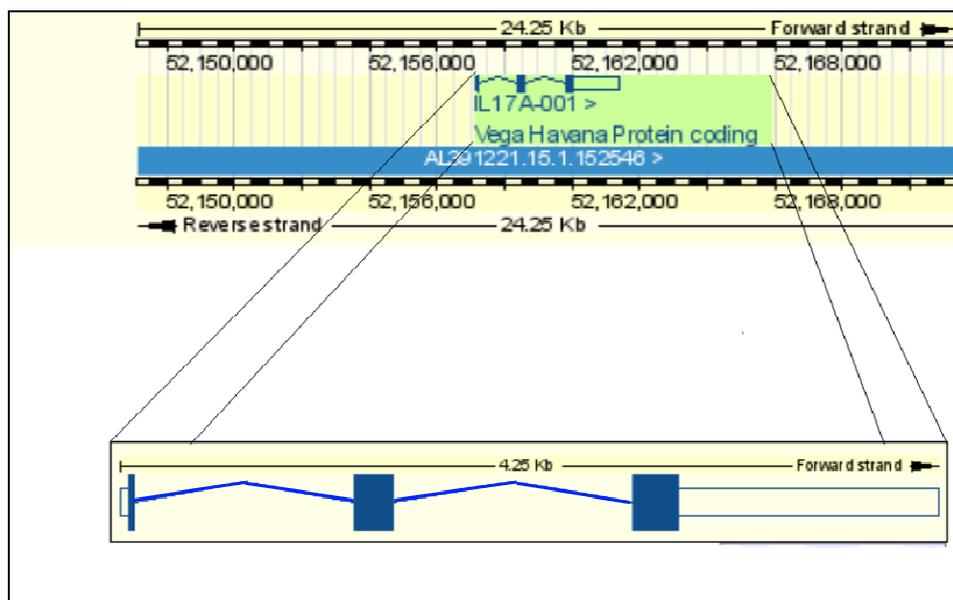


Abb. 8: Lage der proteinkodierenden Abschnitte in IL-17-A, mit vergrößertem Abschnitt („Vega“ Gendatenbank)

Primerdesign

IL-17			Lage des Primers	Länge
Forward-Primer	Sequenz	CACAATCCCACGAAATCCAGG	Exon 2: bp 1264-1284	21 bp
	Schmelztemperatur T_m	56,5 °C		
	Anteil an GC	52,4%		
	Dimere	keine		
	Hairpin-Loops	keine		
Reverse-Primer	Sequenz (direkt)	CTGTGATCTGGGAGGCAAAGTG	Exon 3: bp 2698-2719	22 bp
	Sequenz (komplementär)	CACTTTGCCTCCCAGATCACAG		
	Schmelztemperatur T_m	56 °C		
	Anteil an GC	54,5%		
	Dimere	0,4kcal/mol		
	Hairpin-Loops	keine		
Produktlänge	ohne Introns	207 bp		
	mit Introns	1456 bp		

Tabelle 2: IL-17 Primerdesign

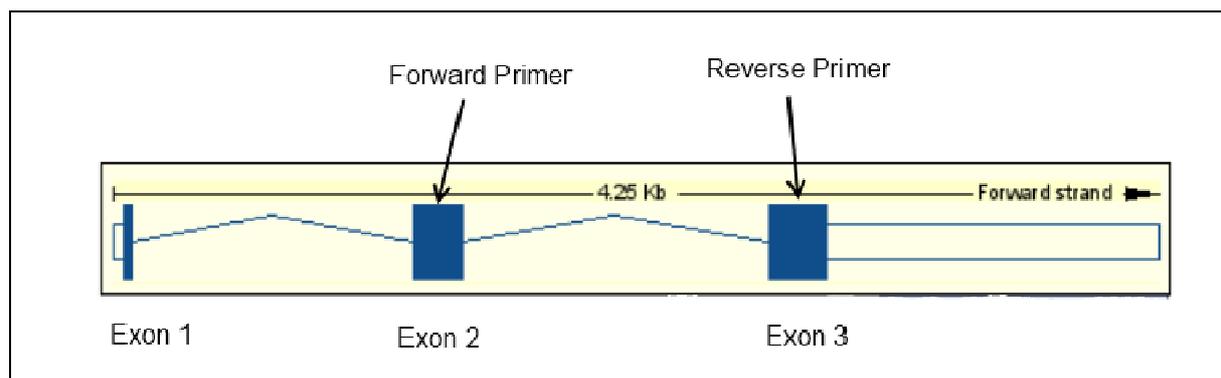


Abb. 9: Lage der IL-17 Primer

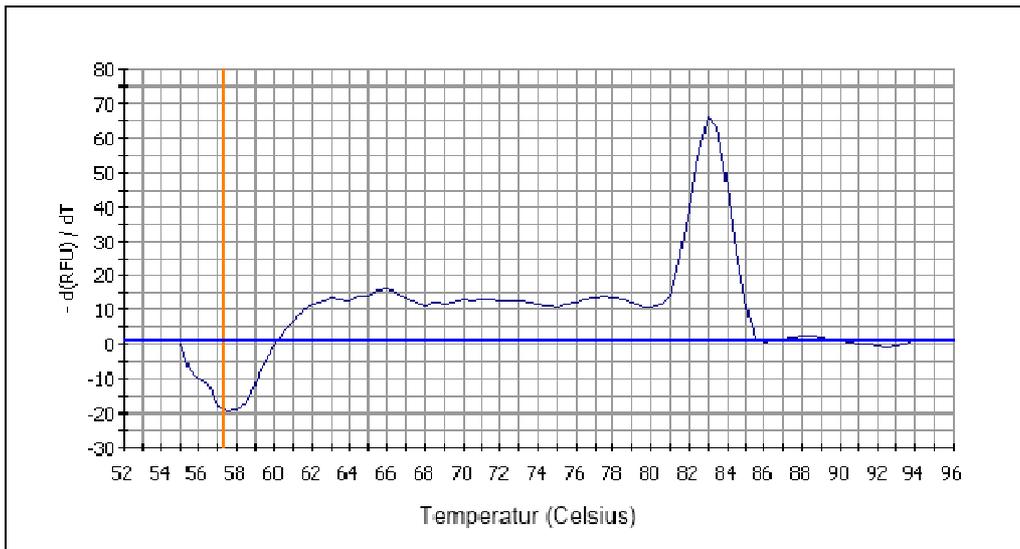


Abb. 10: Schmelzkurve von IL-17 in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München)

2.3.3.2. Transkriptionsfaktoren der Th17-Zellen: RoRC3 und RoRC4

Genbeschreibung

Die Abkürzung RoRC steht für *RAR-related orphan receptor C*.

RoRC liegt auf Chromosom 1 und hat im Gesamten 12 Exons und eine Länge von 25802 bp.

Der Transkriptionsfaktor RoRC bindet an die DNA und gehört zu der NR1-Unterfamilie nukleärer Hormonrezeptoren. In Mausversuchen (hier wird RoRC als RoR γ t bezeichnet, wobei das „t“ für „Thymus“ steht) ergaben sich Hinweise darauf, dass das Protein die Expression von Fas-Ligand (ein Apoptose-auslösendes Protein) und IL-2 inhibiert [87]. Dieser Inhibitionsmechanismus ist wichtig für den Reifungsprozess von Thymozyten, den Vorläuferzellen von T-Lymphozyten.

Für RoRC liegen 2 Transkripte vor, die für verschiedene Isoformen kodieren.

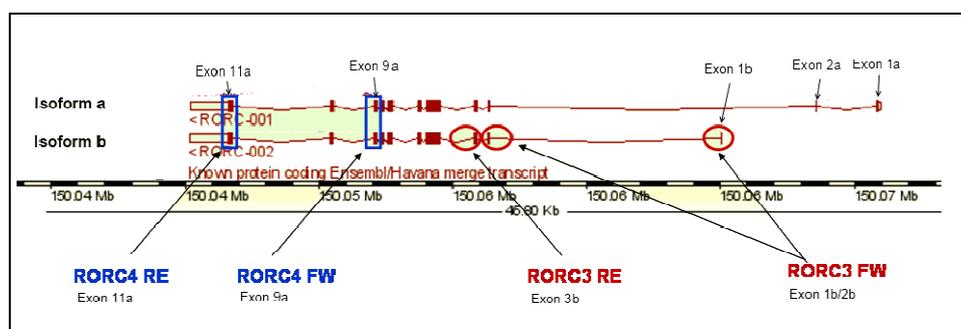


Abb. 11: Lage der Primer von RoRC3 und RoRC4 auf Chromosom 1

Primeretablierung

Eine spezielle Herausforderung war das Design eines spezifischen Primers für RoRC, da dieses Gen mindestens 2 Isoformen aufweist. Es wurden im Folgenden 4 verschiedene Primer für RoRC entwickelt (Primer RoRC1, RoRC2, RoRC3 und RoRC4) und darauf getestet, wie spezifisch und zuverlässig sie das Genprodukt nachweisen konnten. Von den selbst designten Primer RoRC 1-4 mussten die Varianten RoRC1 und 2 aufgrund unbefriedigender Ergebnisse in der Gelelektrophorese ausgeschlossen werden: bei RoRC1 zeigte sich kein spezifisches Ergebnis und bei RoRC2 und RoRC3 Doppel- oder Mehrfach-cDNA-Banden im Gel.

- RoRC1 (Isoform a):
bei 233bp keine Bande zu sehen, in Realtime RT-PCR Schmelzkurve zu breit
- RoRC2:
Doppelbande bei 241bp und 300bp
- RoRC3:
Doppelbande bei 193bp und 180bp

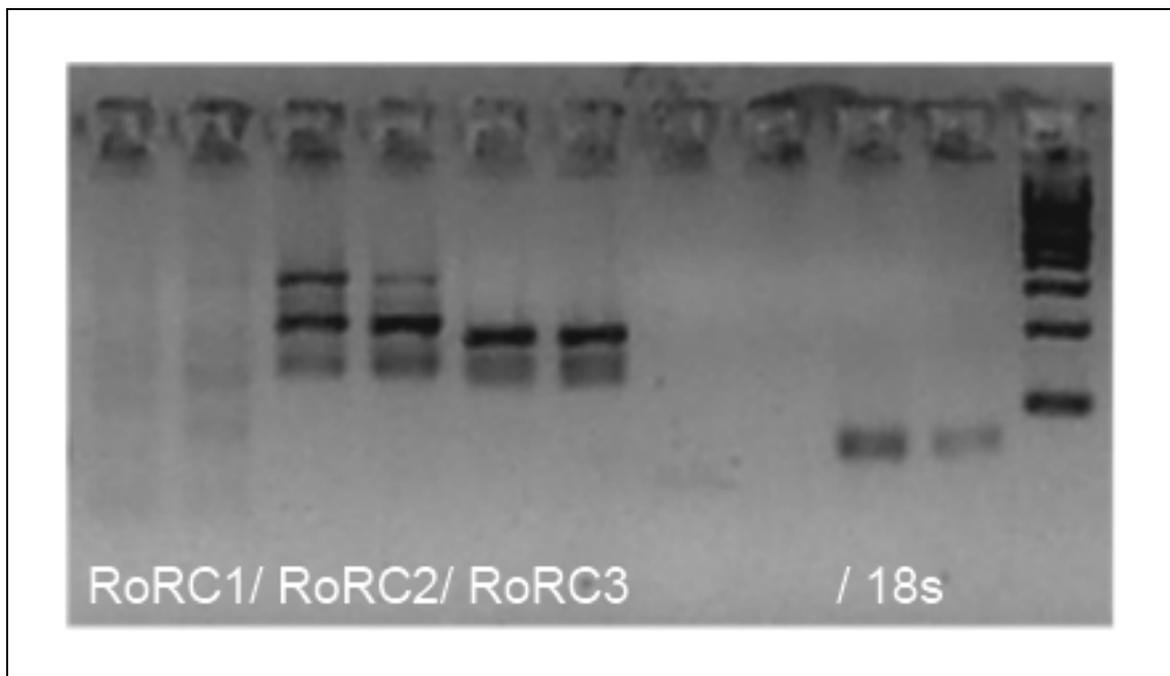


Abb. 12: Gelelektrophorese nach rt RT-PCR mit Nabelschnurblut, in Zellkultur stimuliert mit PHA, RoRC1-3 und *housekeeping gene* 18S, ladder

Sequenzierung von RoRC2 und RoRC3

Um sicher zu gehen, dass die Primer trotz Doppelbanden spezifisch arbeiten, wurden die einzelnen Banden nach der Elektrophorese aus dem Gel geschnitten, gereinigt und im Helmholtz-Zentrum sequenziert.

Protokoll der Sequenzierung

1. PCR-Reaktion wie oben beschrieben

2. Reinigen des PCR-Produkts

3% Agarosegel

Qiagen Gel Extraction Kit

3. Sequenzierungsreaktion

25-50ng PCR-Produkt

0,5 µl Primer (10pmol/ul)

1,0µl Big Dye v3.1

1 µl 5x Sequenzierungspuffer

5 µl Endvolumen

PCR-Produkt + 100 µl 70%iges EtOH

mischen

15 min bei Raumtemperatur inkubieren

30 min zentrifugieren bei 3000g und 20°C

Überstand abnehmen

zum Niederschlag 150 µl 70%iges EtOH dazugeben

10 min zentrifugieren

Überstand abnehmen

5 min bei Raumtemperatur inkubieren

bei 4°C lagern

Die Analyse der Doppelbanden ergab überraschenderweise die gleiche Sequenz, so dass die Doppelbanden nicht durch eine fehlerhafte Amplifizierung in der PCR

entstanden sind. Naheliegend ist die Erklärung, dass es sich um unterschiedliche Konformationen derselben DNA-Sequenz handelte.

RoRC3

Der Transkriptionsfaktor „RORC3“ (d.h. Primerversion 3) schließt nur die Isoform b ein (s. Abb. 9). Isoform bedeutet, dass durch eine verändertes RNA-Transkript der ursprünglichen DNA eine leicht veränderte Variante als Protein entsteht. Die verschiedenen Isoformen haben möglicherweise auch eine veränderte biologische (Teil-)Funktionen des Proteins zur Folge, was für das vorliegende Gen RoRC bislang aber noch nicht molekularbiologisch untersucht wurde.

RoRC3			Lage des Primers	Länge
Forward-Primer	Sequenz	GGCTCAGTCATGAGAACACAAATTGAAG	Exon 3 (bp 5928) – Exon 4 (bp14604)	28 bp
	Schmelztemperatur T _m	60,3 °C		
	% an GC	42,9		
	Dimere	-0,4kcal/mol; 0,1kcal/mol; -0,1kcal/mol; 1,5kcal/mol; 1,5kcal/mol; -3,5kcal/mol; - 1,5kcal/mol; 1,5kcal/mol; -0,1kcal/mol; 1,1kcal/mol		
	Hairpin-Loops	0,8kcal/mol; 2,9kcal/mol; 1,7kcal/mol		
Reverse-Primer	Sequenz (direkt)	CGCACCAGCCGAAACCGAT	Exon 5: bp 15140-15158	19 bp
	Sequenz (komplementär)	ATCGGTTTCGGCTGGTGCG	nur für Isoform b	
	Schmelztemperatur T _m	60,4 °C		
	% an GC	63,2%		
	Dimere	keine		
	Hairpin-Loops	keine		
Produkt- länge	ohne Introns	193bp		
	mit Introns	9231bp		

Tabelle 3: RoRC3 Primerdesign

RoRC4

Diese Version „RoRC4“ des Th17-Transkriptionsfaktors schließt die Isoformen a+b ein.

RoRC4			Lage des Primers	Länge
Forward-Primer	Sequenz	CATCTTTGACTTCTCCCACTCCC	Exon 9: bp 18838–18860	23 bp
	Schmelztemperatur T_m	55.6 °C		
	Anteil an GC	52.2%		
	Dimere	keine		
	Hairpin-Loops	keine		
Reverse-Primer	Sequenz (direkt)	CTTCGGAGCCTGTGTAGCCA	Exon 11: bp 24258 - 24272	20 bp
	Sequenz (komplementär)	TGGCTACACAGGCTCCGAAG		
	Schmelztemperatur T_m	55.2 °C		
	Anteil an GC	60.0%		
	Dimere	keine		
	Hairpins loops	none		
Produktlänge	ohne Introns	237 bp		
	mit Introns	5440 bp		

Tabelle 4: RoRC4 Primerdesign

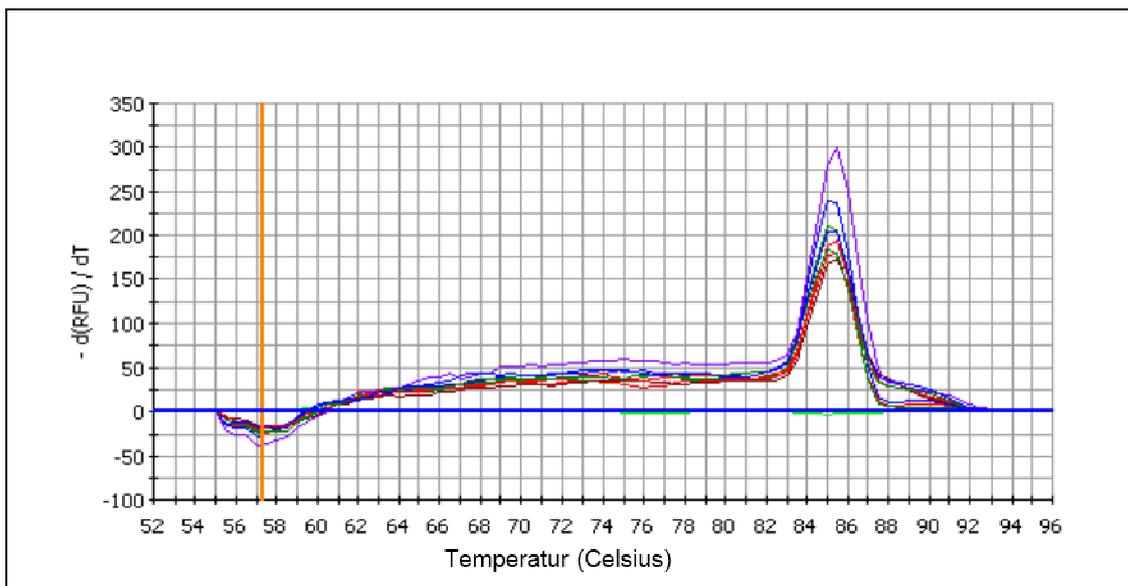


Abb. 13: Schmelzkurve von RoRC4 in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München)

2.3.3.3. IL-21

IL-21 liegt auf Chromosom 4. Es hat 5 Exons und eine Größe von 8.43 kb. Das mRNA-Produkt hat eine Länge von 616 Nukleotiden.



Abb. 14: IL-21 auf Chromosom 4

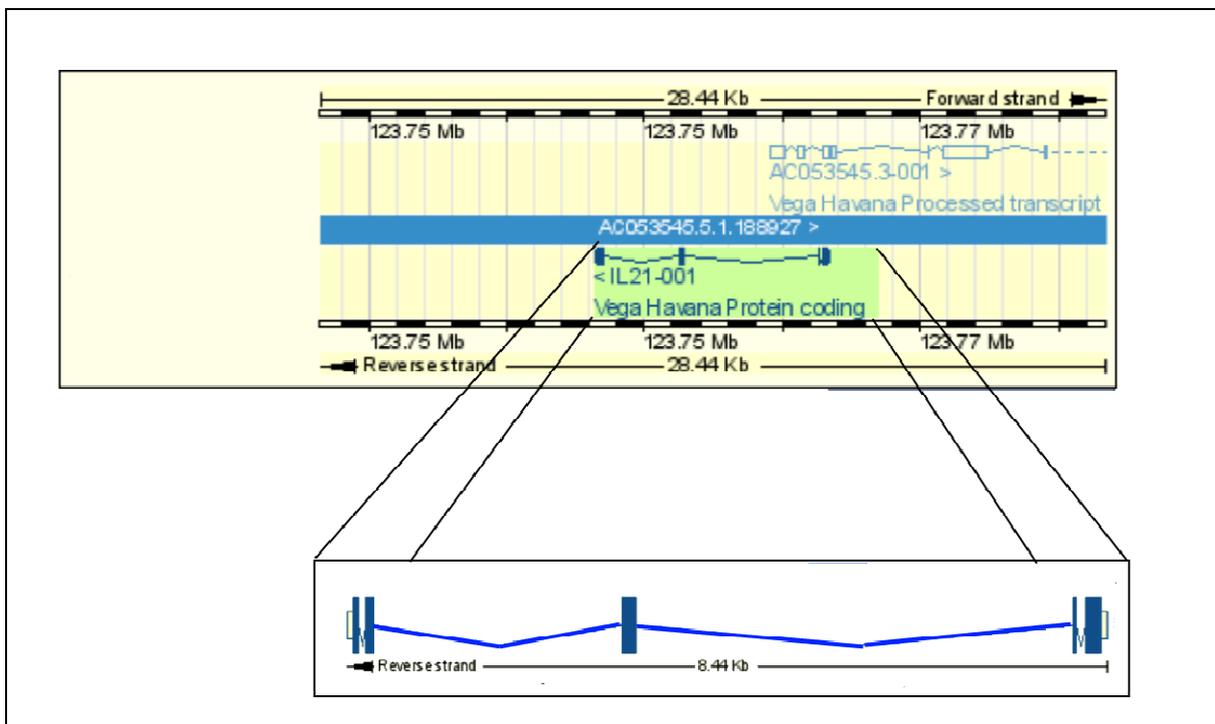


Abb. 15: Lage der Exons innerhalb des Gens IL-21 mit vergrößerter Ansicht

Primer

IL21			Lage des Primers	Länge
Forward-Primer	Sequenz	CAAATCAAGCTCCCAAGGTCAAG	Exon 1: bp 733 – 755	23bp
	Schmelztemperatur T_m	56,7 °C		
	Anteil an GC	47,8%		
	Dimere	-1,3 kcal/mol		
	Hairpin-Loops	keine		
Reverse-Primer	Sequenz (direkt)	GCAGGGAGAAGACAGAAACACAGAC	Exon 3: bp 5962 – 5986	25bp
	Sequenz (komplementär)	GTCTGTGTTTCTGTCTTCTCCCTGC		
	Schmelztemperatur T_m	57,3 °C		
	Anteil an GC	52,0%		
	Dimere	keine		
	Hairpin-Loops	keine		
Produktlänge	ohne Intron	286 bp		
	mit Intron	5254 bp		

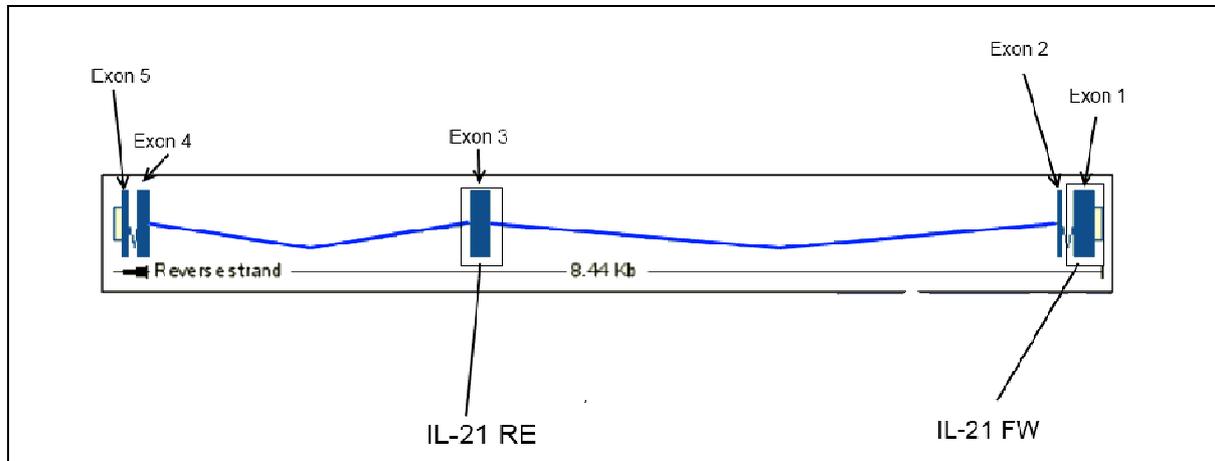


Abb. 16: Annealingstellen der Primer innerhalb des Gens IL-21

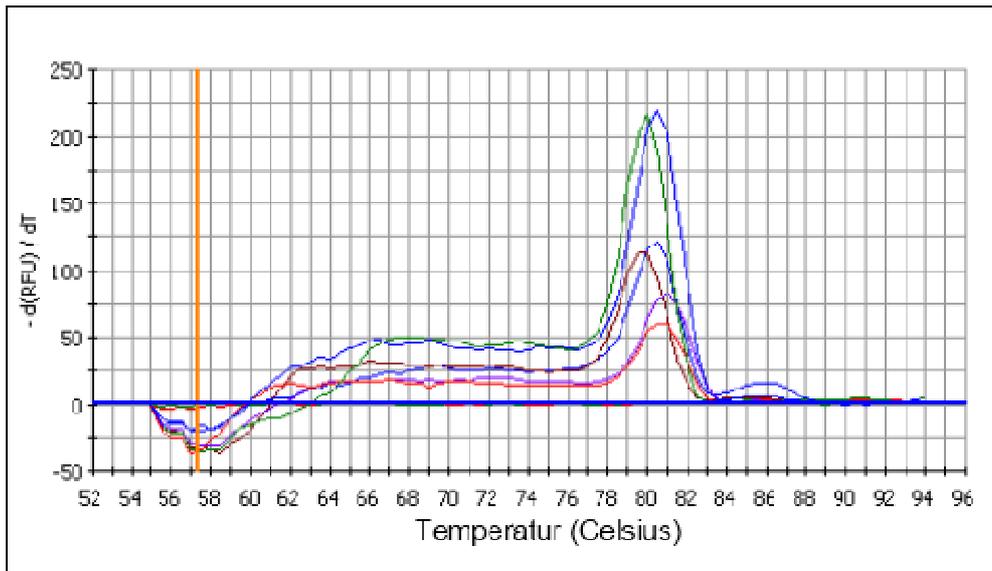


Abb. 17: Schmelzkurve von IL-21 in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München); in diesem Fall kein Nabelschnurblut, sondern PBMC (periphere mononukleäre Zellen) eines Erwachsenen

2.3.3.4. IL-23R

IL-23R liegt auf Chromosom 1 (1p31.3)

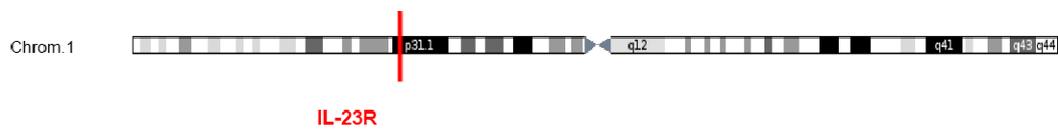


Abb. 18: Lage von IL23R auf Chr.1

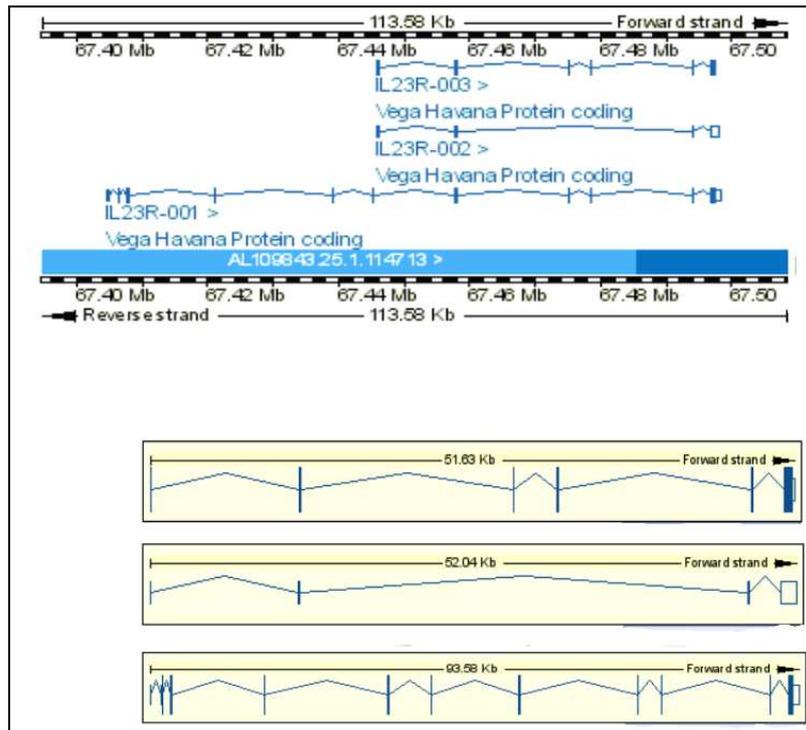


Abb. 19: Lage der Exons 001, 002 und 003 auf IL-23R mit vergrößertem Ausschnitt

IL23R-001	Exon: 11 Transcript length: 2,912 bps Translation length: 629 residues	Location <u>Chromosome 1: 67,404,671-67,498,250</u> forward strand
IL23R-002	PROCESSED TRANSCRIPT – Non Translated Exon: 4 Transcript length: 1,507 bps	Location <u>Chromosome 1: 67,445,909-67,497,946</u> forward strand
IL23R-003	Exon: 6 Transcript length: 1,295 bps Translation length: 391 residues	Location <u>Chromosome 1: 67,445,887-67,497,519</u> forward strand

Tabelle 5: Charakteristika und Lage der Exons IL23R-001, IL23R-002, IL23R-003.

Exkurs: Beispiel für Primeretablierung

Variante a:

- Primer 3 FW TCCCAGGTCACATCAAAG
- Primer 3 RE
 - Direct: GATCGTCTTTGCTGTTATGTTGTC
 - Complementary: GACAACATAACAGCAAAGACGATC

Variante b:

- Primer 4a FW TGATCGTCTTTGCTGTTATGTTGTC
- Primer 4 RE
 - Direct: CATCCCAGAACACAAGCCTACA
 - Complementary: TGTAGGCTTGTGTTCTGGGATG

Variante c:

- Primer 4b FW AATGATCGTCTTTGCTGTTATGTTG
- Primer 4 RE
 - Direct: CATCCCAGAACACAAGCCTACA
 - Complementary: TGTAGGCTTGTGTTCTGGGATG

Alle 3 Varianten wurden mit Temperaturgradienten getestet und Variante b für die Doktorarbeit ausgewählt.

IL23R			Lage des Primers	Länge
Forward-Primer	Sequenz	TGATCGTCTTTGCTGTTATGTTGTC	Exon 4: bp 74413-74437	25 bp
	Schmelztemperatur T_m	58,6 °C		
	Anteil an GC	65,0%		
	Dimere	keine		
	Hairpin-Loops	keine		
Reverse-Primer	Sequenz (direkt)	CATCCCAGAACACAAGCCTACA	Exon 6: bp 92762-92783	22 bp
	Sequenz (komplementär)	TGTAGGCTTGTGTTCTGGGATG		
	Schmelztemperatur T_m	49,7 °C		
	Anteil an GC	50,0%		
	Dimere	keine		
	Hairpin-Loops	keine		
Produktlänge	ohne Intron	266 bp		
	mit Intron	18371 bp		

Tabelle 6 : Primeretablierung IL-23R

Schmelzkurve in realtime RT-PCR

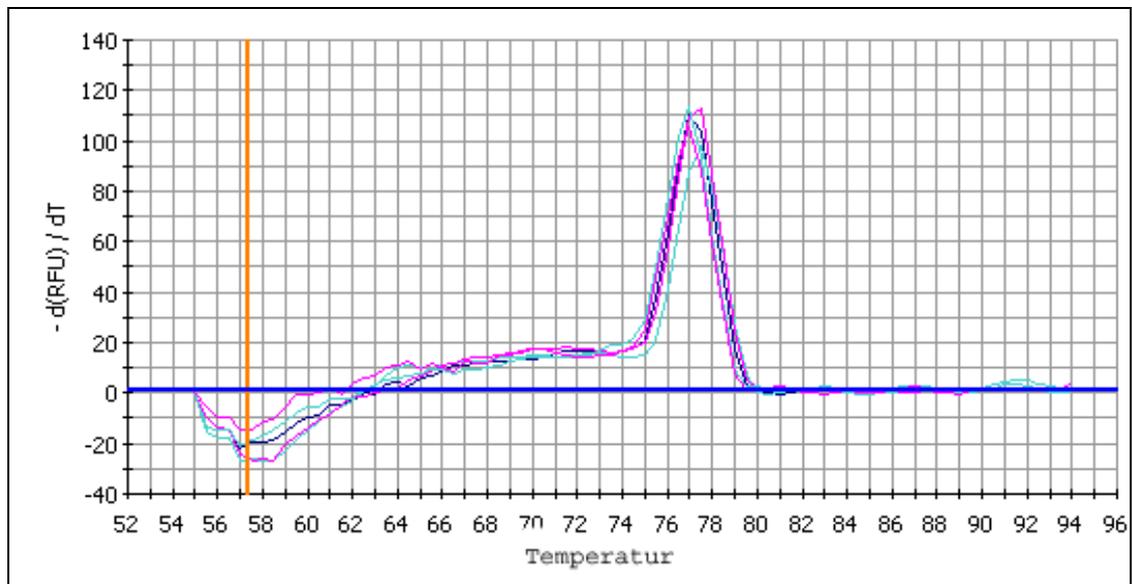


Abb. 20: Schmelzkurve von IL-23R in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München);
Nabelschnurblutprobe

2.3.4. Real-time RT-PCR

Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die 1983 von Kary Mullis erfundene und später mit dem Nobelpreis für Chemie (1993) bedachte Methode dient der Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen. Das bahnbrechende Verfahren, das heute in allen modernen Laboratorien zum Standard gehört, funktioniert rein künstlich ohne Zuhilfenahme reproduzierender lebender Organismen wie *E.coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

Zunächst erfolgt die **Initialisierung** der PCR bei 95° C: die DNA-Doppelhelix wird in ihre Einzelstränge gespalten. Beim sog. „hot start“ wird zusätzlich die Polymerase durch die große Hitze aktiviert. Die vollständige Trennung der beiden komplementären Stränge ist äußerst wichtig für das Gelingen der nächsten Schritte

Folgende Schritte wiederholen sich dann in jedem Zyklus der PCR:

1. **Denaturierung:** die neu gebildeten DNA-Stränge (Templates) müssen jeweils wieder bei 95° C gespalten werden
2. **Annealing:** bei 55 – 65° C lagern sich innerhalb von 30 sec die Primer an das 5' – 3'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes an. Die genaue Temperatur hängt dabei von der Länge und Basensequenz dieser spezifischen Oligonukleotide ab. Bei zu niedrig gewählter Temperatur steigt das Risiko einer nicht spezifischen Anlagerung, das heißt die Amplifikation beginnt in einem Bereich, der nicht vollständig komplementär zu den Oligonukleotiden ist. Bei zu hoher Temperatur hingegen kann eine Anlagerung der Primer unmöglich sein und es entsteht unter Umständen gar kein PCR-Produkt. Die Primer in dieser Arbeit funktionierten alle gut bei 62,5° C.
3. **Elongation:** Verlängerung der Primer durch eine thermostabile Taq-Polymerase bei 68 – 72° C. Die einzelnen Bausteine (Desoxynukleosid-Triphosphate) werden mit dem Mastermix im Überschuss dazugegeben. Die Verlängerung wird so lange fortgesetzt, bis die Polymerase am Ende des Templates abfällt oder der Vorgang durch erneutes Erhitzen unterbrochen wird.

Prinzip der real-time RT-PCR:

Der Unterschied zur klassischen PCR ist, dass hier die DNA nicht nur amplifiziert, sondern auch quantifiziert werden kann.

Das Verfahren wurde in dieser Doktorarbeit gewählt, um Rückschlüsse auf die Menge an RNA (mittels reverser Transkriptase umgewandelt in cDNA) und somit auf die Aktivität bestimmter Gene im Immunsystem der Neugeborenen zu ziehen.

Dazu benötigt man ein optisches System, welches auf Fluoreszenzmolekülen (Fluorophore) beruht. Diese Farbstoffe (in dieser Doktorarbeit *SYBR-Green*) interkalieren mit der DNA.

Proportional zur Amplifikation der DNA erhöht sich die Fluoreszenz. Es können also in Echtzeit („*real-time*“) die PCR-Produkte quantitativ bestimmt werden.



Abb. 21: iCycler (Biorad, München) und PC (Bild: C. Hinnerwisch)

Auswertung der real-time RT-PCR

Die real-time RT-PCR wird mit Hilfe der während des Laufs gespeicherten ct-Werte ausgewertet. Der Begriff ct steht für das englische „*cycle threshold*“. Der ct-Wert entspricht demjenigen Zyklus im PCR-Lauf, in dem erstmals die Fluoreszenz signifikant über die unspezifische Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Für die Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse ist es wichtig zu verstehen, dass der ct-Wert umso höher ist (einem späteren Zyklus entsprechend, z.B. ct = 28), je weniger Ausgangs-DNA vorhanden war. Ein ct-Wert von 18 dagegen spräche dafür, dass bereits im Zyklus 18 soviel DNA amplifiziert wurde, um einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz zu bewirken.

2.3.5. Protokoll der real-time RT-PCR

Cycle 1 (1x)	95,0° C	10:00 min
Cycle 2 (40x)	Step 1: 95,0° C Step 2: 62,5° C Step 3: 72,0° C	00:20 min 01:00 min 00:40 min
Cycle 3 (1x)	72,0° C	02:00 min
Cycle 4 (1x)	95,0° C	00:30 min
Cycle 5 (1x)	55,0° C	00:30 min
Cycle 6 (80x)	55,0° C increase setpoint temperature after cycle 2 by 0,5°C	00:10 min
Cycle 7 (1x)	15,0° C	HOLD

Tabelle 7: Protokoll real-time RT-PCR „Paulina 62,5 long2.tmo“

R e a g e n t i e n

SYBR Green: enthält Fluorophore, Nucleotide und eine Puffermischung

DEPC: gereinigtes H₂O

Pro *well* der PCR-Platte wurde ein Reaktionsansatz von 30 µl verwendet. Das Pipettieren erfolgte zügig und auf Eis. In jedes *well* wurden 18,9 µl Mastermix (6,3 µl DEPC + 12,6 µl SYBR-Green) und 3,6 µl einer 1:15 verdünnten cDNA pipettiert. Davon ausgenommen waren die NTC-Abschnitte (*non template control*), welche ohne cDNA einfach 22,5 µl NTC-Mix (9,9 µl DEPC + 12,6 µl SYBR-Green) enthielten. Die NTC diente dem Beweis, dass keine Kontamination mit fremder DNA vorlag. Auf der ganzen Platte wurden sodann 7,5 µl Primer pro *well* hinzugefügt (Konzentration 1µM).

Die Platte wurde mit einer durchsichtigen Folie abgeklebt, kurz zentrifugiert, um eventuelle Luftblasen zu eliminieren und dann in den iCycler gestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Media	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S
B Media	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	NTC 18S	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	NTC IL-21
C PHA	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S
D PHA	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	NTC IL-17	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	NTC IL-23R
E LpA	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S
F LpA	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	NTC RoRC3	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S
G Ppg	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S
H Ppg	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	NTC RoRC4	IL-17	RoRC3	RoRC4	IL-21	IL-23R	18S
	PAULINA Sample Nr. 1						PAULINA Sample Nr. 2					

Tabelle 8: Beispiel für Pipettierschema/Plate Setup

Es wurde bei jedem Sample mit Doppelwerten gearbeitet.

<p>Mix 1: 6,3 µl DEPC + 12,6 µl SYBR-Green = 18,9 µl/well</p> <p>NTC-Mix (=non-template control): 9,9 µl DEPC + 12,6 µl SYBR-Green = 22,5 µl/well</p> <p>cDNA-Mix (1:15-Verdünnung) 0,24 µl cDNA + 3,36 µl DEPC = 3,6 µl/well</p> <p>Primer (Konzentration 1 µM): 7,5µl/well</p> <hr/> <p>6x NTC : 22,5µl NTC-Mix + 7,5µl Primer = 30 µl/well 90x cDNA: 18,9µl Mix 1 + 3,6µl cDNA-Mix + 7,5µl Primer = 30 µl/well</p>

Tabelle 9: real-time RT-PCR Mix

2.3.6. Gelelektrophorese

Reagenzien

Agarosepulver

TBE-Puffer 0,5 fach: Trizma Base, Borsäure, 0,5M EDTA (für Agarose und Elektrophoresekammer)

Ethidiumbromid: interkalierende Substanz, die die DNA unter UV-Licht sichtbar macht

Loading dye: 0.25% Bromphenolblau
0.25% Xylenzylanol
30% Glyzerol in H₂O (beschwert die DNA und zieht sie in die Geltaschen)

Ladder 100bp

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung unterschiedlich großer Moleküle, indem man sie durch ein visköses Medium in einem elektrischen Feld wandern lässt. Dabei macht man sich zunutze, dass die DNA durch ihre Phosphatreste negativ geladen ist und in einem elektrischen Feld immer zur Anode (Pluspol) wandert. Um die Bewegung zu verlangsamen, wird sie in kleine Taschen eines verfestigten Agarosegels gegeben. Je höher die Konzentration des Gels (in unserem Fall 3%), desto enger sind seine Poren und desto kleinere DNA-Fragmente können separiert werden. Möglich ist eine Auftrennung von Fragmenten mit nur 50 Basenpaaren (bp).

Für das Gel wurden 6g Agarosepulver in einem hitzebeständigen Glaskolben mit 200 ml 0,5-fach TBE-Puffer vermischt und unter mehrfachem Schwenken für ca. 4 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden 70 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und das flüssige Gel in eine mit Kämmen bestückte Kammer gegossen. Nach ca. 30 min hatte sich das Gel verfestigt, die Kämmen konnten herausgezogen werden und hatten auf diese Weise gleichmäßige Taschen im Gel hinterlassen.



Abb. 22: Sich verfestigende Agarose in Gelkammer mit Kämmen (Bild: C. Hinnerwisch)

Die amplifizierten und mit jeweils 4 μl *loading dye* versetzten DNA-Proben, die NTC-Kontrolle und die *ladder* wurden in die Geltaschen pipettiert.

Bei 120V und 400mA wurde die Elektrophorese ca. 30 min lang laufen gelassen. Danach konnten die Banden in den Gel unter UV-Licht begutachtet und fotografiert werden.

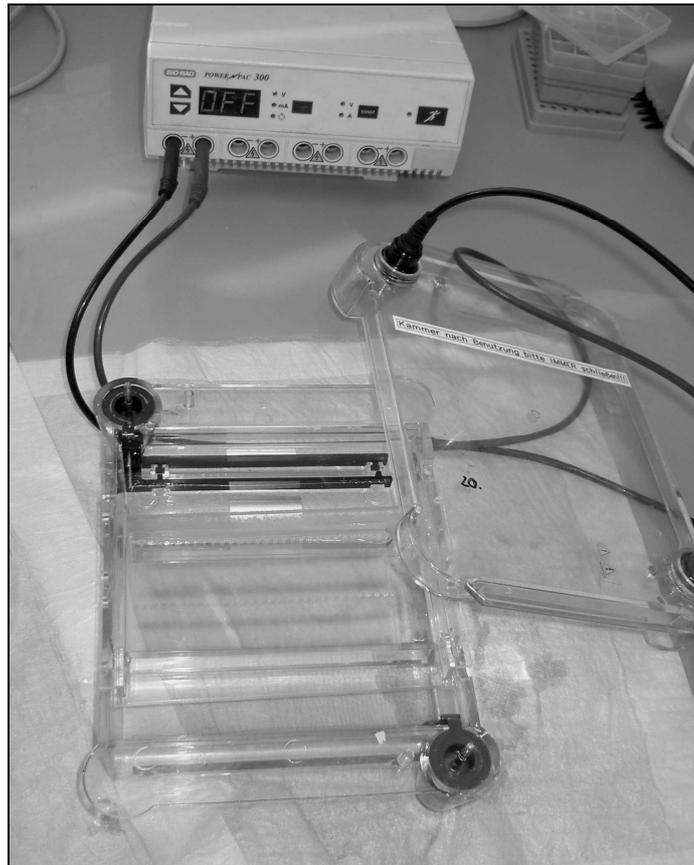


Abb. 23: Elektrophoresekammer nach dem Lauf (Bild: C. Hinnerwisch)

2.4. Statistik

2.4.1. Auswertung der Schmelzkurven und ct-Werte des Biorad iCyclers

Beispiel für „Detectables“

In diesem Fall der gut detektierbaren und auswertbaren Proben bei IL-17 zeigten sich ideale Schmelzkurven und eng beieinander liegende Doppelwerte.

Es ergaben sich hier folglich keine Bedenken, die vom iCycler-Programm generierten Daten zu übernehmen. Bei allen Proben wurde mit Doppelwerten gearbeitet und der Mittelwert aus den beiden Werten errechnet um ein exakteres Ergebnis zu erhalten.

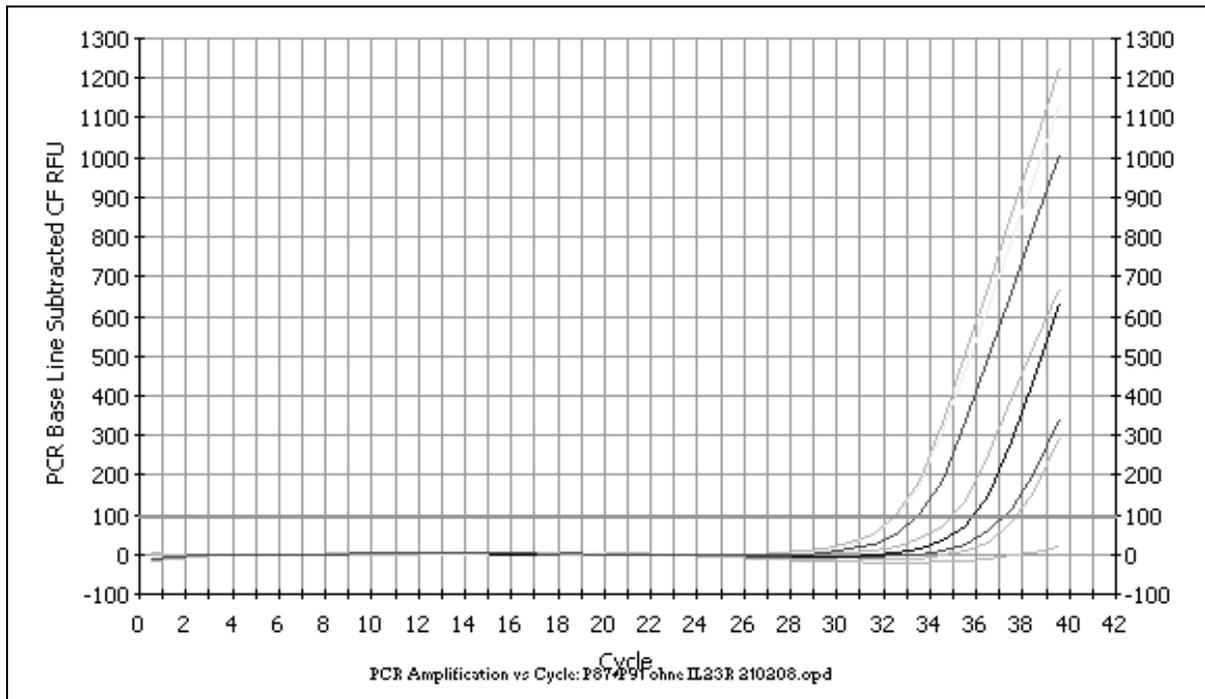


Abb. 24: Achse mit ct-Werten zwischen ct=32 und ct=38 (IL-17 M, PHA, LpA, Ppg)

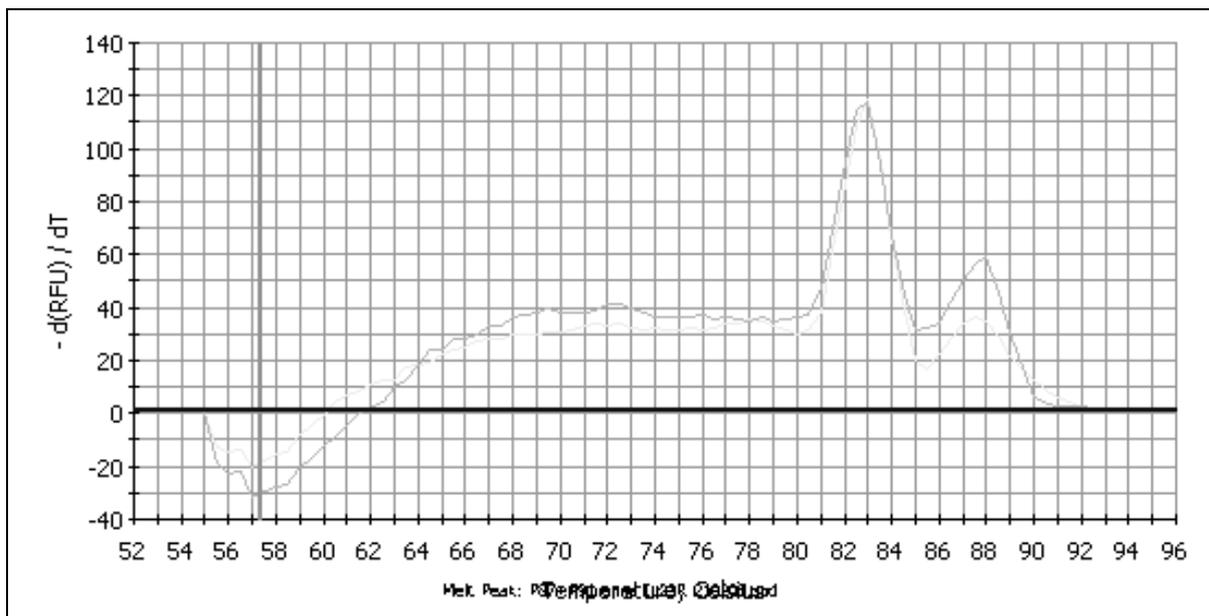


Abb. 25: Beispiel für ideale Schmelzkure (IL-17 LpA)

Beispiel für „Non-Detectables“

Im Gegensatz zu obigem Beispiel liegt hier, ebenfalls bei IL-17, eine nicht-detektierbare Probe vor mit unregelmäßiger Schmelzkurve (vgl. Abbildungen der „gentypischen“ Schmelzkurven in Kapitel 2.3.3) und weiter auseinanderliegenden Doppelwerten.

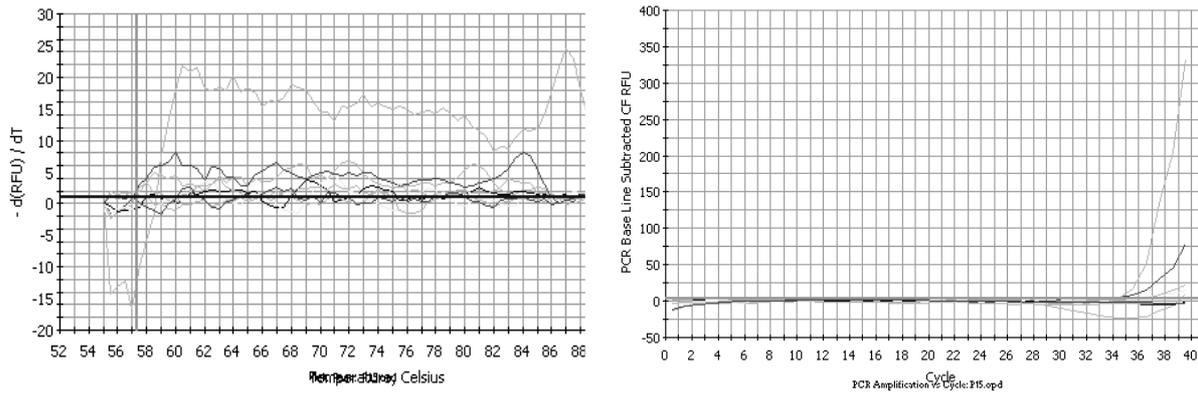


Abb. 26: Beispiel für nicht detektierbare Probe (IL-17 M, PHA, LpA, Ppg) mit Schmelzkurve und ct-Achse

Die automatische Analyse des iCycler-Programms hätte folgendes Ergebnis der Doppelwerte ergeben (N/A bedeutet „nicht auswertbar“):

Well	Ct	Identifizier
A2	N/A	P15 M IL17
B2	34,2	P15 M IL17
C2	30,1	P15 PHA IL17
D2	N/A	P15 PHA IL17
E2	34,2	P15 LpA IL17
F2	35,5	P15 LpA IL17
G2	14,6	P15 Ppg IL17
H2	N/A	P15 Ppg IL17

Tabelle 10: Automatisches Analyseergebnis eines nicht detektierbaren Samples

Da aber dennoch in der PCR-Schmelzkurvenanalyse ein Signal zu erkennen war, wenngleich auch sehr schwach, wurde der ct-Wert künstlich auf den (fast) niedrigsten Wert gesetzt, nämlich ct= 38. Die Verwendung dieser zensierten Werte wurde bei der statistischen Auswertung berücksichtigt (s. Kapitel 3.2.6). Eventuell handelt es sich hierbei um eine spezielle Problematik bei der Arbeit mit Nabelschnurblut, dass das Signal zu schwach ist, um mittels realtime RT-PCR verlässlich quantifiziert zu werden.

2.4.2. Auswertung im Gruppenvergleich

Mittels Exceltabellen wurden die Daten aufgelistet und in mehreren Teilschritten berechnet:

1. ct-Werte

Die ct-Werte stellten die „Rohdaten“ dar und wurden im iCycler- Programm einzeln auf fehlerhafte Kurven überprüft und dann übernommen. Es wurden 2 Listen erstellt – die Gruppe der Atopiker und der Nicht-Atopiker – und für jede Probe jeweils Media und die 3 Stimuli PHA, LpA und Ppg aufgeführt. Die Interpretation der ct-Werte erfordert ein Umdenken: höhere Werte (also ein späterer PCR-Zyklus, etwa Zyklus 35 oder 37) stehen für eine niedrigere Genexpression.

2. delta- ct-Werte

Der delta-ct-Wert (dct) ergibt sich aus der Berechnung der Differenz der untersuchten Gene zum *housekeeping gene* 18S.

Auch hier werden noch Media und die 3 Stimuli aufgeführt. Grund für diesen Rechenschritt: Ausgleich von cDNA-Konzentrationsschwankungen innerhalb einer Probe.

$$\text{dct} = (\text{ct-Wert Gen x}) - (\text{ct-Wert 18S})$$

Die ct-Werte für 18S waren überall numerisch niedriger (also höher exprimiert) als bei den untersuchten Genen. Die Formel ergab daher jeweils ein positives Ergebnis. 18S war wie erwartet in allen Proben stärker exprimiert als die mit der Th17-Regulierung assoziierten Gene.

3. Subtraktion der Stimuli PHA, LpA und Ppg von Media

Dieser Rechenschritt dient dazu, herauszufinden, ob und welche Stimulation die Genexpression hoch- oder herunterreguliert.

$$(\text{dct Media Gen x} - \text{dct Stimulus Gen x})$$

Das Ergebnis kann positiv sein – im Sinne einer Hochregulierung- oder negativ – im Sinne einer Herunterregulierung. Ein Ergebnis von 0,00 bedeutet eine gleichbleibende Genexpression auch nach der Exposition der Zellen gegenüber PHA, LpA oder Ppg.

4. Fold-difference-Werte

Der fold-difference-Wert (fd) ist eine gängige Darstellungsweise in der Immunologie. Er berechnet das Vielfache zwischen in diesem Fall unstimuliertem Media und stimulierten Zellen (PHA, Lpa, Ppg)

$$fd = 2^{(dct \text{ Media Gen } x - dct \text{ Stimulus Gen } x)}$$

Die möglichen Ergebnisse waren:

fd >1: eine x-fache Steigerung vom zuvor berechneten Media-Wert

fd =1: gleichbleibend, weder hoch- noch herunterreguliert (im Rechenschritt zuvor 0,00 entsprechend)

fd <1: die mRNA des betreffenden Gens wurde nach Stimulation herunterreguliert (im Rechenschritt zuvor einem negativen Wert entsprechend)

2.4.3. Statistische Testverfahren

Gearbeitet wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Version 14.0. Da die Daten in der Regel nicht normalverteilt waren, wurden nicht-parametrischen Tests angewandt: für den Vergleich der Mediane der Genexpression wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Rangsummentest ausgewertet.

Aufgrund der Verteilung wurden die Daten als Median +/- Interquartilenabstand (IQR) dargestellt.

Eine Korrelation zwischen Genexpression und Zytokinsekretion bzw. Genexpressionen untereinander wurde mittels Spearman-Korrelationstest dargestellt.

Statistische Signifikanz wurde definiert als p-Wert ≤ 0.05 .

3. Ergebnisse

3.1. Epidemiologie

PAULINA-Studie

Epidemiologische Daten der Eltern wurden anhand eines Fragebogens (s. Anhang) erhoben und geben Auskunft über bereits bekannte Allergien oder immunologische Erkrankungen der Eltern, Umwelteinflüsse während der Schwangerschaft und relevante Sozialparameter (Staatsangehörigkeit, Bildung).

Ausschlusskriterien waren

- Schwere Erkrankungen der Mutter, insbesondere Autoimmunerkrankungen
- Antibiotikatherapie im letzten Trimenon der Schwangerschaft
- Fieber unter der Geburt
- Erhöhtes CRP ($> 0,5$ mg/dl) der Mutter

Im Verlauf mussten weitere Proben ausgeschlossen werden, da teilweise zu wenig RNA-Material vorhanden war, um cDNA für alle Stimulationsbedingungen herzustellen.

Von den insgesamt 161 Nabelschnurblutproben waren 36 von atopischen und 59 von nicht-atopischen Müttern. 66 Proben insgesamt wurden von der endgültigen Analyse ausgeschlossen.

Folgende Tabelle veranschaulicht die Charakteristika der Kohorte. Wie zu erwarten war das Gesamt-IgE im Serum der atopischen Mütter signifikant höher als das der nicht-atopischen Mütter. Interessant war der Zusammenhang zwischen mütterlicher Atopie und Geburtsgewicht, Körpergröße und Kopfumfang der Neugeborenen: die Kinder von atopischen Müttern waren bei Geburt insgesamt deutlich schwerer und größer als die Kinder nicht-atopischer Mütter.

Zudem konnten wir ein überraschendes soziologisches Phänomen beobachten: Väter mit atopischen Erkrankungen gründeten eher eine Familie mit Frauen, die ebenfalls unter allergischer Rhinitis, atopischer Dermatitis oder Asthma litten ($p = 0.07$).

Probanden & Charakteristika	Nicht-atopische Mütter n= 59	Atopische Mütter n=36	P-Wert
Mütterliches Alter (Jahre), MW (min/max)	32,34 (20/41)	32,53 (17/44)	0,76
Rauchen in Schwangerschaft n, (%)	2 (3,4)	2 (5,6)	0,15
Gesamt IgE im Serum (IU/ml) MW (min/max)	45,5 (0,39/388)	146,55 (3/1061)	<0,001
Gestationsalter (Wochen), MW (min/max)	39,86 (36,29/42)	39,94 (37,29/41,86)	0,84
Geschlecht Neugeborene, männlich n, (%)	31 (52,5)	23 (63,9)	0,28
Geburtsgewicht (g) (MW ± SD)	3478,22 (443,04)	3654,03 (414,19)	0,02
Körpergröße (cm) (MW ± SD)	51,94 (2,17)	52,86 (2,27)	0,03
Kopfumfang (cm) (MW ± SD)	35 (1,37)	35,37 (1,46)	0,25
Entbindungsmodus, vaginal n, (%)	53 (89,83)	33 (91,7)	0,77
Väterliche Atopie n (%)	14 (23,73)	15 (41,67)	0,07
– Asthma bronchiale	3 (5,08)	4 (11,11)	0,28
– allergische Rhinokonjunktivitis	14 (8,26)	11 (30,56)	0,47
– Atopisches Ekzem	1 (1,69)	4 (11,11)	0,047
Ältere Geschwister n (%)	23 (38,98)	13 (36,1)	0,94

Tabelle 11: Populationscharakteristika: Mütterliche Atopie ist definiert als Arzt diagnose Asthma und/oder allergische Rhinitis und/oder atopische Dermatitis; signifikante Unterschiede ($p \geq 0.05$) fett gedruckt

Spezifisches IgE

Allergene	IgE atopische Mütter (mIU/ml) MW (min/max)	IgE nicht atopische Mütter (mIU/ml) MW (min/max)	Mann-Whitney-U
<i>Derm.Pteronyssinus</i>	2,54 (0,00/17,40)	1,55 (0,00/77,00)	p = 0,0004
<i>Derm. Farinae</i>	3,42 (0,00/75,5)	0,84 (0,00/40,30)	p = 0,0002
Latex	0,13 (0,00/4,80)	0,00 (0,00/0,00)	p = 0,204
Birkenproteine	8,83 (0,00/99,3)	1,83 (0,00/46,80)	p = 0,012
Haselnusspollen	6,41 (0,00/59,00)	0,28 (0,00/9,40)	p = 0,0001
Graspollenmischung	6,33 (0,00/57,30)	4,59 (0,00/79,60)	p = 0,514
Lieschgrasproteine	6,41 (0,00/67,10)	4,00 (0,00/52,70)	p = 0,837
Beifußproteine	1,32 (0,00/42,10)	1,54 (0,00/49,20)	p = 0,012
Wegerich	0,24 (0,00/6,60)	0,21 (0,00/8,80)	p = 0,512
Katzenproteine	0,62 (0,00/6,50)	0,57 (0,00/9,20)	p = 0,105
Pferdeschuppen	2,07 (0,00/72,20)	0,11 (0,00/ 5,60)	p = 0,637
Hundeschuppen/Haare	0,44 (0,00/9,40)	0,09 (0,00/2,10)	p = 0,284
<i>Alternaria alternata</i>	1,64 (0,00/43,60)	1,00 (0,00/57,50)	p = 0,489

Allergene	IgE atopische Mütter (mIU/ml) MW (min/max)	IgE nicht atopische Mütter (mIU/ml) MW (min/max)	Mann-Whitney-U
Eiklar	0,02 (0,00/0,70)	0,04 (0,00/1,00)	p = 0,600
Milchproteine	0,18 (0,00/1,80)	0,18 (0,00/2,80)	p = 0,839
Erdnuss	0,01 (0,00/0,10)	0,08 (0,00/4,30)	p = 0,787
Haselnuss	0,05 (0,00/1,90)	0,11 (0,00/5,00)	p = 0,206
Karotte	0,04 (0,00/1,40)	0,34 (0,00/15,50)	p = 0,033
Weizenmehl	0,01 (0,00/0,02)	0,27 (0,00/12,20)	p = 0,141

Tabelle 12: Spezifisches IgE im Serum (mIU/ml); Unterschiede zwischen atopischen und nicht-atopischen Müttern bei einer Testreihe von verschiedenen Allergenen (Mann-Whitney-U-Test)

3.2. Realtime-RT-PCR

Die Anzahl auswertbarer Proben belief sich auf n=59 bei den CBMC nicht-atopischer Mütter bzw. n=36 bei den CBMC atopischer Mütter. Fehlende Werte kamen zustande durch:

1. Ausschluss aufgrund fehlerhafter Schmelzkurve in der rt RT-PCR. Dies meint beispielsweise unspezifischen Peaks in der Kurve, die nicht charakteristisch für das jeweilige Gen sind (zu den Schmelzkurven der einzelnen Genen: s. Kapitel 2.3.3) und sich durch fehlerhaftes Annealing der PCR-Primer oder andere unbekannte Störgrößen während Verarbeitung der RNA/cDNA und der Durchführung der PCR erklären lassen.

2. Zellzahl der Probe und damit die Menge der RNA war nicht ausreichend für alle Stimulationsbedingungen.

%	Media ct		PHA ct		LpA ct		Ppg ct	
	Ausschluss	wenig RNA						
IL-17	1,1	6,3	6,3	11,6	3,2	36,8	2,1	37,9
RoRC3	1,1	6,3	3,2	11,6	2,1	36,8	2,1	38,9
RoRC4	1,1	6,3	3,2	11,6	3,2	36,8	3,2	37,9
IL-21	1,1	3,2	52,6	10,5	57,9	36,8	55,8	37,9
IL-23R	5,3	3,2	7,4	11,6	8,4	35,8	8,4	36,8

Tabelle 13: Anteil der ausgeschlossenen Proben an allen in %

3.2.1. Test auf Normalverteilung

Falls Daten normalverteilt sind, bedeutet dies, dass mit dem t-Test nach Student gearbeitet werden kann und bei der deskriptiven Statistik mit Mittelwert und Standardabweichung zuverlässige Aussagen getroffen werden können. Bei nicht-normalverteilten Daten dürfen nur nicht-parametrische Tests angewendet werden, z.B. der Mann-Whitney-U-Test.

Je kleiner der p-Wert, desto unwahrscheinlicher ist die Normalverteilung (in SPSS als „asymptotische Signifikanz 2-seitig“ bezeichnet). Bei einem Wert **> 0.05** ist die Normalverteilung gegeben, diese Werte sind in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben.

Folgende Tabellen zeigen, dass nur bei einem Teil der Daten, hauptsächlich bei den dct-Werten der stimulierten Proben, eine Normalverteilung gegeben ist. Bei den fold-difference-Werten ist die Normalverteilung wesentlich seltener gegeben. Bei der atopischen Untergruppe ist die Normalverteilung der fold-difference-Werte insgesamt noch etwas häufiger gegeben als bei der nicht-atopischen Untergruppe. Daher werden im Folgenden zur Vereinheitlichung der Berechnungen ausschließlich nicht-parametrische Tests angewandt.

3.2.2. Normalverteilung aller untersuchten Gene

dct	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Fold difference	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
IL17 M	87	,000	IL17 PHA	73	,000
IL17 PHA	78	,012*	IL17 LpA	56	,000
IL17 LpA	57	,684*	IL17 Ppg	54	,000
IL17 Ppg dct	57	,912*	RoRC3 PHA	75	,000
RoRC3 M dct	87	,002	RoRC3 LpA	57	,000
RoRC3 PHA dct	81	,612*	RoRC3 Ppg	54	,000
RoRC3 LpA dct	58	,283*	RoRC4 PHA	75	,000
RoRC3 Ppg dct	56	,267*	RoRC4 LpA	56	,000
RoRC4 M dct	87	,050	RoRC4 Ppg	54	,000
RoRC4 PHA dct	81	,675*	IL-23R PHA	69	,000
RoRC4 LpA dct	57	,935*	IL-23R LpA	50	,001
RoRC4 Ppg dct	56	,857*	IL-23R Ppg	47	,000
IL-23R M dct	82	,005	IL21 PHA	30	,001
IL-23R PHA dct	77	,964*	IL21 LpA	5 (!)	,564*
IL-23R LpA dct	52	,626*	IL21 Ppg	6 (!)	,277*
IL-23R Ppg dct	51	,895*			
IL21 M dct	87	,000			
IL21 PHA dct	35	,760*			
IL21 LpA dct	5 (!)	,891*			
IL21 Ppg dct	6 (!)	,996*			

Tabelle 14: Kolmogorov-Smirnoff-Anpassungstest auf Normalverteilung; CBMC der atopischen und nicht-atopischen Mütter zusammengefasst; *Normalverteilung (entspricht $p > 0.05$)

3.2.3. Normalverteilung der Gene in CBMC in der atopischen Untergruppe

dct	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Fold difference	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
IL17 M	33	,022	IL17 PHA	24	<,0001
IL17 PHA	26	,108*	IL17 LpA	19	,164*
IL17 LpA	19	,578*	IL17 Ppg	19	,070*
IL17 Ppg dct	20	,886*	RoRC3 PHA	28	,001
RoRC3 M dct	33	,019	RoRC3 LpA	19	,101*
RoRC3 PHA dct	31	,987*	RoRC3 Ppg	20	,058*
RoRC3 LpA dct	19	,861*	RoRC4 PHA	28	,013
RoRC3 Ppg dct	21	,513*	RoRC4 LpA	19	,031
RoRC4 M dct	33	,048	RoRC4 Ppg	19	,052*
RoRC4 PHA dct	31	,871*	IL-23R PHA	27	,002
RoRC4 LpA dct	19	,998*	IL-23R LpA	19	,275*
RoRC4 Ppg dct	20	,995*	IL-23R Ppg	20	,005
IL-23R M dct	33	,121*	IL21 PHA	11	,057*
IL-23R PHA dct	30	,996*	IL21 LpA	1 (!)	-
IL-23R LpA dct	19	,624*	IL21 Ppg	2 (!)	,999*
IL-23R Ppg dct	21	,896*			
IL21 M dct	33	,032			
IL21 PHA dct	13	,863*			
IL21 LpA dct	1 (!)	-			
IL21 Ppg dct	2 (!)	,999*			

Tabelle 15: Kolgomorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung; nur CBMC der atopischen Mütter;

*Normalverteilung (entspricht $p > 0.05$)

3.2.4. Normalverteilung der Gene in CBMC von nicht-atopischen Müttern

Delta ct	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
IL17 M	54	,003
IL17 PHA	52	,049
IL17 LpA	38	,888*
IL17 Ppg dct	37	,801*
RoRC3 M dct	54	,112*
RoRC3 PHA dct	50	,741*
RoRC3 LpA dct	39	,378*
RoRC3 Ppg dct	35	,402*
RoRC4 M dct	54	,544*
RoRC4 PHA dct	50	,643*
RoRC4 LpA dct	38	,961*
RoRC4 Ppg dct	36	,892*
IL-23R M dct	49	,040
IL-23R PHA dct	47	,956*
IL-23R LpA dct	33	,857*
IL-23R Ppg dct	30	,807*
IL21 M dct	54	,003
IL21 PHA dct	22	,749*
IL21 LpA dct	4	,995*
IL21 Ppg dct	4	,997*

Fold difference	n	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
IL17 PHA	49	,000
IL17 LpA	37	,001
IL17 Ppg	35	,003
RoRC3 PHA	47	,000
RoRC3 LpA	38	,000
RoRC3 Ppg	34	,000
RoRC4 PHA	47	,000
RoRC4 LpA	37	,001
RoRC4 Ppg	35	,001
IL-23R PHA	42	,000
IL-23R LpA	31	,007
IL-23R Ppg	27	,015
IL21 PHA	19	,023
IL21 LpA	4	,665*
IL21 Ppg	4	,583*

Tabelle 16: Kolgomorov-Smirnoff-Anpassungstest auf Normalverteilung; nur CBMC der nicht-atopischen Mütter; *Normalverteilung (entspricht $p > 0.05$)

3.2.5. Deskriptive Statistik der untersuchten Gene

3.2.5.1. Übersichtstabelle der kompletten Gruppe

	n	Mittelwert	Standard- abwei- chung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50.	75.
IL17 M dct	87	21,00	4,24	6,70	25,60	20,60	22,40	23,50
IL17 PHA dct	78	22,24	2,83	13,60	27,80	21,68	22,80	23,93
IL17 LpA dct	57	19,20	2,55	13,40	24,80	17,35	19,30	20,40
IL17 Ppg dct	57	18,77	3,13	9,00	24,70	16,50	18,50	21,25
IL17 PHA fd	73	20,86	87,09	,00	500,00	,30	,71	1,28
IL17 LpA fd	56	40,16	69,49	,00	337,79	1,09	9,85	43,79
IL17 Ppg fd	54	61,98	117,76	,00	500,00	,66	11,72	68,59
RoRC3 M dct	87	20,12	3,86	7,40	25,00	19,40	21,40	22,70
RoRC3 PHA dct	81	18,12	2,15	13,90	24,40	16,75	18,10	19,20
RoRC3 LpA dct	58	19,66	1,70	15,70	24,80	18,60	19,40	20,50
RoRC3 Ppg dct	56	19,33	2,10	11,30	23,90	18,43	19,20	20,40
RoRC3 PHA fd	75	39,51	101,49	,00	500,00	1,00	6,06	21,11
RoRC3 LpA fd	57	10,01	30,43	,00	222,86	,36	2,00	9,19
RoRC3 Ppg fd	54	17,88	68,80	,00	500,00	,38	3,73	8,73
RoRC4 M dct	87	19,17	3,79	7,40	25,10	17,70	19,90	21,90
RoRC4 PHA dct	81	16,81	2,86	11,20	25,50	15,20	16,50	18,35
RoRC4 LpA dct	57	17,79	1,80	13,60	22,20	16,45	17,80	18,85
RoRC4 Ppg dct	56	17,47	2,59	7,10	22,70	16,20	17,60	18,80
RoRC4 PHA fd	75	57,38	115,72	,00	500,00	,47	8,57	55,72
RoRC4 LpA fd	56	20,45	44,52	,00	222,86	,84	3,61	14,93
RoRC4 Ppg fd	54	29,93	75,80	,00	500,00	,45	3,14	25,99
IL-23R M dct	82	20,61	4,02	7,40	25,40	19,40	22,00	23,40
IL-23R PHA dct	77	18,16	2,93	10,30	25,50	16,30	17,90	19,90
IL-23R LpA dct	52	18,38	2,60	12,80	23,90	16,63	18,15	19,88
IL-23R Ppg dct	51	17,78	2,36	11,30	23,10	16,00	17,60	19,40
IL-23R PHA fd	69	56,10	114,36	,00	500,00	,62	9,19	42,33
IL-23R LpA fd	50	55,47	93,45	,00	500,00	,82	9,55	85,09
IL-23R Ppg fd	47	78,10	138,98	,00	500,00	,71	13,00	68,59
IL21 M dct	87	20,94	4,34	6,90	25,60	20,60	22,40	23,50
IL21 PHA dct	35	18,18	2,09	13,70	22,40	16,60	18,50	19,50
IL21 LpA dct	5	20,00	2,91	16,80	24,50	17,50	20,20	22,40
IL21 Ppg dct	6	20,50	1,73	17,60	22,20	19,03	20,85	22,05
IL21 PHA fd	30	59,77	95,80	,00	337,79	6,64	21,87	42,54
IL21 LpA fd	5	10,39	13,79	,71	34,30	1,06	6,96	21,44
IL21 Ppg fd	6	4,22	7,65	,00	19,70	,15	1,31	7,05

Tabelle 17: Deskriptive Statistik der delta-ct- und fold-difference-Werte von Unstimulierten (M) und Stimulierten (PHA, LpA, Ppg); Zusammenfassung von Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, Min/Max, 25., 50. (Median) und 75. Perzentile der CBMC atopischer und nicht-atopischer Mütter

3.2.5.2. Deskriptive Statistik der untersuchten Gene in CBMC von nicht-atopischen Müttern

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
IL17 M dct	54	20,42	4,42	6,70	25,10	19,63	22,10	23,20
IL17 PHA dct	52	22,10	2,94	13,60	27,80	21,53	22,80	23,90
IL17 LpA dct	38	18,73	2,51	13,40	23,20	16,55	19,15	20,03
IL17 Ppg dct	37	18,46	3,23	9,00	23,70	16,50	18,30	20,80
IL17 PHA fd	49	19,69	80,12	,00	500,00	,28	,57	1,07
IL17 LpA fd	37	46,96	81,27	,00	337,79	,92	9,85	54,11
IL17 Ppg fd	35	61,70	119,67	,00	500,00	,38	12,13	64,00
RoRC3 M dct	54	19,75	4,11	7,40	25,00	17,38	21,05	22,80
RoRC3 PHA dct	50	18,24	2,29	13,90	24,40	16,65	18,33	19,35
RoRC3 LpA dct	39	19,42	1,50	15,70	23,90	18,70	19,30	20,30
RoRC3 Ppg dct	35	19,11	2,22	11,30	23,10	18,30	19,20	20,40
RoRC3 PHA fd	47	40,12	105,47	,00	500,00	,50	4,60	17,15
RoRC3 LpA fd	38	11,03	36,17	,00	222,86	,14	2,65	7,34
RoRC3 Ppg fd	34	23,38	86,06	,00	500,00	,35	3,28	7,09
RoRC4 M dct	54	18,68	3,98	7,40	24,00	16,08	19,40	21,90
RoRC4 PHA dct	50	16,74	2,97	11,20	23,40	15,28	16,38	18,48
RoRC4 LpA dct	38	17,56	1,82	13,60	22,20	15,90	17,70	18,73
RoRC4 Ppg dct	36	17,03	2,85	7,10	22,50	15,03	17,20	18,38
RoRC4 PHA fd	47	50,25	106,13	,00	500,00	,23	8,00	34,30
RoRC4 LpA fd	37	22,55	50,01	,00	222,86	,21	2,64	16,04
RoRC4 Ppg fd	35	41,27	92,16	,00	500,00	,23	4,60	51,98
IL-23R M dct	49	20,13	4,12	7,40	25,10	17,20	21,70	23,15
IL-23R PHA dct	47	18,20	3,07	10,30	25,50	16,30	17,90	20,00
IL-23R LpA dct	33	18,02	2,83	12,80	23,90	16,15	18,10	19,40
IL-23R Ppg dct	30	17,46	2,59	11,30	23,10	16,00	17,35	18,65
IL-23R PHA fd	42	36,81	86,84	,00	500,00	,49	6,73	24,25
IL-23R LpA fd	31	53,85	103,73	,00	500,00	,15	4,00	103,97
IL-23R Ppg fd	27	71,15	124,58	,00	500,00	,35	10,56	97,01
IL21 M dct	54	20,41	4,36	7,40	25,10	19,63	22,10	23,20
IL21 PHA dct	22	17,85	2,20	13,70	21,20	16,28	18,40	19,65
IL21 LpA dct	4	19,95	3,36	16,80	24,50	17,15	19,25	23,45
IL21 Ppg dct	4	20,13	2,02	17,60	22,20	18,08	20,35	21,95
IL21 PHA fd	19	49,63	81,13	,00	256,00	3,03	11,31	39,40
IL21 LpA fd	4	12,81	14,65	1,41	34,30	2,80	7,77	27,87
IL21 Ppg fd	4	6,07	9,16	,00	19,70	,44	2,29	15,48

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der delta-ct- und fold-difference-Werte von Unstimulierten (M) und Stimulierten (PHA, LpA, Ppg); selektive Darstellung von Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, Min/Max, 25., 50. (Median) und 75. Perzentile der CBMC nicht-atopischer Mütter

3.2.5.3. Deskriptive Statistik der untersuchten Gene in CBMC von atopischen Müttern

	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
IL17 M dct	33	21,95	3,80	10,30	25,60	21,65	22,90	24,15
IL17 PHA dct	26	22,51	2,62	14,50	26,10	22,18	23,05	24,00
IL17 LpA dct	19	20,15	2,42	15,10	24,80	18,70	19,50	22,20
IL17 Ppg dct	20	19,36	2,93	15,40	24,70	16,63	18,90	22,15
IL17 PHA fd	24	23,27	101,69	,00	500,00	,37	,93	2,23
IL17 LpA fd	19	26,91	35,58	,00	119,43	1,23	17,15	29,86
IL17 Ppg fd	19	62,48	117,41	,00	500,00	,87	11,31	68,59
RoRC3 M dct	33	20,71	3,39	10,30	24,20	20,40	21,50	22,25
RoRC3 PHA dct	31	17,91	1,92	14,20	22,90	16,90	18,00	19,00
RoRC3 LpA dct	19	20,16	2,01	17,30	24,80	18,30	20,30	21,60
RoRC3 Ppg dct	21	19,71	1,85	16,40	23,90	18,70	19,20	20,45
RoRC3 PHA fd	28	38,50	96,31	,00	500,00	2,99	8,93	23,47
RoRC3 LpA fd	19	7,95	13,65	,00	55,72	,87	1,52	9,19
RoRC3 Ppg fd	20	8,52	13,90	,00	59,71	,45	4,61	9,68
RoRC4 M dct	33	19,99	3,37	10,30	25,10	19,45	20,50	22,10
RoRC4 PHA dct	31	16,92	2,72	12,50	25,50	15,00	16,70	18,30
RoRC4 LpA dct	19	18,26	1,70	14,90	22,10	17,10	18,40	19,30
RoRC4 Ppg dct	20	18,27	1,83	15,80	22,70	16,63	18,15	19,23
RoRC4 PHA fd	28	69,36	131,43	,00	500,00	1,51	11,89	80,49
RoRC4 LpA fd	19	16,34	32,03	,02	137,19	1,87	4,60	13,00
RoRC4 Ppg fd	19	9,03	12,84	,00	45,25	1,62	3,03	11,31
IL-23R M dct	33	21,31	3,84	10,30	25,40	20,35	22,20	24,00
IL-23R PHA dct	30	18,12	2,76	13,60	25,10	15,95	17,85	19,83
IL-23R LpA dct	19	18,99	2,07	15,70	23,80	17,70	18,50	20,50
IL-23R Ppg dct	21	18,23	1,97	15,10	22,40	16,20	18,50	19,80
IL-23R PHA fd	27	86,12	144,13	,00	500,00	,93	21,11	157,59
IL-23R LpA fd	19	58,10	76,33	,00	274,37	3,03	32,00	78,79
IL-23R Ppg fd	20	87,49	159,25	,00	500,00	6,42	14,50	66,37
IL21 M dct	33	21,80	4,23	6,90	25,60	21,50	23,00	24,20
IL21 PHA dct	13	18,74	1,85	15,40	22,40	17,70	18,90	19,50
IL21 LpA dct	1	20,20	.	20,20	20,20	.	.	.
IL21 Ppg dct	2	21,25	1,06	20,50	22,00	15,38	21,25	20,90
IL21 PHA fd	11	77,30	119,31	5,66	337,79	8,57	27,86	51,98
IL21 LpA fd	1	,71	.	,71	,71	.	.	.
IL21 Ppg fd	2	,54	,47	,20	,87	,15	,54	2,80

Tabelle 19: Deskriptive Statistik der delta-ct- und fold-difference-Werte von Unstimulierten (M) und Stimulierten (PHA, LpA, Ppg); selektive Darstellung von Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, min/max, 25., 50. (Median) und 75. Perzentile der CBMC atopischer Mütter

3.2.6. Statistik der detektierbaren Gene in den Nabelschnurblutproben

Nicht-detektierbare Gene stehen für Nabelschnurblutproben mit ct-Werten unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Fälle wurden anhand der Schmelzkurven und der Quantifikation mit ct-Werten ermittelt. Während die detektierbaren Proben stabile Schmelzkurven mit gentyptischen Temperaturpeaks aufwiesen, zeigten sich die nicht-detektierbaren Gene mit einer qualitativ schlechten und nicht auszuwertenden Schmelzkurve (s. Abb.).

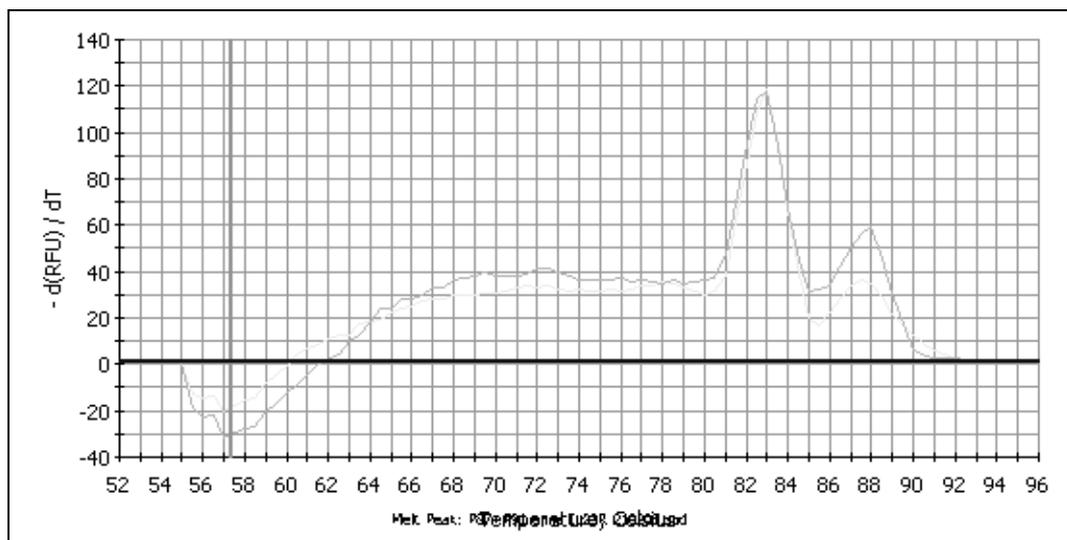


Abb. 27: Grafik aus iCycler-Programm (Biorad); Beispiel für detektierbaren Wert in der rt RT-PCR: PAULINA Nr. 87 IL-17 LpA; ct=32,5

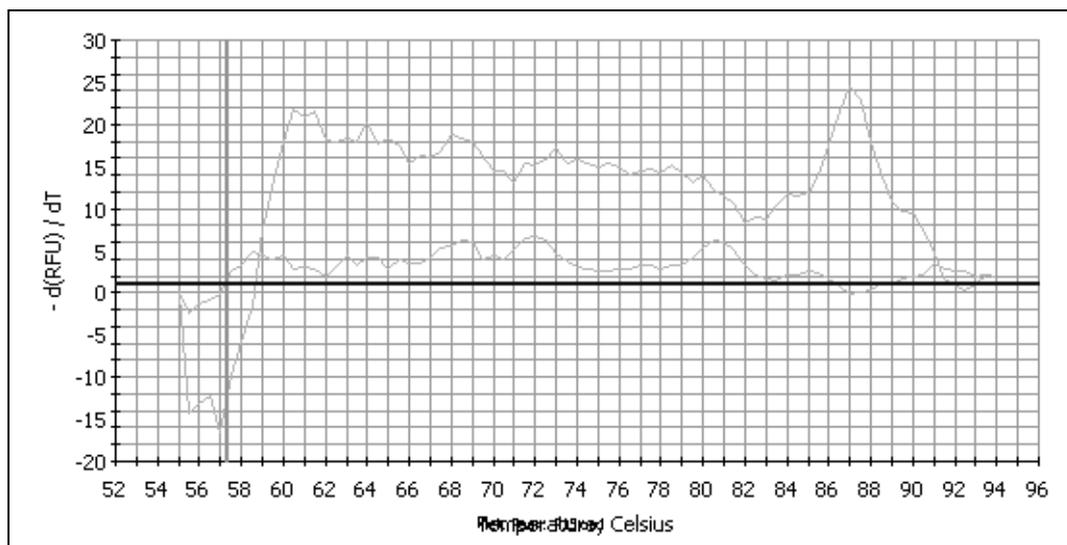


Abb. 28: Grafik aus iCycler-Programm (Biorad); Beispiel für „nicht-detektierbaren“ Wert in der rt RT-PCR: P15 IL17 Media; automatisch ermittelter Wert ct=34,2 ist bei dieser Schmelzkurve nicht verwendbar

Vor allem bei den unstimulierten Media-Werten wurden „nicht-detektierbare“ Werte ermittelt, während die Genexpression bei PHA, LpA und Ppg des gleichen Probanden nachweisbar war. Um die Daten beim Rechenschritt *fold difference*, bei dem PHA, LpA und Ppg jeweils von Media subtrahiert wurde (s.o.) nicht zu verlieren, wurde für die „nicht-detektierbaren“ Werte der für unsere Daten niedrigste Standardwert $ct=38$ eingesetzt.

Um die Verlässlichkeit der Daten nach der Zensierung abzuschätzen, wurde für diesen Vorgang ein statistisches Modell angewandt, das in Kapitel 3.2.6 näher erläutert wird. Dort findet sich auch eine Gegenüberstellung der Daten vor und nach Zensierung.

%	Media ct	PHA ct	LpA ct	Ppg ct
IL-17	89,5	68,4	15,8	17,9
RoRC3	67,4	16,8	13,7	17,9
RoRC4	47,4	14,7	8,4	12,6
IL-21	91,6	-	-	-
IL-23R	81,1	18,9	14,7	14,7

Tabelle 20: Anteil von nicht-detektierbaren an allen ausgewerteten Proben, in %

3.2.7. Expression in den Th17-relevanten Genen nach Stimulation

RoRC3 und RoRC4

Die Gene des Transkriptionsfaktoren RoRC3 und RoRC4 wurden bei allen 3 Stimulationsbedingungen im Vergleich zum unstimulierten Media hochreguliert. Diesbezüglich waren keine Unterschiede zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren zu sehen. Insgesamt lag jedoch die Expression bei RoRC4 höher als bei RoRC3. Dieser quantitative Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass der Primer von RoRC4 die Isoformen a und b des Transkriptionsfaktors einschließt, während die Primer von RoRC3 so konzipiert wurden, dass nur spezifisch die Isoform b detektiert wurde (vgl. Kapitel 2.3.3.2 im Methodenteil).

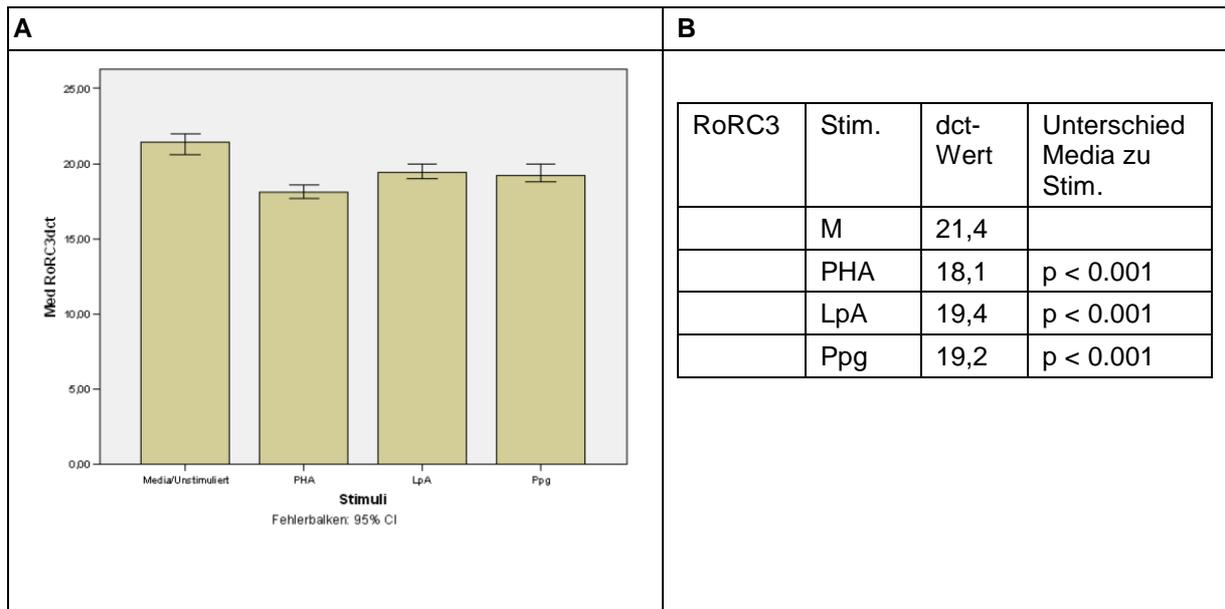


Abb. 29: **A** Expression von RoRC3 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; hohe numerische Werte entsprechen niedriger Expression; **B** p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test)

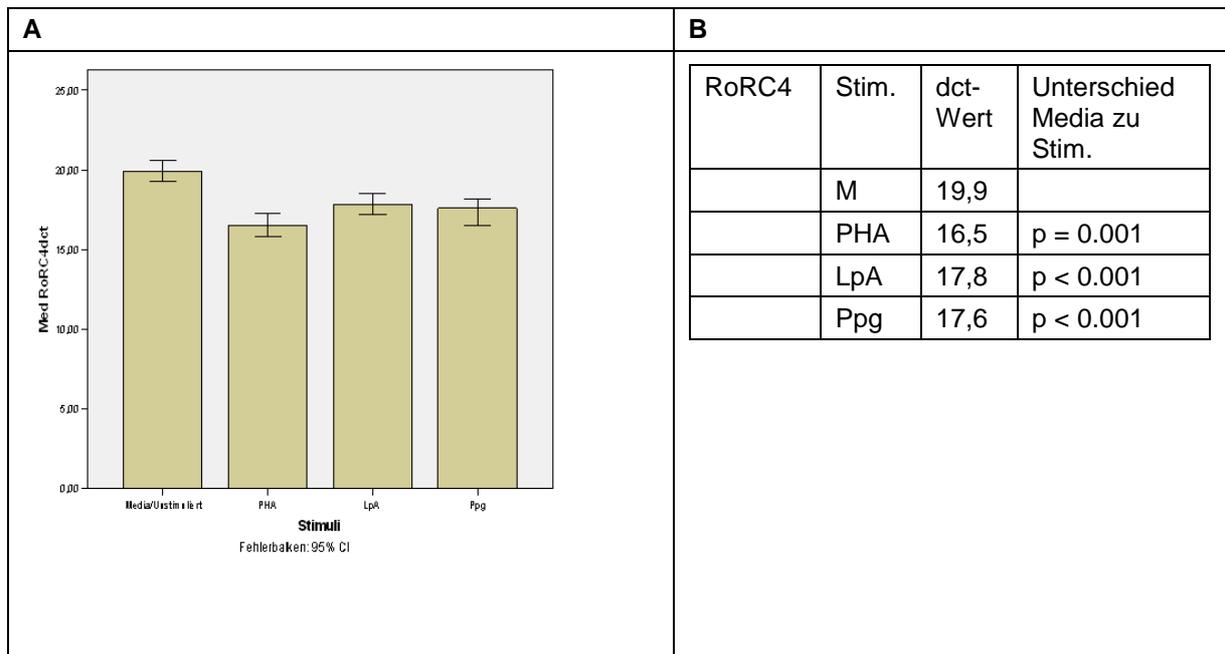


Abb. 30: **A** Expression von RoRC4 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; hohe numerische Werte entsprechen niedriger Expression; **B** p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test)

IL-23R

Auch die Genexpression von IL-23R nahm unter allen 3 Stimulationsbedingungen zu.

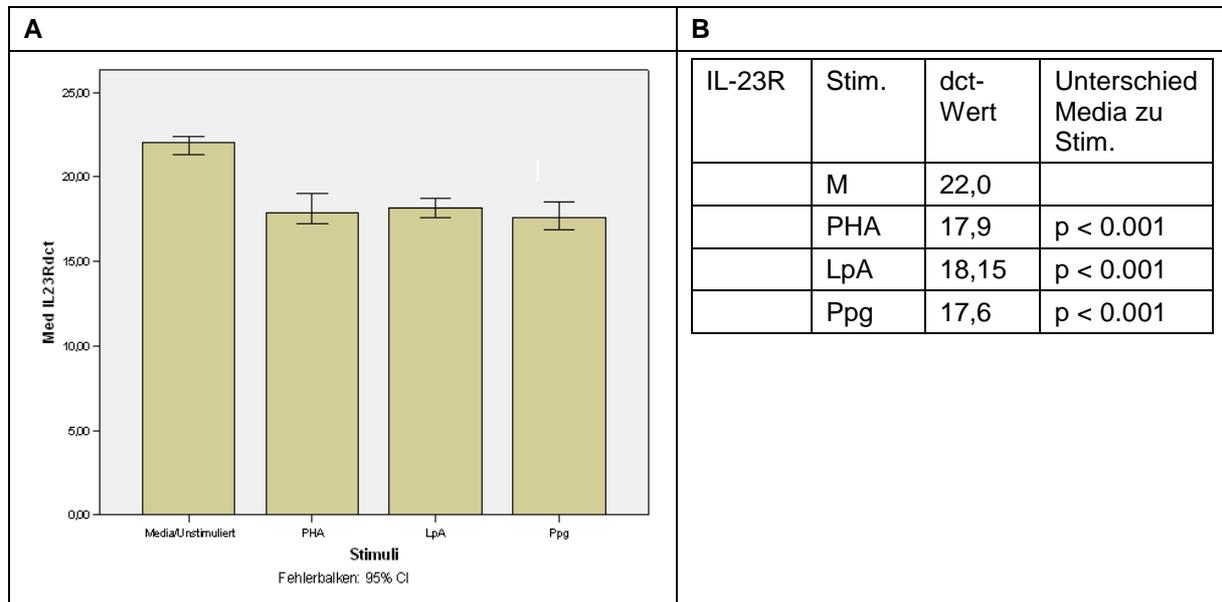


Abb. 31: A Expression von RoRC4 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; hohe numerische Werte entsprechen niedriger Expression; B p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test)

IL-17

Bei der Stimulation des angeborenen Immunsystems zeigte sich eine Hochregulierung der Genexpression von IL-17: bei LpA ($p < 0.001$) und Ppg ($p < 0.001$). Im Gegensatz dazu war eine Reduktion der Genexpression nach Stimulation des erworbenen Immunsystems mittels PHA ersichtlich (vgl. Tabelle 16 im Ergebnisteil), diese war mit $p = 0.065$ deutlich, jedoch nicht signifikant.

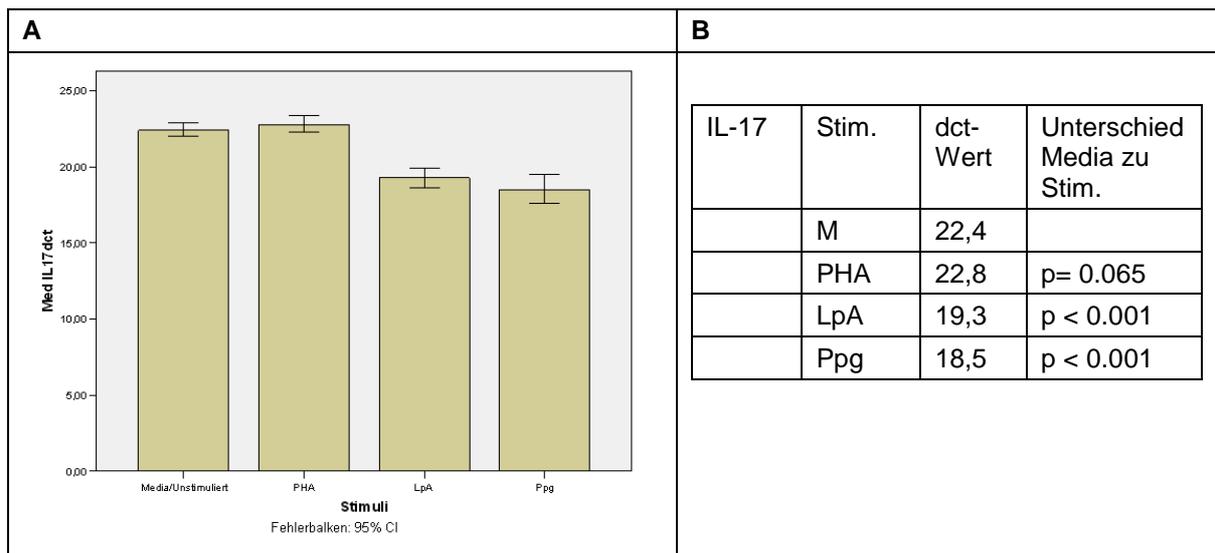


Abb. 32: **A** Expression von IL-17 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; **B** p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test)

Diese Aussage bestätigt sich bei Betrachtung der fold-difference-Werte (fd), die ja den vielfachen Unterschied der Stimulierten zu den unstimulierten Proben darstellen. Bei IL-17 PHA findet sich analog zu den ct-Werten eine Herunterregulierung (fd = 0,71¹), bei LpA (fd = 9,85) und ausgeprägter noch bei Ppg eine Hochregulierung (fd = 11,72).

3.2.8. Vergleich der atopischen mit der nicht-atopischen Gruppe

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Alle p-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant definiert. Bei den unstimulierten IL17 Media (dct-Wert) wurde ein signifikanter Unterschied (p= 0,030) mit niedrigerer Genexpression im Nabelschnurblut atopischer Mütter nachgewiesen.

Nicht signifikant unterschiedlich, aber als richtungsweisend (p < 0.1) mit niedrigerer Expression in der Gruppe mit maternaler Atopie betrachtet werden können:

IL17 (dct-Wert) mit p= 0.085 nach mikrobieller Stimulation mit LpA und RoRC4 (dct-Wert) mit p=0.078 nach mikrobieller Stimulation mit Ppg.

¹ Ein fold-difference-Wert < 1 entspricht einer Verminderung der Genexpression auf mRNA-Ebene, ein Wert > 1 dementsprechend einer Steigerung der Genexpression.

Variable	Anzahl n	Minimum	1.Quartile	Median	3.Quartile	Maximum	p-Wert
IL17_LpA_dct	70	13.40	16.60	19.15	20.00	23.20	0.085
	48	15.10	18.70	19.50	22.20	24.80	.
IL17_M_dct	70	6.70	20.10	22.10	23.20	25.10	0.030
	48	10.30	21.70	22.90	24.10	25.60	.
IL17_PHA_dct	70	13.60	21.55	22.80	23.90	27.80	0.478
	48	14.50	22.30	23.05	24.00	26.10	.
IL17_Ppg_dct	70	9.00	16.60	18.30	20.40	23.70	0.424
	48	15.40	16.85	18.90	21.90	24.70	.
IL17_PHA_fd	70	0.00	0.29	0.57	1.07	500.00	0.218
	48	0.00	0.38	0.93	1.99	500.00	.
IL17_Ppg_fd	70	0.00	0.38	12.13	64.00	500.00	0.747
s	48	0.00	0.87	11.31	68.59	500.00	.
RoRC3_LpA_dct	70	15.70	18.70	19.30	20.30	23.90	0.268
	48	17.30	18.30	20.30	21.60	24.80	.
RoRC3_M_dct	70	7.40	17.40	21.05	22.80	25.00	0.437
	48	10.30	20.50	21.50	22.20	24.20	.
RoRC3_PHA_dct	70	13.90	16.70	18.33	19.30	24.40	0.665
	48	14.20	16.90	18.00	19.00	22.90	.
RoRC3_Ppg_dct	70	11.30	18.30	19.20	20.40	23.10	0.494
	48	16.40	18.80	19.20	20.20	23.90	.
RoRC3_LpA_fd	70	0.00	0.15	2.65	6.50	222.86	0.629
	48	0.00	0.87	1.52	9.19	55.72	.
RoRC3_PHA_fd	70	0.00	0.50	4.59	17.15	500.00	0.189
	48	0.00	3.16	8.92	22.68	500.00	.
RoRC3_Ppg_fd	70	0.00	0.41	3.28	6.96	500.00	0.502
	48	0.00	0.59	4.61	9.52	59.71	.
RoRC4_LpA_dct	70	13.60	15.90	17.70	18.70	22.20	0.207
	48	14.90	17.10	18.40	19.30	22.10	.
RoRC4_M_dct	70	7.40	16.10	19.40	21.90	24.00	0.118
	48	10.30	19.50	20.50	22.00	25.10	.
RoRC4_PHA_dct	70	11.20	15.30	16.38	18.40	23.40	0.851
	48	12.50	15.00	16.70	18.30	25.50	.
RoRC4_Ppg_dct	70	7.10	15.05	17.20	18.35	22.50	0.078
	48	15.80	16.75	18.15	19.15	22.70	.
RoRC4_LpA_fd	70	0.00	0.22	2.64	14.93	222.86	0.293
	48	0.02	1.87	4.59	13.00	137.19	.
RoRC4_PHA_fd	70	0.00	0.23	8.00	34.30	500.00	0.408
	48	0.00	2.02	11.89	76.52	500.00	.
RoRC4_Ppg_fd	70	0.00	0.23	4.59	51.98	500.00	0.658
	48	0.00	1.62	3.03	11.31	45.25	.

Variable	Anzahl n	Minimum	1.Quartile	Median	3.Quartile	Maximum	p-Wert
IL23R_M_dct	70	7.40	17.30	21.70	23.10	25.10	0.132
	48	10.30	20.40	22.20	23.90	25.40	.
IL23R_PHA_dct	70	10.30	16.30	17.90	20.00	25.50	0.847
	48	13.60	16.10	17.85	19.80	25.10	.
IL23R_LpA_dct	70	12.80	16.40	18.10	19.40	23.90	0.194
	48	15.70	17.70	18.50	20.50	23.80	.
IL23R_Ppg_dct	70	11.30	16.00	17.35	18.60	23.10	0.211
	48	15.10	16.40	18.50	19.80	22.40	.
IL23R_PHA_fd	70	0.00	0.50	6.73	24.25	500.00	0.161
	48	0.00	0.93	21.11	157.59	500.00	.
IL23R_LpA_fd	70	0.00	0.15	4.00	103.97	500.00	0.174
	48	0.00	3.03	32.00	78.79	274.37	.
IL23R_Ppg_fd	70	0.00	0.35	10.56	97.01	500.00	0.469
	48	0.00	7.56	14.50	64.15	500.00	.

Tabelle 21: Wilcoxontest und deskriptive Statistik zum Vergleich Gruppen mit/ohne maternale Atopie

3.2.8.1. Genexpression von IL-17

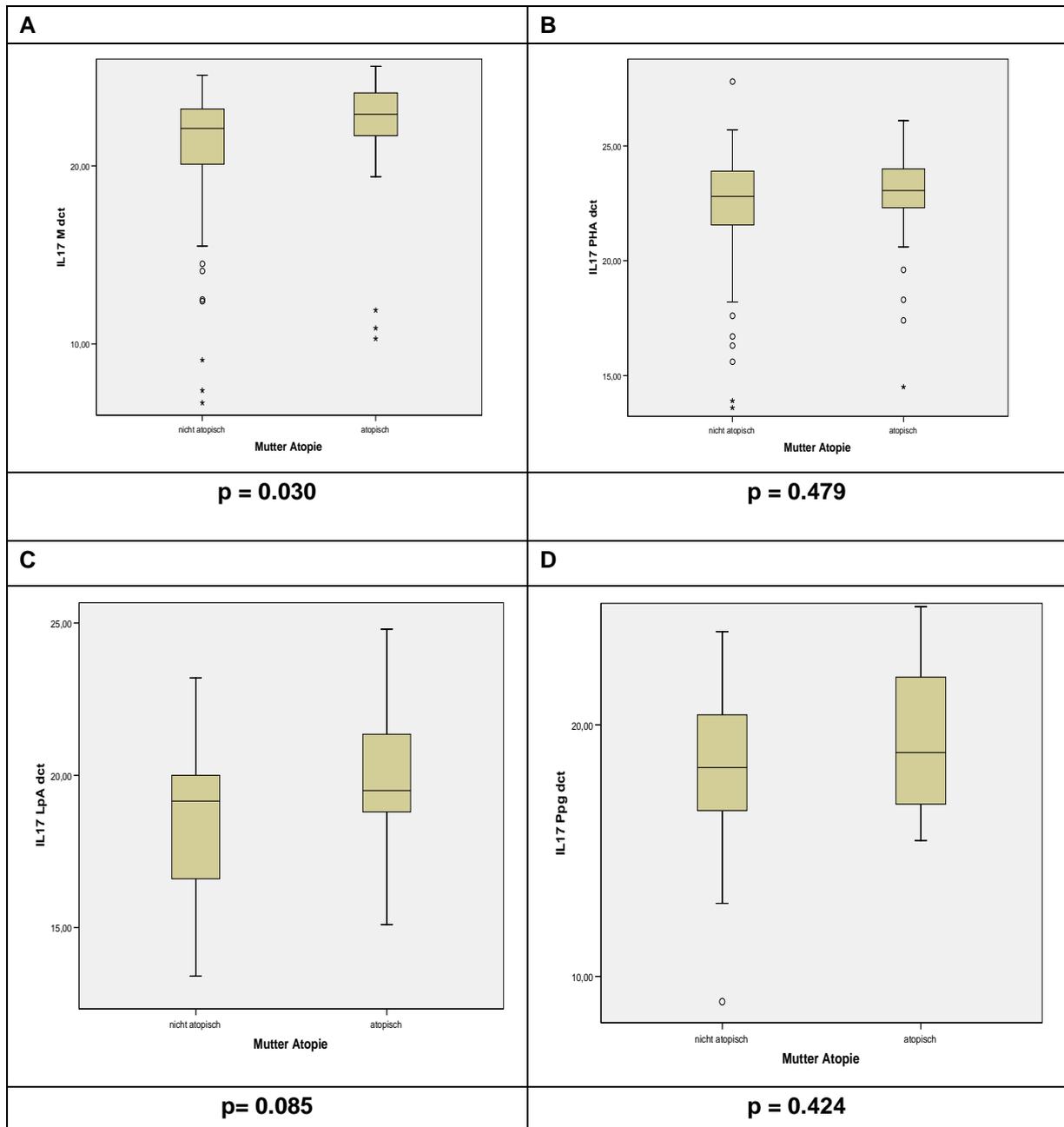


Abb. 33 IL-17: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct

3.2.8.2. RoRC3

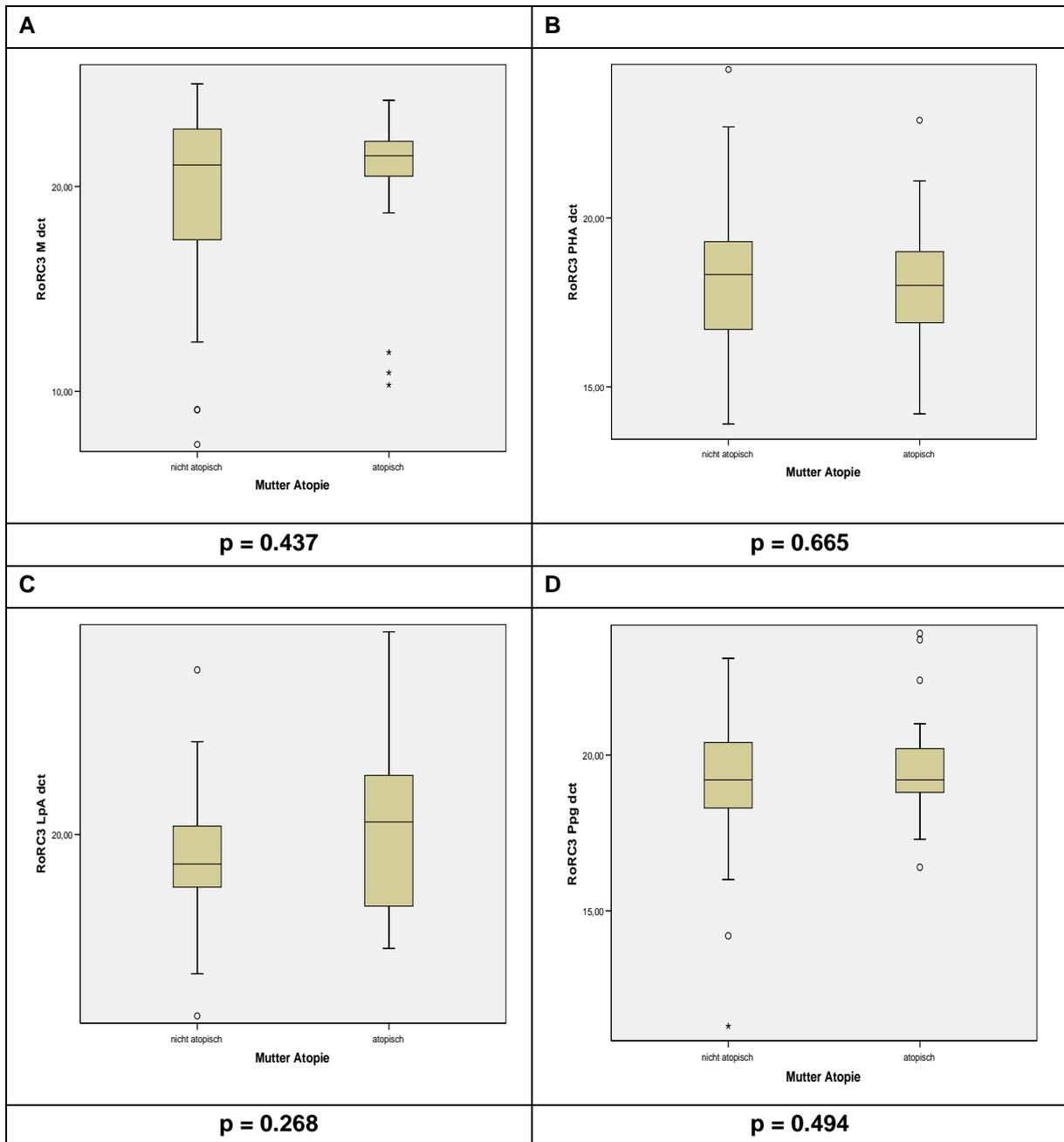


Abb. 34: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct

3.2.8.3. RoRC4

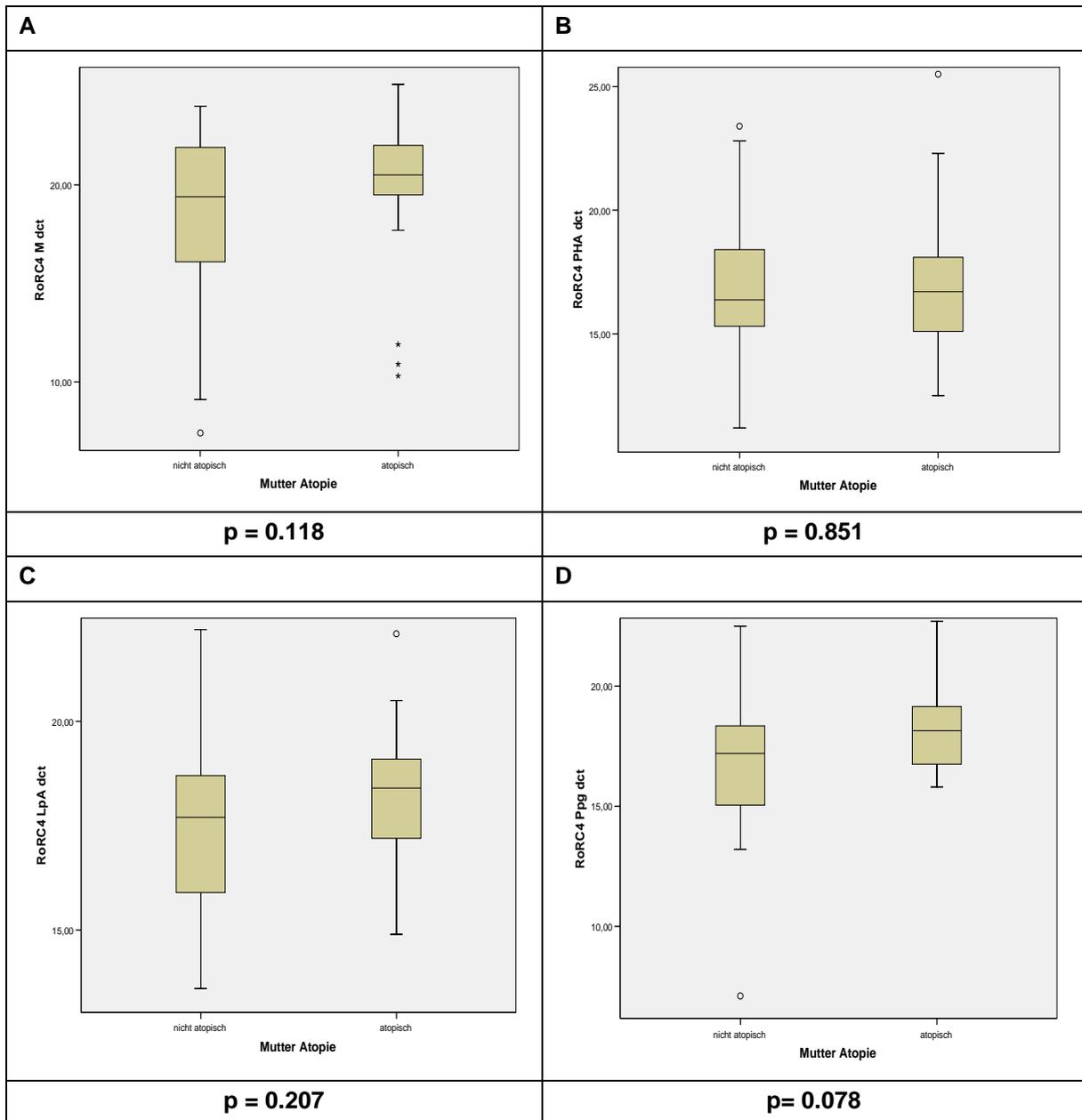


Abb. 35: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct

3.2.8.4. IL-23R

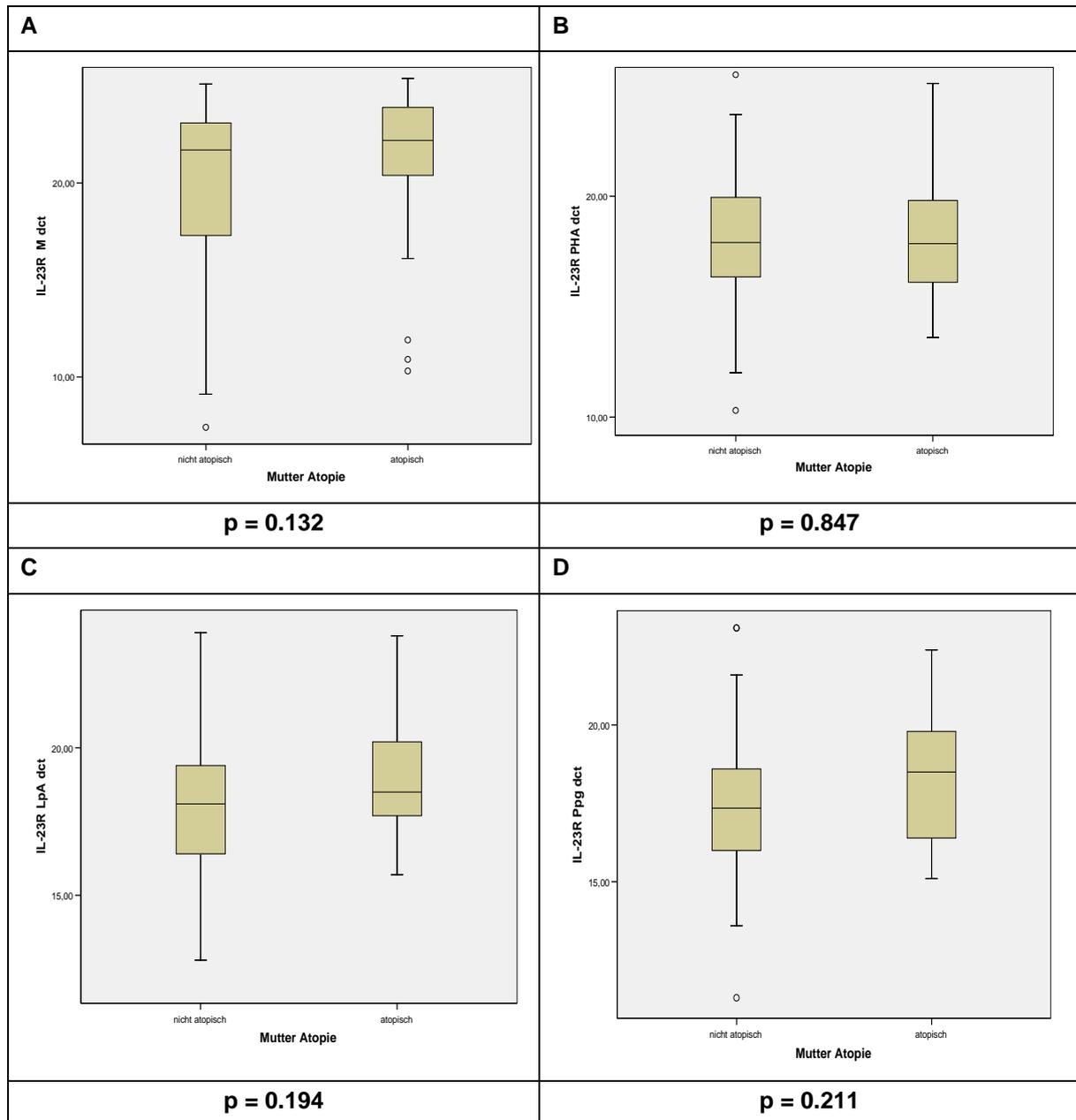


Abb. 36: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct

3.2.9. Zensierte Daten

Bei der Auswertung der real-time-RT-PCR-Daten ergab sich das in Kapitel 2.4.1 beschriebene Problem der nicht-nachweisbaren Proben oder „undetectables“. Um die vorgenommene Zensierung (also die für die „undetectables“ eingefügten ct-

Werte) berücksichtigen zu können, wurde ein statistisches Rechenmodell angewandt, das im Folgenden kurz umrissen wird.

Deskriptive Statistik (Nikolaus Ballenberger)²

„Zur Erstellung der Lage- und Streuungsmasse wie z.B. Median und Interquartilbereich wurde bei linkszensierten Daten mit einem Zensierungslimit die Standardmethode verwendet. Demnach ist der Median der Wert, der den Datensatz, nachdem er vom niedrigsten zum höchsten Wert sortiert wurde, gleichermaßen in eine obere und untere Hälfte teilt. Der Interquartilabstand ist die Differenz zwischen dem 1. und 3. Quartil.

Zur Erstellung der Lage- und Streuungsmasse wie z.B. Median und Interquartilbereich wurde bei rechtszensierten Daten mit mehreren Zensierungslimits (Real-time RT-PCR) die Kaplan-Meier Methode verwendet [88]. Die ursprünglich aus der Überlebensanalyse stammende Methode ist das Mittel der Wahl für rechtszensierte Daten mit mehreren Zensierungslimits.

Statistischer nichtparametrischer Vergleich von zwei und mehr unabhängigen Gruppen ohne Adjustierung

Der Wilcoxon-Test (bzw. Kruskal-Wallis-test) ist ein parameterfreier statistischer Test, der zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier oder mehrerer unabhängiger Verteilungen dient. Er kann bei linkszensierten Daten mit einem Zensierungslimit angewandt werden.

Zum Vergleich von zwei und mehr unabhängigen Gruppen wurde bei rechtszensierten Daten mit mehreren Zensierungslimits (Real-time RT-PCR) der generalisierte Wilcoxon Test [89] [90]. verwendet. Dieser ist eine Erweiterung des Wilcoxon Tests und berücksichtigt im Gegensatz zu diesem Rechtszensierungen mit mehreren Zensierungslimits.

Nichtparametrisches Regressionsmodell mit Berücksichtigung von zensierten Daten

Zur Analyse von nichtparametrischen Daten mit sowohl Links- wie Rechtszensierungen mit Adjustierung für entsprechende Kovariablen wurde das

² Kurzfassung des Autors; vgl. Ballenberger, Nikolaus: „Novel statistical approaches for censored immunological data: analysis of cytokine and gene expression data“ (zum Zeitpunkt der Drucklegung noch nicht publiziert)

Tobit Modell auf rangtransformierte Daten angewandt. D.h. Zunächst wurden die Daten in Ränge transformiert, wodurch eine uniforme Verteilung entsteht, die die Anwendung von parametrischen Modellen erlaubt[91] [92]. Die Ränge wurden anschließend mit dem klassischen Tobit Modell analysiert [93].

Die Ränge von zensierten Beobachtungen wurden als „zensiert“ gekennzeichnet. Somit wurden Zensierungen in der statischen Analyse berücksichtigt.“

In der folgenden Tabelle werden die Daten wurden unter Anwendung dieses statistischen Zensierungsmodells überprüft und mit dem ursprünglichen p-Wert verglichen. Zusätzlich wurde ermittelt, wie sich die Daten nach Adjustierung auf die schon bekannten Einflussfaktoren mütterliches Rauchen, Schulbildung, Anzahl Schwangerschaften und väterliche Atopie verändern.

Gen	Atopiestatus	Total	Anteil zensierter Werte in %	Q1	Median	Q3	p-Wert (Wilcoxon)	p-Wert nach Zensierung	p-Wert nach Adjustierung
IL17_LpA_dct	nicht atopisch	38	26.32	16.60	19.15	20.00	0.085	0.188	0.246
	atopisch	19	26.32	18.70	19.50	22.20	.	.	
IL17_LpA_fd	nicht atopisch	37	97.30	1.07	9.85	48.50	0.740	0.873	0.835
	atopisch	19	94.74	1.23	17.15	29.86	.	.	
IL17_M_dct	nicht atopisch	54	96.30	20.10	22.10	23.20	0.030	0.477	0.800
	atopisch	33	96.97	21.70	22.90	24.10	.	.	
IL17_PHA_dct	nicht atopisch	52	82.69	21.55	22.80	23.90	0.478	0.521	0.555
	atopisch	26	84.62	22.30	23.05	24.00	.	.	
IL17_Ppg_dct	nicht atopisch	37	27.03	16.60	18.30	20.40	0.424	0.523	0.421
	atopisch	20	35.00	16.85	18.90	21.90	.	.	
IL17_PHA_fd	nicht atopisch	49	97.96	0.29	0.57	1.07	0.218	0.527	0.931
	atopisch	24	100.00	0.38	0.93	1.99	.	.	
IL17_Ppg_fd	nicht atopisch	35	97.14	0.38	12.13	64.00	0.747	0.441	1.000
	atopisch	19	100.00	0.87	11.31	68.59	.	.	
IL21_LpA_dct	nicht atopisch	4	0.00	17.50	19.25	22.40	1.00	1.000	0.550
	atopisch	1	0.00	20.20	20.20	20.20	.	.	
IL21_M_dct	nicht atopisch	54	98.15	20.10	22.10	23.20	0.028	0.309	0.451
	atopisch	33	90.91	21.60	23.00	24.20	.	.	

Gen	Atopiestatus	Total	Anteil zensierter Werte in %	Q1	Median	Q3	p-Wert (Wilcoxon)	p-Wert nach Zensierung	p-Wert nach Adjustierung
IL21_PHA_dct	nicht atopisch	22	0.00	16.40	18.40	19.50	0.325	0.325	0.216
	atopisch	13	0.00	17.80	18.90	19.40	.	.	
IL21_Ppg_dct	nicht atopisch	4	0.00	18.55	20.35	21.70	0.663	0.663	0.142
	atopisch	2	0.00	20.50	21.25	22.00	.	.	
IL21_LpA_fd	nicht atopisch	4	100.00	4.19	7.77	21.44	0.046	0.046	-
	atopisch	1	0.00	0.71	0.71	0.71	.	.	
IL21_PHA_fd	nicht atopisch	19	100.00	3.03	11.31	39.40	0.188	0.317	-
	atopisch	11	90.91	8.57	27.86	51.98	.	.	
IL21_Ppg_fd	nicht atopisch	4	100.00	0.87	2.28	11.26	0.332	0.221	-
	atopisch	2	50.00	0.20	0.54	0.87	.	.	
RoRC3_LpA_dct	nicht atopisch	39	23.08	18.70	19.30	20.30	0.268	0.553	0.441
	atopisch	19	21.05	18.30	20.30	21.60	.	.	
RoRC3_M_dct	nicht atopisch	54	77.78	17.40	21.05	22.80	0.437	0.715	0.723
	atopisch	33	63.64	20.50	21.50	22.20	.	.	
RoRC3_PHA_dct	nicht atopisch	50	24.00	16.70	18.33	19.30	0.665	0.443	0.311
	atopisch	31	12.90	16.90	18.00	19.00	.	.	
RoRC3_Ppg_dct	nicht atopisch	35	31.43	18.30	19.20	20.40	0.494	0.876	0.923
	atopisch	21	28.57	18.80	19.20	20.20	.	.	
RoRC3_LpA_fd	nicht atopisch	38	78.95	0.15	2.65	6.50	0.629	0.210	0.344
	atopisch	19	57.89	0.87	1.52	9.19	.	.	
RoRC3_PHA_fd	nicht atopisch	47	82.98	0.50	4.59	17.15	0.189	0.835	0.899
	atopisch	28	64.29	3.16	8.92	22.68	.	.	
RoRC3_Ppg_fd	nicht atopisch	34	79.41	0.41	3.28	6.96	0.502	0.854	0.474
	atopisch	20	75.00	0.59	4.61	9.52	.	.	
RoRC4_LpA_dct	nicht atopisch	38	18.42	15.90	17.70	18.70	0.207	0.302	0.313
	atopisch	19	5.26	17.10	18.40	19.30	.	.	
RoRC4_M_dct	nicht atopisch	54	50.00	16.10	19.40	21.90	0.118	0.195	0.185
	atopisch	33	51.52	19.50	20.50	22.00	.	.	
RoRC4_PHA_dct	nicht atopisch	50	18.00	15.30	16.38	18.40	0.851	0.761	0.945
	atopisch	31	16.13	15.00	16.70	18.30	.	.	

Gen	Atopiestatus	Total	Anteil zensierter Werte in %	Q1	Median	Q3	p-Wert (Wilcoxon)	p-Wert nach Zensierung	p-Wert nach Adjustierung
RoRC4_Ppg_dct	nicht atopisch	36	22.22	15.05	17.20	18.35	0.078	0.102	0.188
	atopisch	20	20.00	16.75	18.15	19.15	.	.	
RoRC4_LpA_fd	nicht atopisch	37	51.35	0.22	2.64	14.93	0.293	0.535	0.365
	atopisch	19	47.37	1.87	4.59	13.00	.	.	
RoRC4_PHA_fd	nicht atopisch	47	57.45	0.23	8.00	34.30	0.408	0.658	0.644
	atopisch	28	53.57	2.02	11.89	76.52	.	.	
RoRC4_Ppg_fd	nicht atopisch	35	60.00	0.23	4.59	51.98	0.658	0.776	0.749
	atopisch	19	52.63	1.62	3.03	11.31	.	.	
IL23R_M_dct	nicht atopisch	49	91.84	17.30	21.70	23.10	0.132	0.470	0.621
	atopisch	33	81.82	20.40	22.20	23.90	.	.	
IL23R_PHA_dct	nicht atopisch	47	23.40	16.30	17.90	20.00	0.847	0.782	0.998
	atopisch	30	23.33	16.10	17.85	19.80	.	.	
IL23R_LpA_dct	nicht atopisch	33	30.30	16.40	18.10	19.40	0.194	0.295	0.711
	atopisch	19	15.79	17.70	18.50	20.50	.	.	
IL23R_Ppg_dct	nicht atopisch	30	30.00	16.00	17.35	18.60	0.211	0.298	0.515
	atopisch	21	19.05	16.40	18.50	19.80	.	.	
IL23R_PHA_fd	nicht atopisch	42	90.48	0.50	6.73	24.25	0.161	0.814	0.689
	atopisch	27	88.89	0.93	21.11	157.59	.	.	
IL23R_LpA_fd	nicht atopisch	31	93.55	0.15	4.00	103.97	0.174	1.000	0.644
	atopisch	19	89.47	3.03	32.00	78.79	.	.	
IL23R_Ppg_fd	nicht atopisch	27	100.00	0.35	10.56	97.01	0.469	0.264	-
	atopisch	20	95.00	7.56	14.50	64.15	.	.	

Tabelle 22: Vergleich der Daten vor/nach Berücksichtigung der Zensierung und Adjustierung.

Nach der Berücksichtigung der Zensierung und nach Adjustierung auf Confounder änderten sich die Daten teilweise deutlich. Das heißt, der teilweise signifikante oder tendenzielle Unterschied zwischen den CBMC atopischer und nicht-atopischer Mütter wurde weniger offensichtlich.

3.2.10. Ppg- und LpA-Stimulation

Stimulation von TLR-2 und NOD2 durch Ppg, Stimulation von TLR4 durch LpA.

Gen	CBMC nicht-atopischer Mütter			CBMC atopischer Mütter		
	TLR2/NOD2/ Ppg	TLR4/LpA	p-Werte NA	TLR2 Ppg	TLR4 LpA	p-Werte A
IL17 dct	18,30	19,15	0,803	18,90	19,50	0,238
IL17 fd	12,13	9,85	0,774	11,31	17,15	0,793
RoRC3 dct	19,20	19,30	0,596	19,20	20,30	0,569
RoRC3 fd	3,28	2,65	0,795	4,61	1,52	0,715
RoRC4 dct	17,20	17,70	0,307	18,15	18,40	0,877
RoRC4 fd	4,60	2,64	0,450	3,03	4,59	0,373
IL-23R dct	17,35	18,10	0,413	18,50	18,50	0,356
IL-23R fd	10,56	4,00	0,697	14,50	32,00	0,922

Tabelle 23: CBMC nicht-atopischer und atopischer Mütter; Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen TLR2/NOD2- und TLR4-Aktivierung; Mediane

Gen	CBMC nicht-atopischer Mütter			CBMC atopischer Mütter		
	Mitogen/PHA	TLR4/LpA	p-Werte	Mitogen/PHA	TLR4/LpA	p-Werte
IL-17 dct	22,80	19,15	< 0,00001	23,05	19,50	0,003
IL-17 fd	0,57	9,85	0,001	0,93	17,15	0,002
RoRC3 dct	18,33	19,30	0,002	18,00	20,30	0,001
RoRC3 fd	4,60	2,65	0,138	8,92	1,52	0,043
RoRC4 dct	16,38	17,70	0,075	16,70	18,40	0,017
RoRC4 fd	8,00	2,64	0,198	11,89	4,59	0,242
IL-23R dct	17,90	18,10	0,633	17,85	18,50	0,189
IL-23R fd	6,73	4,00	0,927	21,11	32,00	0,780

Tabelle 24: CBMC nicht-atopischer und atopischer Mütter; Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen Mitogen und TLR4-Stimulation; Mediane; p ≤ 0.05 fett gedruckt

IL-17dct ist bei TLR4-Stimulation signifikant höher exprimiert ($p < 0,00001$ (NA) bzw. $p = 0,0034$ (A)). RoRC3 ist nach TLR4-Aktivierung niedriger exprimiert ($p = 0,0021$ (NA) bzw. $p = 0,0005$ (A), RoRC4 ($p = 0,075$ (NA) bzw. $0,017$ (A)) und IL-23R ist ebenfalls bei PHA höher exprimiert, wenn auch nicht signifikant.

Gen	CBMC nicht-atopischer Mütter			CBMC atopischer Mütter		
	Mitogen/PHA	TLR2/NOD/Ppg	p-Werte	Mitogen/PHA	TLR2/NOD/Ppg	p-Werte
IL17 dct	22,80	18,30	< 0,00001	23,05	18,90	0,001
IL17 fd	0,57	12,13	0,001	0,93	11,31	0,012
RoRC3 dct	18,33	19,20	0,022	18,00	19,20	0,001
RoRC3 fd	4,60	3,28	0,282	8,92	4,61	0,061
RoRC4 dct	16,38	17,20	0,485	16,70	18,15	0,017
RoRC4 fd	8,00	4,60	0,640	11,89	3,03	0,054
IL-23R dct	17,90	17,35	0,202	17,85	18,50	0,730
IL-23R fd	6,73	10,56	0,412	21,11	14,50	0,651

Tabelle 25: CBMC nicht-atopischer und atopischer Mütter; Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zwischen Mitogen und TLR2/NOD-Stimulation; Mediane; $p \leq 0.05$ fett gedruckt

Bei TLR2- und PHA-Stimulation zeigten sich bei Betrachtung der dct-Werte sehr ähnliche Ergebnisse. IL-17 war bei Ppg wesentlich höher exprimiert als nach PHA-Stimulation ($p < 0.0001$ (NA) bzw. $p = 0.0013$ (A)). Umgekehrt zeigte sich bei RoRC3 wieder eine signifikant erniedrigte Expression nach TLR2/NOD-Aktivierung ($p = 0.022$ (NA) bzw. 0.0012 (A)). Bei RoRC4 war ein signifikanter Unterschied nur in der atopischen Gruppe feststellbar ($p = 0.017$).

3.2.11. Korrelationen

Gene (fd)	Stimuli	Gesamt			CBMC nicht atopischer Mütter			CBMC atopischer Mütter		
		n	r	p	n	r	p	n	r	p
IL17/RoRC3	PHA	70	,432(**)	,00019	46	,360(*)	,01397	24	,586(**)	,00261
	LpA	54	,808(**)	,00000	36	,857(**)	,00000	18	,730(**)	,00059
	Ppg	53	,674(**)	,00000	34	,757(**)	,00000	19	,456(*)	,04992
IL17/RoRC4	PHA	70	,449(**)	,00010	46	,379(**)	,00943	24	,616(**)	,00135
	LpA	53	,772(**)	,00000	35	,793(**)	,00000	18	,695(**)	,00136
	Ppg	53	,743(**)	,00000	35	,776(**)	,00000	18	,697(**)	,00132
IL17/IL23R	PHA	64	,652(**)	,00000	41	,657(**)	,00000	23	,596(**)	,00267
	LpA	48	,703(**)	,00000	30	,812(**)	,00000	18	,506(*)	,03196
	Ppg	46	,826(**)	,00000	27	,839(**)	,00000	19	,808(**)	,00003
IL17/IL21	PHA	26	,626(**)	,00062	18	,704(**)	,00110	8	,119	,77889
	LpA	5	,300	,62384	4	–	–	1	–	–
	Ppg	5	,900(*)	,03739	4	–	–	1	–	–

Gene (fd)	Stimuli	Gesamt			CBMC nicht atopischer Mütter			CBMC atopischer Mütter		
		n	r	p	n	r	p	n	r	p
RoRC3/ IL23R	PHA	67	,590(**)	,00000	40	,459(**)	,00291	27	,821(**)	,00000
	LpA	48	,745(**)	,00000	30	,806(**)	,00000	18	,632(**)	,00485
	Ppg	46	,635(**)	,00000	26	,663(**)	,00022	20	,545(*)	,01285
RoRC3/ RoRC4	PHA	73	,655(**)	,00000	45	,638(**)	,00000	28	,726(**)	,00001
	LpA	56	,717(**)	,00000	37	,746(**)	,00000	19	,592(**)	,00764
	Ppg	53	,644(**)	,00008	34	,661(**)	,00002	19	,642(**)	,00307
RoRC4/ IL23R	PHA	66	,737(**)	,00000	39	,737(**)	,00000	27	,766(**)	,00000
	LpA	47	,732(**)	,00000	29	,845(**)	,00000	18	,470(*)	,04904
	Ppg	46	,717(**)	,00000	27	,792(**)	,00000	19	,562(*)	,01229

Tabelle 26: Spearman-Korrelation von IL-17 mit anderen Th17-assoziierten Genen ($p \leq 0.05$ fett gedruckt); r = Korrelationskoeffizient; ** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig); * Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

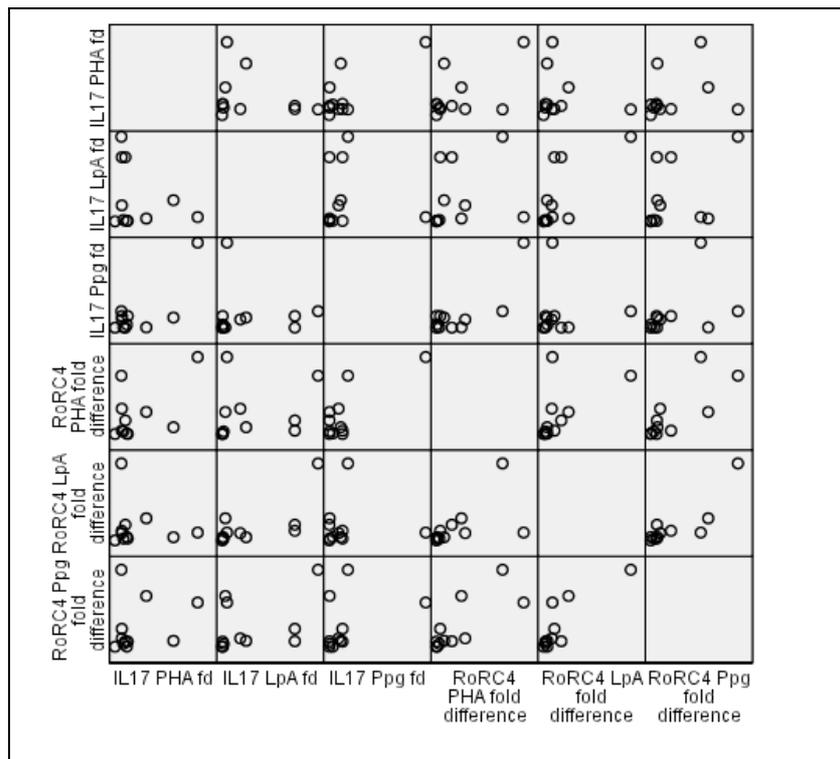


Abb. 37: Matrix-Streudiagramm der Spearman Korrelationen: RoRC4 und IL-17 mit den Stimuli PHA, LpA, Ppg (CBMC atopischer Mütter); Darstellung der fold-difference-Werte

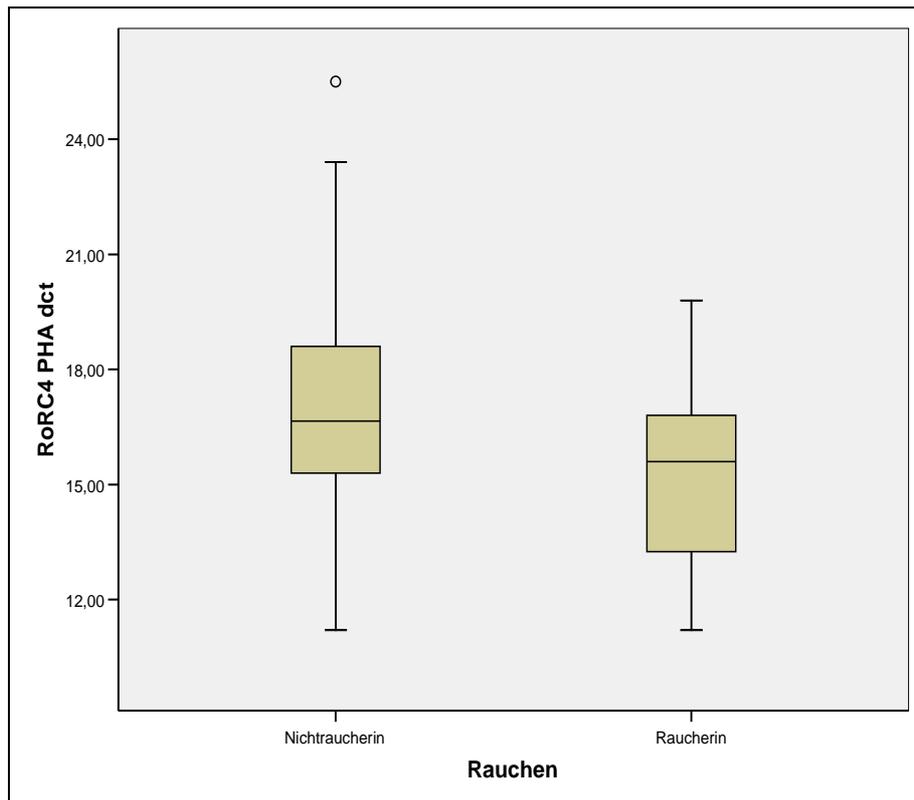


Abb. 38: Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors RoRC4 nach Stimulation mit PHA ergab sich im Nabelschnurblut von Kindern von Raucherinnen ($p = 0.055$, Wilcoxon-Test); Angabe des delta ct: hoher Wert bedeutet niedrige Expression in der rt RT-PCR.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Fragestellung, ob Th17 Zellen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Immunmaturation (im Nabelschnurblut) exprimiert sind und ob diese Expression durch mütterliche Atopie beeinflusst wird. Die Ergebnisse werden vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage diskutiert .

4.1. Überblick der Hauptergebnisse

1.

Im Rahmen der PAULINA-Studie konnten die an der Th17-Differenzierung relevanten Gene bereits im Nabelschnurblut detektiert werden: sowohl die Transkriptionsfaktoren RoRC3 und RoRC4, als auch der Rezeptor IL-23R und die für Th17 Zellen charakteristischen Zytokine IL-17 und IL-21 waren bereits im Nabelschnurblut auf mRNA Ebene exprimiert. Diese waren bereits unstimuliert nachweisbar und nach Stimulation des angeborenen Immunsystems erhöht.

2.

Im Nabelschnurblut atopischer Mütter wurde eine signifikant niedrigere Genexpression von unstimuliertem IL-17 nachgewiesen. Nicht signifikant unterschiedlich, aber als richtungsweisend mit niedrigerer Expression in der Gruppe mit maternaler Atopie betrachtet werden können:

IL17 (dct-Wert) nach mikrobieller Stimulation mit LpA und RoRC4 (dct-Wert) nach mikrobieller Stimulation mit Ppg.

Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt mit einem statistischen Modell gerechnet, um die zensierten Werte zu berücksichtigen. Nach Anwendung dieses Modells blieb der Trend zur niedrigeren Expression bei Vorliegen mütterlicher Atopie bei IL-17 LpA, IL-17 M dct und RoRC4 Ppg (alle dct-Werte) erhalten.

Die Ergebnisse wurden für mögliche Confounder adjustiert, die bekannterweise einen Einfluss auf das Atopierisiko des Kindes ausüben. Dadurch wird sichergestellt, dass die Unterschiede in der Genexpression tatsächlich auf die mütterliche Atopie zurückzuführen sind und nicht etwa auf väterliche Atopie, mütterliches Rauchen, Schulbildung und/oder Anzahl vorausgegangener Schwangerschaften.

3.

Es zeigte sich sowohl im CMBC atopischer als auch nicht atopischer Mütter eine durchgehend hochsignifikante Korrelation zwischen den einzelnen an der Th17-Differenzierung beteiligten Genen.

4.

Bei der Untersuchung des Einflusses von mütterlichem Rauchen auf das kindliche Immunsystem zeigte sich eine Beteiligung der Th17-Zellen. Es ergab sich eine Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors RoRC4 nach Stimulation mit PHA im kindlichen Nabelschnurblut von Raucherinnen.

5.

In unserer Studie konnten signifikante epidemiologische Unterschiede zwischen den atopischen und den nicht-atopischen Müttern nachgewiesen werden. Atopische Mütter zeigen erwartungsgemäß ein erhöhtes Serum-Gesamt-IgE. Das spezifische IgE unterscheidet sich signifikant bei den atopischen Müttern bei der Testung auf die 2 häufigsten Arten von Hausstaubmilben: *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Dermatophagoides farinae*. Bei den Atopikerinnen signifikant erhöhtes spezifisches IgE fand sich außerdem bei Haselnusspollen.

Die Neugeborenen der atopischen Mütter waren zudem – überraschenderweise – deutlich schwerer und größer. Auffallend war zudem, dass die Partner der atopischen Mütter deutlich häufiger unter atopischer Dermatitis litten als die Partner nicht-atopischer Mütter.

4.2. Geringe Expression von Th17-Zellen im Nabelschnurblut

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass im Nabelschnurblut Neugeborener bereits alle an der Differenzierung von Th17-Zellen wichtigen Gene exprimiert sind. Gemäß unserer Hypothese waren die Th17-Zellen im Nabelschnurblut niedrig exprimiert.

Der Nachweis von Th17-Zellen im Nabelschnurblut lässt darauf schließen, dass diese Zellen, die eine Funktion in der Pathophysiologie von Allergien und Autoimmunerkrankungen sowie der Abwehr extrazellulärer Erreger haben, auch im Immunsystem des Neugeborenen bereits eine Rolle spielen. Aufgrund der niedrigen

Expression zum Zeitpunkt der Geburt jedoch ist es möglich, dass die Th17-Zellen erst später in der Immunentwicklung wichtige Aufgaben übernehmen werden.

4.3. Proliferation von Th17-Zellen im Nabelschnurblut nach mitogener/mikrobieller Stimulation

Die Gene der Transkriptionsfaktoren RoRC3 und RoRC4 wurden bei allen 3 Stimulationsbedingungen (PHA, LpA und Ppg) im Vergleich zum unstimulierten Media signifikant hochreguliert. Diesbezüglich waren keine Unterschiede zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren festzustellen. Insgesamt lag jedoch die Expression bei RoRC4 höher als bei RoRC3. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass der Primer von RoRC4 die Isoformen a und b des Transkriptionsfaktors einschließt, während die Primer von RoRC3 nur spezifisch die Isoform b detektieren (vgl. Kapitel 2.3.3.2 im Methodenteil) und es sich von daher um einen quantitativen Unterschied handelt.

Auch die Genexpression von IL-23R nahm unter allen 3 Stimulationsbedingungen signifikant zu.

Bislang konnte der Rezeptor von IL-23 an der ruhenden T-Zelle nicht nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse bestätigen Untersuchungen von Vanden Eijnden et al. wonach IL-23 wichtig ist für die pathogen-induzierte Aktivierung der Th17-Zelle [94].

Die einzige Ausnahme zu den oben beschriebenen Ergebnissen zeigte sich bei IL-17. Bei der Stimulation des angeborenen Immunsystems zeigte sich zwar wie auch bei den anderen Genen ein signifikanter Anstieg der Genexpression auf mRNA-Ebene bei LpA und Ppg. Im Gegensatz dazu war jedoch eine Reduktion der Genexpression nach mitogener Stimulation durch PHA ersichtlich. Diese Reduktion war deutlich, aber nicht signifikant. Die fold-difference-Werte, die ja den vielfachen Unterschied der Stimulierten zu den unstimulierten Proben darstellen, bestätigten diese Beobachtung: bei IL-17 PHA findet sich analog zu den ct-Werten eine

Reduktion³ (fd = 0,71), bei LpA (fd = 9,85) und ausgeprägter noch bei Ppg ein Anstieg der Genexpression (fd = 11,72).

Diese Ergebnisse für die mRNA-Ebene lassen sich auf der Proteinebene bestätigen: es konnte in einer Parallelstudie mit der PAULINA-Population gezeigt werden, dass die IL-17-Sekretion von Th17-Zellen signifikant nach Stimulation mit LpA und Ppg ansteigt [95].

Th-Zellen des Nabelschnurbluts reagieren im Allgemeinen im Gegensatz zu PBMC von Erwachsenen weniger stark auf Stimulation [96]. Die Analyse humaner neonataler CBMC ergab nachweisbare Level des charakteristischen Effektorzytokins der Th17-Zellen IL-17, der Transkriptionsfaktoren RoRC3 und RoRC4 sowie den für die Differenzierung relevanten Genen IL-23R und IL-21.

In früheren Studien wurde angenommen, dass die Immunreaktion von Neugeborenen noch unzulänglich ist im Vergleich zur Immunantwort von Erwachsenen. Diese These stützte sich auf die Beobachtung, dass vor allem die Th1-Achse der Immunantwort bei Neugeborenen prinzipiell schwächer ausgeprägt ist [97]. Wenngleich die Maturation des Immunsystems mit dem Lebensalter zunimmt, so wurde in einigen Publikationen gezeigt, dass die Immunantwort der Neonatalperiode reifer ist als zunächst angenommen. Eine Proliferation von T-Zellen nach PHA-Stimulation kann schon im Gestationsalter von 17 Wochen nachgewiesen werden. Antigen-spezifische Immunantworten wurden schon früh im Nabelschnurblut belegt, so zum Beispiel für die Hausstaubmilbe [98] und Kuhmilch [99], für parasitäre Antigene [100] und Autoantigene [101]. Dies belegt, dass schon im frühen Immunsystem eine differenzierte, antigenspezifische Immunreaktion der T-Zellen möglich ist.

Unsere Ergebnisse können als eine vorhandene und intakte Th17-vermittelte Immunantwort des Neugeborenen auf mikrobielle Stimuli gesehen werden, wenngleich diese auch gering ausgeprägt ist. Die Th17-Zellen werden entsprechend ihrer proinflammatorischen Rolle schon im Neugeborenenalter aktiviert und sind funktionsfähig durch Hochregulierung ihrer Transkriptionsfaktoren und des IL-23R.

³ Ein fold-difference-Wert < 1 entspricht einer Reduktion der Genexpression auf mRNA-Ebene, ein Wert > 1 dementsprechend einem Anstieg der Genexpression

Interessant ist, dass die mRNA des Effektorzytokins IL-17 nur auf die mikrobielle Stimulation reagiert, hingegen durch das sonst potente PHA sogar noch herunterreguliert wird.

Eine Reduktion (oder zumindest eine nicht vorhandene Stimulation) von IL-17 über PHA, welches wie oben beschrieben Teile des adaptiven Immunsystems aktiviert, könnte für eine noch ungenügende Reife der Th17-Achse im Neugeborenenalter sprechen. Dies könnte bedeuten, dass Th17-Zellen verzögert reifen und besonders die Funktion des adaptiven Immunsystems sich erst später entwickelt.

Betrachtung der unterschiedlichen zellulären Signalübertragungswege

Anknüpfend an die Beobachtung, dass es Unterschiede in der Genexpression zwischen PHA einerseits und LpA/Ppg andererseits gibt, lohnt sich eine kurze Betrachtung der verschiedenen Signalübertragungswege.

PHA gehört zur Familie der Lektine und ist ein Mitogen, welches nur T-Zellen (und keine B-Zellen) unspezifisch zur Teilung aktiviert. Es kommt hierbei nicht zu einer spezifischen Rezeptorbindung, sondern durch Bindung von PHA an die Zellmembran-Glykoproteine zur Agglutination und Proliferation von T-Zellen.

Bei LpA handelt es sich um die Lipidkomponente des Lipopolysaccharids (LPS), das als Endotoxin von gramnegativen Bakterien wirkt. Die Wirkung tritt über den TLR4 ein. Ppg ist auch als Mureinsäure bekannt, ein Polymer aus Zuckermolekülen und Aminosäuren, das in der Zellwand vieler Bakterien vorkommt. Es handelt sich um einen TLR2- und NOD-Liganden (*nucleotide-binding oligomerization domain*).

Sowohl durch die mitogene als auch die mikrobielle Stimulation wird künstlich eine Aktivierung des Immunsystems erzeugt, die experimentell der natürlichen Stimulation des Neugeborenen-Immunsystems durch Umwelteinflüsse annähernd entspricht.

In der PAULINA-Studie bestehen aus Sicht der Th17-Genexpression zwischen der TLR2- und NOD- sowie TLR4-Aktivierung keine signifikanten Unterschiede. Beide Signalwege nehmen intrazellulär u.a. über MyD88 und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB einen teilweise sehr ähnlichen Verlauf. Deutliche Unterschiede gibt es jedoch zwischen der TLR-Aktivierung und dem Weg über das Mitogen PHA.

Besonders auffallend tritt dies bei IL-17, RoRC3 und RoRC4 zutage. Insgesamt ist dieser Effekt in der atopischen Gruppe deutlicher zu erkennen.

Einfluss von TLR4-Stimulation

IL-17 ist nach TLR4-Stimulation signifikant höher exprimiert als nach mitogener Aktivierung mit deutlicherem Effekt im CBMC atopischer Mütter.

Der Transkriptionsfaktor RoRC3 ist nach TLR4-Aktivierung signifikant niedriger exprimiert als nach PHA-Stimulation, auch hier ist der Effekt im Nabelschnurblut atopischer Mütter deutlicher. RoRC4 und IL-23R sind ebenfalls nach TLR4-Stimulation niedriger exprimiert, wenn auch nicht signifikant.

Einfluss von TLR2/NOD-Stimulation

Im Vergleich von TLR2/NOD-Aktivierung und mitogener Aktivierung zeigten sich bei Betrachtung der dct-Werte ähnliche Ergebnisse wie oben. IL-17 war nach Ppg-Stimulation wieder signifikant höher exprimiert als nach PHA-Stimulation. Umgekehrt zeigte sich bei RoRC3 eine signifikant erniedrigte Expression nach TLR2/NOD-Aktivierung. Bei RoRC4 war ein signifikanter Unterschied - auch im Sinne einer niedrigeren Expression nach TLR2/NOD-Stimulation - nur in der atopischen Gruppe feststellbar.

Diese Ergebnisse zeigen eine höhere Expression von IL-17 durch mikrobielle Stimulation. Bislang war bekannt, dass sich die IL-17-Expression nach TLR2-Stimulation erhöht. Naive und Effektor-T-Zellen könnten durch TLR2-Aktivierung von einem regulatorischen Typ (Tregs) hin zu einem Th17-Phänotypen gelenkt werden, was auch in einer erhöhten Expression von RoRC und einer Reduktion der Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 führt [102]. Unserer Daten weisen zusätzlich darauf hin, dass die IL-17-Genexpression auf einen spezifischen, rezeptorvermittelten Reiz deutlicher ansteigt wird als auf einen unspezifischen Reiz hin.

Neugeborene sind anfälliger für mikrobielle Infektionen als Erwachsene [103]. IL-17 spielt möglicherweise in dieser Abwehrfunktion schon im frühesten Alter eine Rolle. Wie stark die IL-17-Produktion tatsächlich spezifisch für den Th17-Zelltyp ist oder eventuell andere Zellen an der Zytokinproduktion beteiligt sind, lässt sich jedoch aus unseren Daten nicht mit Sicherheit sagen. Unter dem Einfluss bestimmter Zytokinmilieus wurde die Entwicklung des gemischten Th1/Th17-Typ beschrieben,

der sowohl IL-17 als auch IFN γ produziert [104]. Für diese Plastizität der Th-Zellen spricht, dass bei unseren Experimenten das Zytokin IL-17 nach mikrobieller Stimulation zwar erhöht war, RoRC3, RoRC4 und IL-23R jedoch im Gegensatz dazu nach mitogener, also unspezifischer Aktivierung, erhöht waren.

Dass dieser Effekt bei den CBMC atopischer Mütter etwas deutlicher zu erkennen war, könnte auf eine insgesamt erhöhte Reagibilität der mononukleären Zellen bei Kindern mit erhöhtem Atopierisiko hindeuten. Dieser Effekt wurde schon dahin gehend beschrieben, dass eine erhöhte Proliferation von CBMC auf Allergenreiz hin mit einem erhöhten Risiko, eine spätere Allergie zu entwickeln, behaftet ist. Die erhöhte Proliferationsantwort im Nabelschnurblut ist so robust, dass sie schon als Screeningmarker für ein hohes Allergierisiko vorgeschlagen wurde [105].

4.4. Bedeutung der Atopie

Die Prävalenz atopischer Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten erheblich zugenommen. Dass diese Entwicklung vor allem die westliche Welt mit hohem hygienischen und medizinischem Standard betrifft, kann in Anlehnung an die schon 1989 von Strachan et al. formulierte Hygienehypothese teilweise erläutert werden [106]. Die Entwicklung hin zur Atopie ist jedoch multifaktoriell bedingt.

Die mütterliche Atopie stellt den größten Risikofaktor für die Entwicklung von kindlichem Asthma dar. Die Th17-Zellen spielen möglicherweise eine Rolle dabei, das kindliche Immunsystem in eine proinflammatorische Richtung zu dirigieren.

Unsere Daten zeigten eine Tendenz zur Erhöhung von proinflammatorischem Th17 im Nabelschnurblut von Kindern nicht-atopischer Mütter. Die Daten wurden adjustiert für die Confounder „Mütterliches Rauchen“, „Ausbildung der Mutter“, „Anzahl vorangegangener Schwangerschaften“ und „Väterliche Atopie“. Diese Faktoren können das kindliche Immunsystem beeinflussen, wie im Folgenden näher beschrieben wird.

4.4.1. Expression der Th17-relevanten Gene unter Berücksichtigung mütterlicher Atopie

Das Effektorzytokin der Th17-Zellen ist unstimuliert im Nabelschnurblut nicht-atopischer Mütter signifikant erhöht. Nach mikrobieller Stimulation mit LpA bleibt es deutlich, wenn auch nicht mehr signifikant im CBMC nicht-atopischer Mütter erhöht.

Der Transkriptionsfaktor RoRC4 der Th17 Zellen ist im CBMC nicht-atopischer Mütter deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Auch nach mikrobieller Stimulation mit Ppg ist er in der nicht-atopischen Gruppe deutlich erhöht (RoRC4 Ppg dct: $p= 0.070$). Auch bei LpA ist RoRC4 im Nabelschnurblut nicht-atopischer Mütter erhöht.

Bei IL-23R findet sich ein ähnliches Ergebnis: in der Gruppe der nicht-atopischen Mütter sind Media, LpA und Ppg im Vergleich mit der Gruppe atopischer Mütter erhöht, jedoch nicht signifikant.

Insgesamt scheinen die Th17- Gene vor und nach mikrobieller Stimulation bei den Neugeborenen nicht-atopischer Mütter erhöht zu sein, zum Teil signifikant erhöht. Diese Tendenz der höheren Th17-Genexpression bei den Neugeborenen nicht-atopischer Mütter bleibt auch nach Zensierung der Daten für den Transkriptionsfaktor RoRC4 (Media und nach Ppg-Stimulation) erhalten.

Interessant ist, dass im Umkehrschluss die Expression von Th17-Genen in CBMC der atopischen Mütter erniedrigt ist.

Die fold-difference-Werte, die Veränderung der stimulierten Proben in Relation zur unstimulierten „baseline“ zeigen, ergaben keine signifikanten Werte.

Die Spearman-Korrelation der Th17-relevanten Gene untereinander war positiv und signifikant. Dieser Effekt bedeutet, dass die untersuchten Gene der Effektorzytokine, Transkriptionsfaktoren und mit der Differenzierung assoziierten Zytokine in engem Zusammenhang stehen.

Bei den CBMC nicht-atopischer Mütter trat diese positive Korrelation noch deutlicher zu Tage.

4.4.2. Berücksichtigung von elterlichen Einflussfaktoren

Die Ergebnisse wurden für potentielle Confounder adjustiert. Zu diesen Einflussgrößen zählten die väterliche Atopie, das mütterliche Rauchen, die Schulbildung der Mutter und die Anzahl vorangegangener Schwangerschaften. Nach der Adjustierung änderten sich die Daten teilweise deutlich. Das heißt, der teilweise

signifikante oder tendenzielle Unterschied zwischen den CBMC atopischer und nicht-atopischer Mütter wurde weniger offensichtlich und es kam zu einem Angleichen der Ergebnisse (vgl. Tabelle 21 in Kapitel 3.2.7). Dies spricht dafür, dass es sich bei den vermuteten Confoundern um tatsächliche Störgrößen handelt, die bei der Interpretation unserer Daten nicht vernachlässigt werden dürfen. Die Unterschiede aufgrund des atopischen Status erscheinen weniger deutlich, wenn man den Einfluss der folgenden Parameter statistisch adjustiert. Biologisch bedeutet dies, dass schon zu dem frühest möglichen Untersuchungszeitpunkt des kindlichen Immunsystems, nämlich im Nabelschnurblut, diese Parameter eine Rolle spielen und nicht erst in der weiteren Entwicklung des Immunsystems.

Väterliche Atopie

Atopische Erkrankungen sind in ihrer Genese multifaktoriell und so wird die kindliche Immunentwicklung vermutlich auch genetisch beeinflusst. Um den Einfluss väterlicher Atopie zu untersuchen, wurden die Daten hierfür adjustiert.

Väterliche Atopie wurde als Arztdiagnose Asthma, atopisches Ekzem oder allergische Rhinitis definiert und wurde fremdanamnestisch mittels Fragebogen erhoben.

Insgesamt lagen bei $n = 38$ Vätern eine Atopie vor, bei $n = 80$ ergab sich kein Hinweis auf eine atopische Erkrankung. Einen deutlichen Unterschied zwischen Vätern mit positivem bzw. negativem Atopiestatus ergab sich nur bei RoRC3 Ppg fd ($p = 0.056$).

Mütterliches Rauchen

Mütterliches Rauchen in der Schwangerschaft stellt einen erheblichen Risikofaktor für die Entwicklung von kindlichem atopischem Asthma dar, wie auch aktuell wieder in einer großen kanadischen Kohortenstudie bestätigt wurde [107]. Daher wurde dieser Aspekt bei der Auswertung der PAULINA-Daten näher untersucht.

Bei der Erfassung mütterlichen Rauchens könnte sich ein testpsychologisches Problem ergeben, denn es lässt sich spekulieren, ob die Angaben der werdenden Mutter zum Rauchen in der Schwangerschaft verlässlich sind. In unserer Studie rauchten insgesamt 3,4% der nicht-atopischen und 5,6% der atopischen Mütter. Zur Auswahl im anonymisierten Fragebogen standen die Antworten „Nichtraucherin“,

„Raucherin, aber aufgehört als sich die Schwangerschaft bestätigte“, „Raucherin auch in der Schwangerschaft“. Der Anteil von Raucherinnen war bei unserer Studie weitaus niedriger als der bundesweite Durchschnitt: deutschlandweit rauchten im Jahr 2005 nämlich sogar 13% der Schwangeren, auch nachdem sie von ihrer Schwangerschaft erfuhren [108]. Diese Diskrepanz ist auf den durchschnittlich höheren sozioökonomischen Status der Mütter zurückzuführen, die in einer Uniklinik entbinden.

Eine deutliche Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors RoRC4 nach Stimulation mit PHA ergab sich im Nabelschnurblut von Raucherinnen ($p = 0.055$) und könnte für die pro-inflammatorische Rolle der Th17-Zellen sprechen. Allerdings beschränkte sich der Effekt auf RoRC4 und war bei der Untersuchung der anderen Genen nicht nachweisbar.

Mütterliche Schulbildung

In der PAULINA –Studie zeigte sich nur beim Transkriptionsfaktoren RoRC3 dct Media eine signifikant höhere Expression in der Gruppe mit niedrigerem Bildungsniveau ($p = 0.003$). Ein klarer Zusammenhang zwischen Schulbildung der Mutter und proinflammatorischem und evt. atopischem Profil kann durch unsere Ergebnisse nicht festgestellt werden.

Die Studienlage zum Einfluss von Bildung und sozioökonomischem Status des Elternhauses auf Atopie ist breit gefächert:

In einer kanadischen Studie mit asthmaerkrankten Kindern ($n=855$) wurde ein statistischer Zusammenhang zwischen reduzierter Allergenbelastung im häuslichen Umfeld und dem höheren sozioökonomischen Status bzw. Bildungsgrad der Mutter erhoben [109]. Dieser Einfluss kann von verschiedener Bedeutung sein: bei schon manifestem Asthma schützt eine allergenreduzierte Umgebung vor Exazerbationen, im Säuglingsalter schützt Kontakt zu mikrobiellen Allergenen jedoch vor einer Entwicklung einer atopischen Erkrankung.

Eine große israelische Studie mit 17-jährigen Militärrekruten ($n= 159.243$, wovon 8.5% der männlichen und 6.7% der weiblichen Proband diagnostiziertes Asthma hatten) kam zu dem Ergebnis, dass ein hoher sozioökonomischer Status mit einem höheren Risiko für Asthma verbunden ist [110].

Zu einem anderen Ergebnis kommt eine europäische Multizenterstudie mit $n= 10.971$ Probanden zwischen 20 und 44 Jahren: hier trat Asthma signifikant häufiger bei

Individuen auf, die in einer Gegend mit niedrigerem Sozialstatus wohnten, unabhängig vom eigenen Bildungsgrad und sozialer Schicht [111]. Dieses Ergebnis ist wiederum kongruent mit Erkenntnissen aus der ISAAC-Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood). In Bezug auf Asthma spielt laut dem Bericht von 2011 der sozioökonomische Status der Familie eine bedeutsame Rolle. Patienten in ärmeren Ländern sind häufiger von schweren Symptomen betroffen, u.a. aufgrund der schlechteren medizinischen Versorgung und weil durch die schlechteren Lebensbedingungen eine große gesundheitliche Belastung durch Rauch und Abgase herrscht [112].

Anzahl Schwangerschaften

In unserer Studie konnte nur für den Transkriptionsfaktor RoRC3 (nach PHA-Stimulation) ein Unterschied zwischen Frauen ohne vorausgegangene Schwangerschaft und Müttern festgestellt werden ($p = 0.051$). Ein größerer Einfluss der Anzahl der mütterlichen Schwangerschaften auf die Differenzierung von Th17-Zellen ist aus unseren Daten in der PAULINA-Population nicht ersichtlich.

Betrachtet man jedoch die Umweltbedingungen, die ein Kind vor der Entwicklung von Atopie schützen, so ist neben dem Stillen und der Anwesenheit von Haustieren auch das Vorhandensein von Geschwistern ein wichtiger protektiver Faktor [113].

4.4.3. Epidemiologische Faktoren unter Berücksichtigung mütterlicher Atopie

Erwartungsgemäß war das Gesamt-IgE im Serum der Atopikerinnen signifikant erhöht ($p < 0.0001$). Die Neugeborenen der atopischen Mütter waren zudem deutlich schwerer ($p = 0.019$) und größer ($p = 0.031$) als in der nicht-atopischen Vergleichsgruppe. Das Körpergewicht bei Geburt so wie auch der Ponderal Index (Geburtsgewicht in Gramm $\times 100 \div$ Körperlänge in cm^3) sind ein Prädiktor für spätere Adipositas. Übergewicht wiederum ist möglicherweise mit der Entwicklung von Asthma assoziiert [114]. In einer finnischen Geburtskohortenstudie mit $n=4719$ Teilnehmern wurde – unabhängig von Übergewicht in Adoleszenz/Erwachsenenalter – eine Assoziation von hohem Geburtsgewicht mit atopischem Status im Alter von 31 Jahren festgestellt [115]. Auch bei unseren Studienteilnehmern wird im Follow-up von Interesse sein, herauszufinden, ob sich diese Beobachtungen mit unseren Daten

bestätigen lassen. Interessanterweise litten auch die Partner der atopischen Mütter sehr signifikant häufiger unter atopischen Ekzem ($p = 0.047$). Ungeklärt ist natürlich, wie es zu diesem soziologischen Phänomen bei der Partnerwahl kommt. Für das gemeinsame Kind stellt die doppelte elterliche Belastung jedoch einen Risikofaktor für die Atopieentwicklung dar.

4.5. Bewertung der PAULINA-Studie

Durch Erhebung zahlreicher epidemiologischer Parameter im Vorfeld der Experimente wurden 2 Ziele erreicht: da die Zellen des Nabelschnurbluts auf eine Vielzahl von möglichen Umweltbedingungen reagieren wurde durch strenge Ausschlusskriterien der Probanden zum einen das Risiko von verfälschten Ergebnissen minimiert. Zum anderen ermöglichen es die erhobenen Daten aus den Fragebögen, die Studienergebnisse auf zahlreiche Einflussfaktoren zu überprüfen und statistischer Verzerrung vorzubeugen.

Im Rahmen der PAULINA-Studie (**P**ediatric **A**lliance for **U**nselected **L**ongitudinal **I**nvestigation of **N**eonates for **A**llergies) wurden in der Universitätsfrauenklinik München insgesamt $n=161$ Nabelschnurblutproben von Neugeborenen aus München und Umgebung gewonnen. Die Mütter wurden hinsichtlich ihres atopischen Status in 2 Gruppen aufgeteilt und beantworteten Fragebögen. Mithilfe dieser Fragebögen und der Krankenakten war es möglich, potenzielle Störfaktoren bezüglich des Immunstatus in die Datenauswertung einzubeziehen. Mittels der Fragebögen wurde eine große Zahl an möglichen Einflussfaktoren erhoben (wie väterliche Atopie, Rauchen, ethnische Zugehörigkeit, Geschwister, Bildung der Eltern, Merkmale der Geburt, vorangegangene Kaiserschnitte oder Fehlgeburten). Um eine hohe Qualität der Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden die Proben frisch innerhalb von 24h in unserem Labor weiterverarbeitet.

Die Studie zeichnet sich durch konsequente Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien aus. Letztere umfassten schwere Erkrankung der Mutter (insbesondere Autoimmunerkrankungen), Infektionen/Antibiotikatherapie während des letzten Trimenon der Schwangerschaft oder unter der Geburt, erhöhtes CRP oder Fieber unter der Geburt und Komplikationen während der Geburt. Weitere

Ausschlusskriterien waren eine Antibiotikatherapie oder Intensivstationspflichtigkeit des Kindes nach Geburt.

Dadurch wurden aus den anfänglich rekrutierten n=161 Probandinnen n=95 eingeschlossen. Davon waren n=36 atopisch und n=59 nicht-atopisch. Der Anteil der atopischen Mütter lag mit 37,9% etwas über der Durchschnittsprävalenz atopischer Erkrankungen in der Bevölkerung (ca. 30% laut dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verkehr). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Anzahl atopischer Patientinnen in einer Großstadt wie München generell über dem bundesweiten Durchschnitt liegt.

4.6. Schlussfolgerungen

Den Th1-Zellen wird eine schon seit langem bekannte protektive Rolle in der Atopie zugeschrieben. In der Literatur existieren Hinweise darauf, dass eine fehlende Weiterentwicklung des kindlichen Immunsystems von einer Th2-dominanten zu einer Th1-dominanten Immunantwort die Entstehung allergischer Erkrankungen begünstigt [116]. Im Bereich der erst relativ neu entdeckten Th17-Zellen ist vieles noch unerforscht. Unsere Daten zeigen eine Tendenz zu höherer Expression von Th17-Zellen im Nabelschnurblut nicht-atopischer Mütter. Wenn man von einer proallergischen Th2- und einer antiallergischen Th1/Th17-Achse ausgeht, ist dies möglicherweise Ausdruck eines anti-Th2-Immunprofils.

Es liegen bis heute keine vergleichbaren Studien vor, bei denen Nabelschnurblut in Zusammenhang mit mütterlicher Atopie auf Th17-Zellen untersucht wurde.

Ein möglicher Zusammenhang von Asthma und Atopie mit IL-17 wurde jedoch beim Erwachsenen mehrfach untersucht. Die Ergebnisse sind fallen entweder nicht eindeutig aus oder sind in ihrer Aussagekraft wegen der geringen Fallzahlen in den Studien kritisch zu betrachten.

In einer brasilianischen Studie untersuchten Fernandes et al. die Zytokinausschüttung atopischer und nicht-atopischer Probanden auf Hausstaubmilben- und Toxoplasma gondii-Antigenen. Atopie wurde definiert als positiver Hautpricktest und erhöhtem ELISA-IgE-Nachweis auf Hausstaubmilbenantigenen. Bei der atopischen Gruppe (n=129) wurde im Gegensatz zur nicht-atopischen Gruppe (n=146) ein erhöhtes IL-5 als Th2-Zytokin entdeckt. Ein

Unterschiede in der IL-17-Ausschüttung als Marker erhöhter Aktivität der Th17-Zellen nach Stimulation ergaben sich hier nicht [117].

Auch Hashimoto et al. untersuchte in seiner Studie PBMC von atopischen Asthmatikern (n=16), nicht-atopischen Asthmatikern (n=13) und gesunden Kontrollsubjekten (n=6) auf IL-17-Produktion. Atopie wurde definiert als mindestens ein positiver Hautpricktest und positivem RAST auf Hausstaubmilbenallergen. Nicht-atopische Probanden wiesen negative Prick- und RAST-Tests sowie normale IgE-Serumlevel auf. Die PBMC wurden zum Teil mit *Dermatophagoides farinae* (Df)-Extrakt stimuliert, woraufhin bei den Stimulierten die IL-17-Produktion der atopischen Asthmatiker signifikant induziert wurde [118].

Die Rolle von Th17-Zellen beim Asthma wurde von Bullens et al. in einer kleinen belgischen Studie dargelegt. Hier wurden mittels rt RT-PCR die mRNA-Level von IL-17 im Sputum asthmatischer Patienten gemessen. Es wurden signifikant erhöhte IL-17-Level bei den Asthmatikern gemessen (n=33) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (n=11) [119].

Methodisch muss hier unterschieden werden zwischen dem Nachweis der Th17-Zellen am Ort einer lokalen neutrophilen Entzündung in den Bronchien und der Untersuchung von IL-17 im Nabelschnurblut eines „gemischten“ atopischen Phänotyps (also bei Vorliegen von Asthma und/oder allergischer Rhinitis und/oder Neurodermitis) ohne akute Entzündungsreaktion.

Eine erhöhte IL-17 Produktion wurde also bislang bei Asthmatikern experimentell in Sputum, Pneumozyten bronchoalveolärer Lavage (BAL) und eben auch im peripheren Blut nachgewiesen.

Leider liegen bislang keine Daten vor, die einen direkten Vergleich zwischen den Zytokinleveln in Lunge und Peripherie herstellen. Es wurde jedoch belegt, dass ganz allgemein während einer allergischen Reaktion nicht unbedingt erhöhte Level von aktivierten Lymphozyten im peripheren Blut nachzuweisen sind, wohingegen am Ort der Reaktion die aktivierten Lymphozyten erhöht sind [120].

In einer Fall-Kontroll-Studie zur Untersuchung von elterlichem und kindlichem Asthma bei 215 Familien (n= 944 insgesamt) differierten die Zytokinlevel von IL-17 im peripheren Blut nicht zwischen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern. IL-17 besaß keinen signifikanten prädiktiven Wert für extrinsisches Asthma, allergische Rhinitis

oder atopisches Ekzem , weder in der kindlichen noch in der erwachsenen Gruppe [121].

Die intrauterine Immunregulation ist komplex aufgebaut. Eine Interaktion des mütterlichen mit dem kindlichen Immunsystems während der Schwangerschaft ist wahrscheinlich und wirkt sich vermutlich auf die Immunreaktionen des Neugeborenen aus. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass neben genetischen Einflüssen [122] [123] auch das intrauterine Milieu während der Fetalperiode (z.B. durch Zytokine im Fruchtwasser [124]) zur Entwicklung von Atopien beitragen kann. Für Unterschiede zwischen CBMC von atopischen Müttern im Vergleich zu CBMC nicht-atopischer Mütter könnte demnach ein anderes Zytokinmilieu im Uterus sprechen.

Verzögerte Maturation

Th17-Zellen entwickeln sich über andere Zytokinsignale als Th1-, Th2- und Treg-Zellen. Bekannt ist die zu Th2-Reaktionen verschobene Immunität des Neugeborenen. Nur schwach nachweisbare Th17-Zellen werden möglicherweise zugunsten von Th2-spezifischen Signalwegen gehemmt. Im frühen Immunsystem könnte sowohl ein quantitatives als auch funktionelles Defizit an Th17-Zellen vorliegen, das erst im Laufe der späteren Immunregulierung ausgeglichen und eine Balance mit Th1, Th2 und Treg hergestellt wird. Das Konzept der verzögerten Maturation wurde schon von Bogaert et al. im Mausversuch durch einen Vergleich von neonatalen und adulten Zellen der angeborenen Immunabwehr dargelegt [125].

In Einklang mit unseren Ergebnissen zeigte eine norwegische Studie einen signifikanten Einfluss des mütterlichen Atopiestatus auf die Proliferation von mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts. Es wurde anhand von stimulierten CBMC gezeigt, dass es bei Vorliegen mütterlicher Atopie zu einer verzögerten Proliferation von neonatalen T-Zellen kommt, die CCR4 exprimieren [126] . Dies betrifft zunächst Zellen von Th1-Profil (es wurde die mRNA-Expression von IL-4 und IFN γ gemessen), ist jedoch möglicherweise auch auf die Th17-Zellen übertragbar, wenn man die enge Verwandtschaft der Th1- und Th17-Zellen beachtet.

4.7. Ausblick

In 2 weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe wird derzeit die Rolle der Th-17-Zellen im frühen Immunsystem weiter untersucht und mit den bisherigen Daten der PAULINA-Studie verglichen. Es wird die „Hygienehypothese“ daraufhin untersucht, ob die vermehrte Exposition gegenüber mikrobiellen Stimuli vor einer Entwicklung atopischer Erkrankungen schützt. Während bei PAULINA die CBMC von Stadtkindern untersucht wurden, handelt es sich bei PAULCHEN um eine prospektive Nabelschnurblutstudie mit Kindern aus ländlicher Umgebung in Süddeutschland. Auch bei der PAULCHEN-Studie werden atopierelevante Gene und Zytokinkonzentrationen zum Zeitpunkt der Geburt bestimmt.

Von Interesse wäre auch eine Untersuchung des mütterlichen Blutes auf die Th17-assoziierten Gene.

In einer Studie mit Kindern im Schulalter zeigte sich bereits, dass die intrauterine Exposition von mikrobiellen Stimuli eine längerfristige Modulation der Immunantwort zur Folge haben kann. In dieser Studie von Ege et al. wurden PBMC von Kindern (n=322) untersucht, deren Mütter während der Schwangerschaft auf dem Bauernhof verstärkt diesen mikrobiellen Einflüssen ausgesetzt waren. Nach Exposition in der Schwangerschaft waren bei den Kindern die TLR2- und TLR4-Expression als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems hochreguliert und die atopische Sensibilisierung vermindert [127].

Allergische Erkrankungen treten familiär gehäuft auf. Die Entstehung der Atopie spielt sich also nicht nur auf zellulärer Ebene im Sinne einer immunologischen Reaktion auf Umweltbedingungen ab, sondern hängt von multiplen, auch genetischen Faktoren ab. Laut einer Metaanalyse aus dem Jahr 2008 liegt der genetische Einfluss bei kindlichem Asthma zwischen 49% und 78% [128]. Asthma wiederum ist eng mit Atopie assoziiert, also der generellen Veranlagung zu einer überschießenden IgE-dominierten Immunantwort. In Zusammenhang mit der Testung der Väter oder der Geschwisterkinder könnten entsprechende Hinweise auf die vererbliche Komponente der Atopie gewonnen werden.

Eine longitudinale Untersuchung der PAULINA-Probanden bis zu einem Alter von 3 bzw. 6 Jahren wird Aufschluss darüber geben, welche Kinder einen atopischen Phänotyp entwickeln und ob Th17-Zellen eine Rolle in der Entwicklung von atopischen Erkrankungen spielen.

Aktuell werden die Daten der PAULINA-Probanden im Alter von 36 Monaten ausgewertet. Im Follow-up-Fragebogen wird u.a. nach Arzt Diagnosen, Symptomen und Umweltbedingungen des Kindes in den letzten 3 Lebensjahren gefragt, die auf eine Entwicklung oder Manifestation einer atopischen Erkrankung hindeuten könnten. Die Analyse dieser Follow-up-Daten in Zusammenhang mit den rt RT-PCR-Daten aus dem Nabelschnurblut verspricht einen weiteren interessanten Einblick in die Entwicklung kindlicher Atopie zu geben.

5. Zusammenfassung

Da Asthma und atopische Erkrankungen zu den häufigsten chronischen Krankheiten in den industrialisierten Ländern zählen, müssen zur Verbesserung von Diagnostik, Therapie und Prävention die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen weiter erforscht werden. Die Th17-Zellen stellen eine relativ neu entdeckte Untergruppe der T-Helferzellen dar, die eine wichtige Rolle im Pathomechanismus von Autoimmunerkrankungen und allergischen Erkrankungen spielen.

Diese Dissertation beruht auf der Hypothese, dass Th17-Zellen eine wichtige Rolle in der Entstehung von atopischen Erkrankungen spielen, und dass ein Unterschied der Expression von Th17-assoziierten Genen im Nabelschnurblut von atopischen im Vergleich zu nicht-atopischen Mütter zu detektieren ist.

Im Rahmen der PAULINA-Studie (**P**ediatric **A**lliance for **U**nselected **L**ongitudinal **I**nvestigation of **N**eonates for **A**llergies) wurden Nabelschnurblutproben von Neugeborenen aus München und Umgebung untersucht. Es wurden in dieser prospektiven Geburtskohortenstudie von Januar 2005 bis Februar 2007 insgesamt 161 Probanden rekrutiert. In den Nabelschnurblutproben wurde mittels real-time RT-PCR die Expression von 5 Genen untersucht, welche für die Differenzierung der Th17-Zellen wichtig sind. Nach Anwendung der Ausschlusskriterien konnten n=36 Proben von Müttern mit Atopie und n=59 Proben von Müttern ohne Atopie zur statistischen Auswertung herangezogen werden. Insgesamt waren die Th17-Zellen im Nabelschnurblut niedrig exprimiert. Jedoch konnten alle an der Th17-Differenzierung relevanten Gene bereits im Nabelschnurblut auf mRNA-Ebene detektiert werden: sowohl die Transkriptionsfaktoren RoRC3 und RoRC4, als auch der Rezeptor IL-23R und die für Th17 Zellen charakteristischen Zytokine IL-17 und IL-21. Alle Gene waren bereits unstimuliert nachweisbar und nach Stimulation des angeborenen Immunsystems erhöht.

Im Nabelschnurblut atopischer Mütter wurde eine signifikant niedrigere Genexpression von unstimuliertem IL-17 nachgewiesen. Nicht signifikant unterschiedlich, aber als richtungsweisend mit niedrigerer Expression in der Gruppe mit maternaler Atopie betrachtet werden können: IL17 nach mikrobieller Stimulation

mit LpA und RoRC4 nach mikrobieller Stimulation mit Ppg. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt mit einem statistischen Modell gerechnet, um zensierte Werte zu berücksichtigen. Nach Anwendung dieses Modells blieb der Trend zur niedrigeren Expression bei Vorliegen mütterlicher Atopie bei IL-17 LpA, IL-17 M dct und RoRC4 Ppg erhalten.

Diese Ergebnisse für die mRNA-Ebene lassen sich teilweise auch auf der Proteinebene bestätigen: es konnte in einer Parallelstudie mit der PAULINA-Population gezeigt werden, dass die IL-17-Sekretion von Th17-Zellen signifikant nach Stimulation mit LpA und Ppg ansteigt.

Es zeigte sich sowohl im Nabelschnurblut atopischer als auch nicht atopischer Mütter eine durchgehend hochsignifikante Korrelation zwischen den einzelnen an der Th17-Differenzierung beteiligten Genen.

Die Ergebnisse der Dissertation wurden für mögliche Confounder adjustiert, die bekannterweise einen Einfluss auf das Atopierisiko des Kindes ausüben. Dadurch wird sichergestellt, dass die Unterschiede in der Genexpression tatsächlich auf die mütterliche Atopie zurückzuführen sind und nicht etwa auf väterliche Atopie, mütterliches Rauchen, Anzahl vorausgegangener Schwangerschaften oder andere Einflussfaktoren.

Zusätzlich zeigte sich bei der Analyse des Einflusses von mütterlichem Rauchen auf das kindliche Immunsystem eine Beteiligung der Th17-Zellen. Es ergab sich eine Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors RoRC4 nach Stimulation mit PHA im kindlichen Nabelschnurblut von Raucherinnen.

In der PAULINA-Studie konnten signifikante epidemiologische Unterschiede zwischen den atopischen und den nicht-atopischen Müttern nachgewiesen werden. Atopische Mütter zeigen ein erhöhtes Serum-Gesamt-IgE. Das spezifische IgE unterscheidet sich signifikant bei den atopischen Müttern bei der Testung auf die 2 häufigsten Arten von Hausstaubmilben.

Insgesamt können unsere Ergebnisse als eine vorhandene und intakte Th17-vermittelte Immunantwort des Neugeborenen auf mikrobielle Stimuli gesehen werden, wenngleich diese auch gering ausgeprägt ist. Die Th17-Zellen werden entsprechend ihrer proinflammatorischen Rolle schon im Neugeborenenalter aktiviert und sind funktionsfähig durch Hochregulierung ihrer Transkriptionsfaktoren und des IL-23R.

Eine derzeit stattfindende longitudinale Untersuchung der PAULINA-Probanden bis zu einem Alter von 3 bzw. 6 Jahren wird Aufschluss darüber geben, welche Kinder einen atopischen Phänotyp entwickeln und ob Th17-Zellen eine Rolle in der Entwicklung von atopischen Erkrankungen spielen.

6. Anhang

6.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung (vereinfacht) der protektiven und immunpathologischen Funktion der CD4+T-Zell-Untergruppen (nach Romagnani, „Regulation of T-cell response“ 2006)	19
Tabelle 2: IL-17 Primerdesign	35
Tabelle 3: RoRC3 Primerdesign	39
Tabelle 4: RoRC4 Primerdesign	40
Tabelle 5: Charakteristika und Lage der Exons IL23R-001, IL23R-002, IL23R-003.	44
Tabelle 6 : Primeretablierung IL-23R	46
Tabelle 7: Protokoll real-time RT-PCR „Paulina 62,5 long2.tmo“	49
Tabelle 8: Beispiel für Pipettierschema/Plate Setup	50
Tabelle 9: real-time RT-PCR Mix	50
Tabelle 10: Automatisches Analyseergebnis eines nicht detektierbaren Samples... ..	55
Tabelle 11: Populationscharakteristika: Mütterliche Atopie ist definiert als Arztdiagnose Asthma und/oder allergische Rhinitis und/oder atopische Dermatitis; signifikante Unterschiede ($p \geq 0.05$) fett gedruckt.....	59
Tabelle 12: Spezifisches IgE im Serum (mIU/ml); Unterschiede zwischen atopischen und nicht-atopischen Müttern bei einer Testreihe von verschiedenen Allergenen (Mann-Whitney-U-Test)	60
Tabelle 13: Anteil der ausgeschlossenen Proben an allen in %.....	60
Tabelle 14: Kolgomorov-Smirnoff-Anpassungstest auf Normalverteilung; CBMC der atopischen und nicht-atopischen Mütter zusammengefasst; *Normalverteilung (entspricht $p > 0.05$)	62
Tabelle 15: Kolgomorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung; nur CBMC der atopischen Mütter; *Normalverteilung (entspricht $p > 0.05$).....	63
Tabelle 16: Kolgomorov-Smirnoff-Anpassungstest auf Normalverteilung; nur CBMC der nicht-atopischen Mütter; *Normalverteilung (entspricht $p > 0.05$)	63
Tabelle 17: Deskriptive Statistik der delta-ct- und fold-difference-Werte von Unstimulierten (M) und Stimulierten (PHA, LpA, Ppg); Zusammenfassung von Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, Min/Max, 25., 50. (Median) und 75. Perzentile der CBMC atopischer und nicht-atopischer Mütter	64

Tabelle 18: Deskriptive Statistik der delta-ct- und fold-difference-Werte von Unstimulierten (M) und Stimulierten (PHA, LpA, Ppg); selektive Darstellung von Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, Min/Max, 25., 50. (Median) und 75. Perzentile der CBMC nicht-atopischer Mütter.....	65
Tabelle 19: Deskriptive Statistik der delta-ct- und fold-difference-Werte von Unstimulierten (M) und Stimulierten (PHA, LpA, Ppg); selektive Darstellung von Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, min/max, 25., 50. (Median) und 75. Perzentile der CBMC atopischer Mütter	66
Tabelle 20: Anteil von nicht-detektierbaren an allen ausgewerteten Proben, in %...	68
Tabelle 21: Wilcoxontest und deskriptive Statistik zum Vergleich Gruppen mit/ohne maternale Atopie.....	73
Tabelle 22: Vergleich der Daten vor/nach Berücksichtigung der Zensierung und Adjustierung.....	81
Tabelle 23: CBMC nicht-atopischer und atopischer Mütter; Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen TLR2/NOD2- und TLR4-Aktivierung; Mediane..	82
Tabelle 24: CBMC nicht-atopischer und atopischer Mütter; Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen Mitogen und TLR4-Stimulation; Mediane; $p \leq 0.05$ fett gedruckt.....	82
Tabelle 25: CBMC nicht-atopischer und atopischer Mütter; Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zwischen Mitogen und TLR2/NOD-Stimulation; Mediane; $p \leq 0.05$ fett gedruckt.....	83
Tabelle 26: Spearman-Korrelation von IL-17 mit anderen Th17-assoziierten Genen ($p \leq 0.05$ fett gedruckt); r = Korrelationskoeffizient; ** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig); * Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).....	84

6.2. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: US National Health Statistics Report: Asthmaprävalenz von 1980-1996, Prävalenz von Asthmaattacken und akute Asthmaprävalenz in allen Altersgruppen bis 18 Jahre (nach Akinbami, Moorman et al. 2011)	9
Abb. 2: Beispiel für Aktivierung einer Zelle durch TLR: TLR2 (in Komplex mit TLR1 oder TLR6) und TLR4 aktivieren u.a. den MyD88-Pathway. Gemeinsame Endstrecke ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der proliferationsfördernde und entzündungsvermittelnde Gene hochreguliert (aus: Takeda: „Toll-like receptors in innate immunity“ Int Immunol 2005).....	15
Abb. 3: TLR4-vermittelte Aktivierung von Immunzellen: über einen Proteinkomplex aus CD14 und TLR4 wird LPS/LpA an die Zelloberfläche gebunden und löst eine Aktivierung über MyD88 oder MAL/TIRAP aus. Am Ende der Kaskade steht die durch NF- κ B vermittelte Proliferation und Differenzierung von T-Zellen (aus: Buel J: „Mice, microbes and models of infection.“ Nature Reviews Genetics 2003)	16
Abb. 4: Verschiedene zytokinvermittelte Differenzierungswege der naiven CD4+-T-Zelle. Zelluläre (Th1-vermittelte), humorale (Th2-vermittelte) und das Epithel betreffende Immunität (möglicherweise Th17-vermittelt); modifiziert nach Ouyang et al. 2009	20
Abb. 5: Humane Th17-Zelle mit Transkriptionsfaktor, Oberflächenrezeptoren, für die Differenzierung wichtige Zytokine und Effektorzytokine; modifiziert nach Ouyang et al. 2009	22
Abb. 6: kurze Darstellung der Methodik	31
Abb. 7: Lage von IL-17 auf Chromosom 6	34
Abb. 8: Lage der proteinkodierenden Abschnitte in IL-17-A, mit vergrößertem Abschnitt („Vega“ Gendatenbank)	34
Abb. 9: Lage der IL-17 Primer	35
Abb. 10: Schmelzkurve von IL-17 in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München).....	36
Abb. 11: Lage der Primer von RoRC3 und RoRC4 auf Chromosom 1	36
Abb. 12: Gelelektrophorese nach rt RT-PCR mit Nabelschnurblut, in Zellkultur stimuliert mit PHA, RoRC1-3 und <i>housekeeping gene</i> 18S, ladder.....	37
Abb. 13: Schmelzkurve von RoRC4 in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München)	40

Abb. 14: IL-21 auf Chromosom 4	41
Abb. 15: Lage der Exons innerhalb des Gens IL-21 mit vergrößerter Ansicht	41
Abb. 16: Annealingstellen der Primer innerhalb des Gens IL-21.....	42
Abb. 17: Schmelzkurve von IL-21 in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München); in diesem Fall kein Nabelschnurblut, sondern PBMC (periphere mononukleäre Zellen) eines Erwachsenen.....	43
Abb. 18: Lage von IL23R auf Chr.1.....	43
Abb. 19: Lage der Exons 001, 002 und 003 auf IL-23R mit vergrößertem Ausschnitt.....	44
Abb. 20: Schmelzkurve von IL-23R in der realtime-RT-PCR (iCycler, Biorad, München); Nabelschnurblutprobe.....	46
Abb. 21: iCycler (Biorad, München) und PC (Bild: C. Hinnerwisch).....	48
Abb. 22: Sich verfestigende Agarose in Gelkammer mit Kämmen (Bild: C. Hinnerwisch)	52
Abb. 23: Elektrophoresekammer nach dem Lauf (Bild: C. Hinnerwisch).....	53
Abb. 24: Achse mit ct-Werten zwischen ct=32 und ct=38 (IL-17 M, PHA, LpA, Ppg).....	54
Abb. 25: Beispiel für ideale Schmelzkure (IL-17 LpA).....	54
Abb. 26: Beispiel für nicht detektierbare Probe (IL-17 M, PHA, LpA, Ppg) mit Schmelzkurve und ct-Achse	55
Abb. 27: Grafik aus iCycler-Programm (Biorad); Beispiel für detektierbaren Wert in der rt RT-PCR: PAULINA Nr. 87 IL-17 LpA; ct=32,5.....	67
Abb. 28: Grafik aus iCycler-Programm (Biorad); Beispiel für „nicht-detektierbaren“ Wert in der rt RT-PCR: P15 IL17 Media; automatisch ermittelter Wert ct=34,2 ist bei dieser Schmelzkurve nicht verwendbar	67
Abb. 29: A Expression von RoRC3 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; hohe numerische Werte entsprechen niedriger Expression; B p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test).....	69
Abb. 30: A Expression von RoRC4 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; hohe numerische Werte entsprechen niedriger Expression; B p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test).....	69

Abb. 31: A Expression von RoRC4 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; hohe numerische Werte entsprechen niedriger Expression; B p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test).....	70
Abb. 32: A Expression von IL-17 (dct-Werte); unstimuliert (Media) und nach Stimulation mit PHA, LpA und Ppg; Fehlerbalken mit 95% Konfidenzintervall; B p-Wert Unterschied von Unstimuliert zu PHA, LpA oder Ppg (Mann-Whitney-U-Test)	71
Abb. 33 IL-17: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct.....	74
Abb. 34: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct	75
Abb. 35: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct	76
Abb. 36: Daten gezeigt als Boxplots (Median; Fehlerbalken 5. und 95. Perzentile mit Ausreißern; A Unstimuliert IL-23R Media dct; B-D Stimuliert IL-23 PHA, LpA und Ppg dct	77
Abb. 37: Matrix-Streudiagramm der Spearman Korrelationen: RoRC4 und IL-17 mit den Stimuli PHA, LpA, Ppg (CBMC atopischer Mütter); Darstellung der fold-difference-Werte	84
Abb. 38: Steigerung der Expression des Transkriptionsfaktors RoRC4 nach Stimulation mit PHA ergab sich im Nabelschnurblut von Kindern von Raucherinnen ($p = 0.055$, Wilcoxon-Test); Angabe des delta ct: hoher Wert bedeutet niedrige Expression in der rt RT-PCR.	85

6.3. Abkürzungsverzeichnis

APC	antigenpräsentierende Zelle/cell
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CBMC	<i>cord blood mononuclear cells</i>
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
DEPC	gereinigtes Wasser
DNA	Desoxyribonukleonsäure/acid
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fas-Ligand	Apoptose induzierendes transmembranöses Protein
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Guanin
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
LpA	Lipid A
mA	milli Ampère
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NR	<i>nuclear receptor</i>
NTC	<i>non template control</i>
PAMP	<i>pathogen associated pattern</i>

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHA	Phytohämagglutinin
Ppg	Peptidoglykan
QRT	Reverse-Transkriptase-Mix
rh	rekombinant human
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten entwickelt in den 1960er Jahren am <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Buffalo, N.Y.)
rt	<i>realtime</i>
RT	Reverse Transkriptase: Enzym, das die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert
STAT	Signal Transducer and Activation of T-Cells
Th-Zelle	T-Helfer (-Zelle)
TLR	<i>toll-like receptor</i>
T _m	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell Rezeptor
UV	ultraviolett
V	Volt

6.4. Epidemiologische Daten

	Mutter	Kind	Vater
Geburt	<ul style="list-style-type: none"> • Entbindungsmodus • PDA • z.N. Sectio • Blasensprung • Geburtsdauer • Komplikationen 	<ul style="list-style-type: none"> • Geschlecht • Gestationsalter • Geburtsgewicht • Körperlänge • Kopfumfang • Apgar-Score • Nabelschnur-pH 	
Medizinisch-epidemiologische Fakten	<ul style="list-style-type: none"> • Atopiestatus • Allergien • Rauchen • Medikamente während der Schwangerschaft • Anzahl Schwangerschaften • Fehlgeburten • Gesamt-IgE • Spezifisches IgE 	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstumsretardierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Atopiestatus • Allergien
Sozial-epidemiologische Fakten	<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Herkunft • Ausbildung 		<ul style="list-style-type: none"> • Herkunft

6.5. Einverständniserklärung zur Teilnahme an der PAULINA-Studie

EINVERSTÄNDNIS

Zur Nabelschnurblutstudie PAULINA

„Das Immunsystem des Neugeborenen: Charakterisierung des Phänotyps und Funktion von Nabelschnurblut im Rahmen von Endotoxinstimulation“

Vor und Nachname der Mutter:

Name des Kindes:
(wenn bereits bekannt mit Vorname,
sonst Nachname)

Anschrift:
.....
.....

Telefon:

Hiermit erkläre ich/wir mein/unser Einverständnis, an der Studie teilzunehmen. Ich/Wir wurde/n über das Projekt und die Risiken der Teilnahme informiert. Ich/wir bin/sind damit einverstanden, dass bei der Mutter bei der Routineblutabnahme Blut für eine Allergietestung und aus dem Nabelschnurblut nach Entbindung ca. 20-30 ml Blut entnommen werden. Zudem sind wir einverstanden, dass für evtl. spätere Untersuchungen DNA von Mutter und Nabelschnurblut eingefroren wird. Ich/Wir kann/können diese Einverständniserklärung jederzeit ohne jegliche Folgen widerrufen.

Das Informationsblatt habe ich/wir gelesen und ich/wir hatte/n ausreichend Zeit, diese Entscheidung zu überlegen. Alle meine/unsere Fragen wurden beantwortet. Eine Kopie des Informationsblattes und der Einverständniserklärung habe ich/wir erhalten.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift der Mutter

6.6. Fragebogen zur PAULINA-Studie (perinatal)

Kinderklinik und Poliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Datum:

Studiennummer:

Nabelschnurblutstudie PAULINA Fragebogen für die Mutter

Wir freuen uns, dass Sie an unserer Nabelschnurblutstudie teilnehmen. Bitte kreuzen Sie die folgenden Fragen an. Ihre Antworten werden vertraulich behandelt. Wenn Sie eine Frage nicht beantworten möchten, lassen Sie sie bitte aus.

1. Sind Sie in Deutschland geboren?

Ja

Nein, ich bin in _____ geboren.

2. Welche Staatsangehörigkeit haben Sie?

Wir fragen nach der Staatsangehörigkeit, damit wir einschätzen können, welche Bevölkerungsgruppe wir untersucht haben.

3. Welche Staatsangehörigkeit hat der Vater des Kindes?

4. Welche Schulausbildung haben Sie abgeschlossen?

Hauptschule

Realschule

Gymnasium

Universität

Andere: bitte angeben: _____

5. Hat ein Arzt jemals eine der folgenden Erkrankungen bei Ihnen diagnostiziert?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes, rheumatoide Arthritis.

Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche _____

Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)

Weitere: _____

Nein

6. Waren Sie während der Schwangerschaft an einer der folgenden Erkrankungen erkrankt?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Autoimmunerkrankung, wie z.B. Diabetes, rheumatoide Arthritis.

Schilddrüsenerkrankung, bitte angeben welche: _____

Darmerkrankung (M. Crohn, ulzerative Kolitis)

Weitere: _____

Nein

7. Haben Sie dafür Medikamente eingenommen?

Ja, ich habe _____/Tag eingenommen.

Nein

8. Haben Sie während der Schwangerschaft Medikamente eingenommen?

Ja, ich habe _____/Tag von der _____SSW
(Schwangerschaftswoche) bis zur _____SSW eingenommen.

Nein

9. Hat ein Arzt bei dem Vater des Kindes jemals eine der folgenden Erkrankungen diagnostiziert?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Nein

10. Leidet er aktuell an einer der folgenden Erkrankungen?

Asthma

Heuschnupfen

Neurodermitis

Nein

11. Nimmt er dafür derzeit Medikamente ein?

Ja, er nimmt _____

Nein

12. Welche der folgenden Beschreibungen trifft für Sie am ehesten zu?

Ich habe niemals Zigaretten geraucht.

Ich habe früher Zigaretten geraucht, und vor Beginn der Schwangerschaft aufgehört.

Ich habe aufgehört zu rauchen, seit ich weiß, dass ich schwanger bin.

Ich rauche derzeit durchschnittlich _____Zigaretten/Tag.

13. Ist dies Ihre erste Schwangerschaft?

Ja

Nein, ich habe bereits _____Kinder.

14. Haben Sie jemals eine Fehlgeburt während einer vorangegangenen Schwangerschaft gehabt?

Ja, in der _____Schwangerschaftswoche.

Nein

Bei Fragen können Sie sich jederzeit gerne an uns wenden.

Studienleitung:

Prof. Dr. med. Erika von Mutius

Studienärztin:

Dr. med. Bianca Schaub

6.7. Danksagung

Hiermit möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank Frau PD Dr. med. Bianca Schaub für die Überlassung dieses so vielseitigen und hochinteressanten Themas und die Möglichkeit, in ihrer internationalen Arbeitsgruppe für Allergologie und Immunologie mitzuarbeiten. Ich danke ganz besonders für die kompetente Einführung in die faszinierende Welt der Immunologie und die verlässliche Betreuung dieser Dissertation.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. h.c. Dietrich Reinhardt und Herrn Prof. Dr. Dr. med. Christoph Klein für die Möglichkeit, diese Dissertation im Forschungszentrum des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität zu München anzufertigen und schon während des Studiums wissenschaftliche Erfahrung zu sammeln.

Besonderer Dank gilt auch Isolde Schleich, Michaela Schedel und Anna Lluis für die kompetente Einführung und Unterstützung in die molekulargenetische Methodik und die vielen hilfreichen Tipps bei der alltäglichen Laborarbeit sowie Sabina Illi und Nikolaus Ballenberger für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Aufrichtiger Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern für die unermüdliche, liebevolle und optimistische Unterstützung während des gesamten Studiums und der Entstehung dieser Doktorarbeit und ganz besonders Gerald für seine tatkräftige Korrektur- und Formatierungsarbeit.

6.8. Quellenverzeichnis

- 1 Eder, W., M. J. Ege, et al. (2006). "The asthma epidemic." N Engl J Med **355**(21): 2226-35.
- 2 Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." BMJ **299**(6710): 1259-60.
- 3 Levy, O. (2007). "Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates." Nat Rev Immunol **7**(5): 379-90.
- 4 Ehlers, S. and S. H. Kaufmann "99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: lifestyle changes affecting the host-environment interface." Clin Exp Immunol **160**(1): 10-4.
- 5 <http://www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr032.pdf> (Onlinequelle abgefragt am 28.05.2011): Summary Health Statistics for U.S. children, National Health Interview Survey, 2009.
- 6 Akinbami, L. J., J. E. Moorman, et al. "Asthma prevalence, health care use, and mortality: United States, 2005-2009." Natl Health Stat Report(32): 1-14.
- 7 Tariq, S. M., S. M. Matthews, et al. (1998). "The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study." J Allergy Clin Immunol **101**(5): 587-93.
- 8 Schaub, B., J. Liu, et al. (2008). „Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers.“ J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1491-9, 1499 e1-13.
- 9 Schmidt, R., Lang, F., Thews, G. (2004). „Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie“. Springer-Verlag GmbH; Auflage: 29., vollst. neu bearb. u. aktualis. A.
- 10 Holt, P. G. and C. A. Jones (2000). "The development of the immune system during pregnancy and early life." Allergy **55**(8): 688-97.
- 11 Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- 12 Kufer, T. A., D. J. Banks, et al. (2006). "Innate immune sensing of microbes by Nod proteins." Ann N Y Acad Sci **1072**: 19-27.
- 13 Pfeiffer R. „Untersuchungen über das Cholera Gift“ Z Hygiene. 1892;11:393-412.
- 14 Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- 15 Buer, J and Balling R. (2003). „Mice, microbes and models of infection.“ Nat Rev Gen **4**(3):195-205. 4, 195-205.
- 16 Buer, J and Balling R. (2003). „Mice, microbes and models of infection.“ Nat Rev Gen **4**(3):195-205. 4, 195-205.
- 17 Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 180-6.
- 18 Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- 19 Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.

- 20 Cua, D. J., J. Sherlock, et al. (2003). „Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.“ Nature **421**(6924): 744-8.
- 21 Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-57.
- 22 Cua, D. J., J. Sherlock, et al. (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." Nature **421**(6924): 744-8.
- 23 Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem **278**(3): 1910-4.
- 24 Harrington, L. E., P. R. Mangan, et al. (2006). "Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage." Curr Opin Immunol **18**(3): 349-56.
- 25 Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 495-521.
- 26 Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." Immunol Today **18**(6): 263-6.
- 27 Weaver, C. T. (2009). "Th17: The ascent of a new effector T-cell subset. Preface." Eur J Immunol **39**(3): 634-6.
- 28 Pelletier, M., L. Maggi, et al. "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." Blood **115**(2): 335-43.
- 29 Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-67.
- 30 Kao, C. Y., Y. Chen, et al. (2004). "IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways." J Immunol **173**(5): 3482-91.
- 31 Kao, C. Y., F. Huang, et al. (2005). "Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway." Ibid. **175**(10): 6676-85.
- 32 Weaver, C. T. (2009). "Th17: The ascent of a new effector T-cell subset. Preface." Eur J Immunol **39**(3): 634-6.
- 33 Cooper, A. M. Ibid. "IL-17 and anti-bacterial immunity: protection versus tissue damage." 649-52.
- 34 Witowski, J., K. Ksiazek, et al. (2004). "Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses." Cell Mol Life Sci **61**(5): 567-79.
- 35 Seiderer, J., I. Elben, et al. (2008). "Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD." Inflamm Bowel Dis **14**(4): 437-45.
- 36 Ouyang, W., E. Filvaroff, et al. (2009). "Novel therapeutic targets along the Th17 pathway." Eur J Immunol **39**(3): 670-5.
- 37 Carlson, M. J., M. L. West, et al. (2009). "In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations." Blood **113**(6): 1365-74.
- 38 Romagnani, S. (2006). "Regulation of the T cell response." Clin Exp Allergy **36**(11): 1357-66.

- 39 Ouyang, W., E. Filvaroff, et al. (2009). "Novel therapeutic targets along the Th17 pathway." Eur J Immunol **39**(3): 670-5.
- 40 Harrington, L. E., P. R. Mangan, et al. (2006). "Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage." Curr Opin Immunol **18**(3): 349-56.
- 41 Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.
- 42 Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-89.
- 43 Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.
- 44 Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2007). „Phenotypic and functional features of human Th17 cells.“ J Exp Med **204**(8): 1849-61.
- 45 Veldhoen, M., C. Uyttenhove, et al. (2008). „Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset.“ Nat Immunol **9**(12): 1341-6.
- 46 Roark, C. L., P. L. Simonian, et al. (2008). "gammadelta T cells: an important source of IL-17." Curr Opin Immunol **20**(3): 353-7.
- 47 Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2009). "Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells?" Eur J Immunol **39**(3): 637-40.
- 48 Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-46.
- 49 Cosmi, L., R. De Palma, et al. (2008). "Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor." J Exp Med **205**(8): 1903-16.
- 50 Ibid.
- 51 Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-9.
- 52 Ghoreschi, K., A. Laurence, et al. "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." Nature **467**(7318): 967-71.
- 53 Ouyang, W., E. Filvaroff, et al. (2009). "Novel therapeutic targets along the Th17 pathway." Eur J Immunol **39**(3): 670-5.
- 54 He, Y. W., M. L. Deftos, et al. (1998). "RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells." Immunity **9**(6): 797-806.
- 55 Linden, A. (2001). "Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma." Int Arch Allergy Immunol **126**(3): 179-84. 2001.
- 56 Ouyang, W., E. Filvaroff, et al. (2009). „Novel therapeutic targets along the Th17 pathway.“ Eur J Immunol **39**(3): 670-5.
- 57 Linden, A. (2001). "Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma." Int Arch Allergy Immunol **126**(3): 179-84.

- 58 Ozaki, K., R. Spolski, et al. (2002). "A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production." Science **298**(5598): 1630-4.
- 59 Schmidt, H., J. Brown, et al. "Safety and clinical effect of subcutaneous human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma: a phase I trial." Clin Cancer Res **16**(21): 5312-9.
- 60 Bullens, D. M., A. Kasran, et al. "In vivo maturation of T(H) cells in relation to atopy." J Allergy Clin Immunol **128**(1): 234-237 e7.
- 61 Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.
- 62 Romagnani, S. (2006). "Regulation of the T cell response." Clin Exp Allergy **36**(11): 1357-66.
- 63 Lyakh, L., G. Trinchieri, et al. (2008). "Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans." Immunol Rev **226**: 112-31.
- 64 Vanden Eijnden, S., S. Goriely, et al. (2005). "IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human." Eur J Immunol **35**(2): 469-75.
- 65 McGeachy, M. J., Y. Chen, et al. (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." Nat Immunol **10**(3): 314-24.
- 66 Levy, O. (2007). "Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates." Nat Rev Immunol **7**(5): 379-90.
- 67 Vitoratos, N., C. Papadias, et al. (2006). "Elevated circulating IL-1beta and TNF-alpha, and unaltered IL-6 in first-trimester pregnancies complicated by threatened abortion with an adverse outcome." Mediators Inflamm **2006**(4): 30485.
- 68 Marodi, L. (2006). "Innate cellular immune responses in newborns." Clin Immunol **118**(2-3): 137-44.
- 69 Angelone, D. F., M. R. Wessels, et al. (2006). "Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo." Pediatr Res **60**(2): 205-9.
- 70 Levy, O., M. Coughlin, et al. (2006). "The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn." J Immunol **177**(3): 1956-66.
- 71 Vanden Eijnden, S., S. Goriely, et al. (2006). "Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns." Eur J Immunol **36**(1): 21-6.
- 72 Cosmi, L., F. Liotta, et al. "Th17 cells: new players in asthma pathogenesis." Allergy **66**(8): 989-98.
- 73 Alcorn, J. F., C. R. Crowe, et al. "TH17 cells in asthma and COPD." Annu Rev Physiol **72**: 495-516.
- 74 Doe, C., M. Bafadhel, et al. "Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD." Chest **138**(5): 1140-7.
- 75 Linden, A. (2001). "Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma." Int Arch Allergy Immunol **126**(3): 179-84. 2001.
- 76 Cosmi, L., F. Liotta, et al. "Th17 cells: new players in asthma pathogenesis." Allergy **66**(8): 989-98.
- 77 Hashimoto, T., K. Akiyama, et al. (2005). "Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects." Int Arch Allergy Immunol **137 Suppl 1**: 51-4.

- 78 Matsunaga, K., S. Yanagisawa, et al. (2006). "Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients." J Allergy Clin Immunol **118**(1): 84-90.
- 79 Eyerich, K., D. Pennino, et al. (2009). „IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response.“ J Allergy Clin Immunol **123**(1): 59-66 e4.
- 80 Sugiyama, M., H. Arakawa, et al. (2007). "Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year." Pediatrics **119**(3): e716-23.
- 81 Ciprandi, G., M. De Amici, et al. (2009). "Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis." Allergy **64**(9): 1375-8.
- 82 Matsumoto, Y., E. Noguchi, et al. "Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis." Allergol Int **60**(1): 87-92.
- 83 McAleer, J. P. and A. T. Vella (2008). "Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity." Crit Rev Immunol **28**(4): 281-99.
- 84 <http://vega.sanger.ac.uk>.
- 85 <http://www.ensembl.org>.
- 86 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>.
- 87 He, Y. W., M. L. Deftos, et al. (1998). "RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells." Immunity **9**(6): 797-806.
- 88 Kaplan EL, Meier P. 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association **53**(282): 457-481.
- 89 Peto R, Peto J. 1972. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. Journal of the Royal Statistical Society Series A (General) **135**(2): 185-207.
- 90 Prentice RL. 1978. Linear rank tests with right censored data. 167-179.
- 91 Conover WJ. 1980. Practical Nonparametric Statistics New York: John Wiley and Sons.
- 92 Conover WJ, Iman RL. 1981. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. The American Statistician **35**(3): 124-129.
- 93 Tobin J. 1958. Estimation of Relationships for Limited Dependent Variables. Econometrica **26**(1): 24-36.
- 94 Vanden Eijnden, S., S. Goriely, et al. (2005). "IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human." Eur J Immunol **35**(2): 469-75.
- 95 Schaub, B., J. Liu, et al. (2008). "Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers." J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1491-9, 1499 e1-13.
- 96 Schaub, B., J. Liu, et al. (2008). "Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth." Allergy **63**(11): 1438-47.
- 97 Levy, O. (2007). "Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates." Nat Rev Immunol **7**(5): 379-90.
- 98 Van Duren-Schmidt, K., J. Pichler, et al. (1997). "Prenatal contact with inhalant allergens." Pediatr Res **41**(1): 128-31.

- 99 Szepfalusi, Z., I. Nentwich, et al. (1997). "Prenatal allergen contact with milk proteins." Clin Exp Allergy **27**(1): 28-35.
- 100 Fievet, N., P. Ringwald, et al. (1996). "Malaria cellular immune responses in neonates from Cameroon." Parasite Immunol **18**(10): 483-90.
- 101 Yu, M., S. Fredrikson, et al. (1995). "High numbers of autoantigen-reactive mononuclear cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma), IL-4 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) are present in cord blood." Clin Exp Immunol **101**(1): 190-6.
- 102 Nyirenda, M. H., L. Sanvito, et al. "TLR2 Stimulation Drives Human Naive and Effector Regulatory T Cells into a Th17-Like Phenotype with Reduced Suppressive Function." J Immunol.
- 103 Levy, O. (2007). "Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates." Nat Rev Immunol **7**(5): 379-90.
- 104 Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-61.
- 105 Haddeland, U., P. Brandtzaeg, et al. (2007). "Maternal allergy influences the proliferation of neonatal T cells expressing CCR4, CXCR5 or CD103." Clin Exp Allergy **37**(6): 856-64.
- 106 Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." BMJ **299**(6710): 1259-60.
- 107 Midodzi, W. K., B. H. Rowe, et al. "Early life factors associated with incidence of physician-diagnosed asthma in preschool children: results from the Canadian Early Childhood Development cohort study." J Asthma **47**(1): 7-13.
- 108 Schneider, S., H. Maul, et al. (2008). "Who smokes during pregnancy? An analysis of the German Perinatal Quality Survey 2005." Public Health **122**(11): 1210-6.
- 109 Ungar, W. J., S. F. Cope, et al. "Socioeconomic factors and home allergen exposure in children with asthma." J Pediatr Health Care **24**(2): 108-15.
- 110 Farfel, A., A. Tirosh, et al. "Association between socioeconomic status and the prevalence of asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **104**(6): 490-5.
- 111 Basagana, X., J. Sunyer, et al. (2004). "Socioeconomic status and asthma prevalence in young adults: the European Community Respiratory Health Survey." Am J Epidemiol **160**(2): 178-88.
- 112 ISAAC Global Asthma Report 2011: <http://isaac.auckland.ac.nz/publications/worldwide.php>; 08.01.2012
- 113 Just, J., S. Belfar, et al. "Impact of innate and environmental factors on wheezing persistence during childhood." J Asthma **47**(4): 412-6.
- 114 Schaub, B. and E. von Mutius (2005). "Obesity and asthma, what are the links?" Curr Opin Allergy Clin Immunol **5**(2): 185-93.
- 115 Xu, B., J. Pekkanen, et al. (2002). "Body build from birth to adulthood and risk of asthma." Eur J Public Health **12**(3): 166-70.
- 116 Romagnani, S. (2004). "The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both?" Immunology **112**(3): 352-63.

- 117 Fernandes, J. F., E. A. Taketomi, et al. "Antibody and cytokine responses to house dust mite allergens and *Toxoplasma gondii* antigens in atopic and non-atopic Brazilian subjects." Clin Immunol **136**(1): 148-56.
- 118 Hashimoto, T., K. Akiyama, et al. (2005). "Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects." Int Arch Allergy Immunol **137 Suppl 1**: 51-4.
- 119 Bullens, D. M., E. Truyen, et al. (2006). "IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?" Respir Res **7**: 135.
- 120 Perez-Machado, M. A., P. Ashwood, et al. (2004). "Spontaneous T(H)1 cytokine production by intraepithelial but not circulating T cells in infants with or without food allergies." Allergy **59**(3): 346-53.
- 121 Pukelsheim, K., T. Stoeger, et al. "Cytokine profiles in asthma families depend on age and phenotype." PLoS One **5**(12): e14299.
- 122 Moffatt, M. F., M. Kabesch, et al. (2007). "Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma." Nature **448**(7152): 470-3.
- 123 Wu, H., I. Romieu, et al. (2009). "Genetic variation in ORM1-like 3 (ORMDL3) and gasdermin-like (GSDML) and childhood asthma." Allergy **64**(4): 629-35.
- 124 Warner, J. O. (2004). "The early life origins of asthma and related allergic disorders." Arch Dis Child **89**(2): 97-102.
- 125 Bogaert, D., D. Weinberger, et al. (2009). "Impaired innate and adaptive immunity to *Streptococcus pneumoniae* and its effect on colonization in an infant mouse model." Infect Immun **77**(4): 1613-22.
- 126 Haddeland, U., P. Brandtzaeg, et al. (2007). "Maternal allergy influences the proliferation of neonatal T cells expressing CCR4, CXCR5 or CD103." Clin Exp Allergy **37**(6): 856-64.
- 127 Ege, M. J., C. Bieli, et al. (2006). "Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children." J Allergy Clin Immunol **117**(4): 817-23.
- 128 Pinto, L. A., R. T. Stein, et al. (2008). "Impact of genetics in childhood asthma." J Pediatr (Rio J) **84**(4 Suppl): S68-75.