

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

und

dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Institut für Molekulare Immunologie

Dirketorin: Prof. Dr. rer.nat. D.J.Schendel

**Assoziation mütterlicher und fetaler mRNA-Niveaus von CD14 und Toll-  
like Rezeptor 2 und 4 mit allergischen Erkrankungen der Mutter**



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Hector

aus

Tokyo / Japan

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. med. S. Krauss-Etschmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. Thomas  
Priv. Doz. Dr. U. Hasbargen

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter Dr. med. D. Hartl

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2008

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Das angeborene Immunsystem	9
1.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems – Toll-like Rezeptoren und CD14	11
1.3 Toll-like Rezeptoren und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems	15
1.4 Die Hygiene-Hypothese – Pathogene und die Entwicklung von atopischen Erkrankungen	15
1.5 Pathogene, Toll-like Rezeptoren und atopische Erkrankungen	17
1.6 Einzelnukleotid-Polymorphismen – Interaktionen von Genen und Umwelt	19
1.7 Das Immunsystem des Neugeborenen, pränatale Exposition und atopische Erkrankungen	21
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>3. Probanden, Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Studiendesign und Probandinnen	24
3.2 Methoden	26
3.2.1 Gewinnung und Lagerung der Proben	26
3.2.2 Aufbereitung der Proben	26
3.2.2.1 mRNA-Extraktion	26
3.2.2.2 cDNA-Synthese	28
3.2.3 Real-time reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion	29
3.2.3.1 Primer und das Haushaltsgen	30
3.2.3.2 Durchführung	31
3.2.3.3 Auswertung	32
3.2.3.4 Produktkontrolle	33
3.2.3.4.1 Schmelzkurvenanalyse	33
3.2.3.4.2 Gelelektrophorese	34
3.2.3.4.3 Wasserkontrolle	35
3.2.3.4.4 RT-negativ-Kontrolle	35

3.2.3.4.5	Intra-assay-Kontrolle	35
3.2.3.4.6	Sequenzierung der iCycler-Produkte	36
3.2.4	Durchflusszytometrie	36
3.3	Statistische Auswertung	37
3.4	Material	38
3.4.1	Chemikalien, Puffer und Primer	38
3.4.2	Glas- und Plastikmaterial	39
3.4.3	Geräte	39
3.4.4	Software	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
4.1	Probandengruppen	40
4.2	mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 im mütterlichen Blut	43
4.2.1	Bivariate Assoziationen bei den Müttern	43
4.2.2	Multivariate Regressionsanalysen bei den Müttern	45
4.3	mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 im Nabelschnurblut	46
4.3.1	Bivariate Assoziationen bei den Neugeborenen	46
4.3.2	Multivariate Regressionsanalysen bei den Neugeborenen	47
4.4	Korrelationen zwischen mütterlichen und neonatalen mRNA-Expressionsniveaus	48
4.5	Rezeptorexpression auf Monozyten im Nabelschnurblut	50
4.6	Korrelation von mRNA-Expressionsniveaus mit der Rezeptorexpression auf Monozyten	53
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
5.1	Studie und Probanden	56
5.2	Quantitative Real-time RT-PCR	57
5.3	Pathogene und die Hygiene-Hypothese	58
5.4	Genetische Prädisposition und die Hygiene-Hypothese	61
5.5	Pränatale Einflüsse und die Entwicklung von atopischen Erkrankungen	62
5.6	Regulierung des Immunsystems – Eine erweiterte Hygiene-Hypothese?	64
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>

<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	69
7.1	Literaturverzeichnis	69
7.2	Tabellenverzeichnis	85
7.3	Abbildungsverzeichnis	86
7.4	Danksagung	87
7.5	Lebenslauf	88

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplentäre DNA
CP	Crossing Point
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Der f / p	Haustaubmilbenallergene dermatophagoides farinae / pteronyssinus
d.h.	das heißt
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EPA	Eicosapentaensäure
et al	et alias
EU	Endotoxin Unit
Foxp3	X-linked forkhead / winged helix transcription factor
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM	geometrischer Mittelwert
H <sub>2</sub> O	Wasser
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervalle
LpA	Lipid A
LPS	Lipopolysaccharid

mCD14	membrangebundenes CD14
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MR	Verhältnis der geometrischen Mittelwerte (means ratio)
mRNA	messenger-RNA
5-MTHF	5-Methyl-Tetrahydrofolsäure
MyD88	Myeloid-Differenzierungs-Faktor 88
ng	Nanogramm
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NUHEAL	Nutraceuticals for a healthier life
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pico-mol
Ppg	Peptidoglykan
PRR	Pathogen-erkennende Rezeptoren (pathogen recognition receptor)
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	RS-Virus (respiratory syncytial virus)
RT-PCR	reverse Transkription-PCR
s	Sekunden
sCD14	gelöstes CD 14 (soluble CD 14)
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
sog.	sogenannt
SD	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethanol
TGF	Transforming Growth Factor
T <sub>H</sub>	T-Helfer (Lymphozyten)
TIR	Toll/ IL-1 Rezeptor-Domäne
TIRAP	TIR-Domäne enthaltendes Adapterprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Lymphozyten
TRAM	Toll-Rezeptor assoziiertes Molekül
TRIF	Toll-Rezeptor assoziierter Aktivator von Interferon



# 1. Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt einen evolutionär alten Teil des Abwehrmechanismus eines Organismus dar. Einige molekulare Strukturen des angeborenen Immunsystems können sowohl in Pflanzen als auch in Tieren gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass diese bereits bestanden, bevor die evolutionäre Teilung des Pflanzen- und Tierreiches stattfand<sup>35</sup>. Das angeborene Immunsystem fungiert als vorderste Front des Abwehrsystems<sup>36</sup>. Es erkennt eindringende Mikroorganismen und eliminiert Pathogene in gesunden Individuen innerhalb von Minuten bis Stunden, wodurch ein Ausbruch einer Erkrankung verhindert wird.

Der Kontakt mit Mikroben erfolgt im respiratorischen Trakt aerogen, im gastrointestinalen Trakt durch Nahrungskontaminationen und mit der Darmflora, durch Penetration der Haut nach Insektenbissen oder Wunden oder durch direkten sexuellen Kontakt über den Reproduktionstrakt. Als erster Schutzfaktor spielen hier die physikalischen Schutzmechanismen eine tragende Rolle. Zu diesen gehören epitheliale Oberflächen, da sie mit ihrem Zell-zu-Zell-Gefüge wie das der Tight-junctions eine Barriere als Schutz vor Mikroorganismen aufbauen. An mukösen Epithelien werden Sekrete produziert, welche die Adhäsion von Mikroorganismen an der Epithelwand verhindern sollen. Im Respirationstrakt wird durch epitheliale Zilien der Schleim samt Mikroorganismen abtransportiert und kann dann abgehustet werden. Im gastrointestinalen Trakt werden Pathogene und Mikroorganismen durch die Peristaltik ausgeschieden. Im Urogenitaltrakt wirkt der Harnstrom als schützender Faktor mit<sup>36</sup>.

Der zweite Schutzfaktor für den Organismus besteht in humoralen Schutzmechanismen. In den Mukosazellen werden verschiedene antimikrobielle Substanzen gebildet – beispielsweise  $\alpha$ -Defensin im Gastrointestinaltrakt, Lysozym in Speichel- und Tränenflüssigkeit oder das Defensin im Respirationstrakt und Urogenitaltrakt. Die Surfactant Proteine A und D im Respirationstrakt nehmen eine wichtige Rolle ein, indem sie die Phagozytose der Mikroorganismen durch Makrophagen fördern<sup>36;51</sup>. Komplementfaktoren wie der Faktor C3 können eine alternative Aktivierung des Komplementsystems initiieren, ebenso das Mannose-Bindungsprotein. Dieses führt dann zu einer Aktivierung des Immunsystems durch

Oponisierung mit nachfolgender Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Lyse von pathogenen Zellen<sup>36</sup>.

Zelluläre Schutzmechanismen stellen den dritten Schutzfaktor dar. Durchdringen die pathogenen Keime die epitheliale Barriere, werden sie von mononukleären Phagozyten wie den Makrophagen erkannt. Makrophagen stammen von Monozyten ab, die nach Bildung im Knochenmark ein bis zwei Tage im Blut zirkulieren, ehe sie in verschiedene Organe einwandern und sich dort gewebetypisch differenzieren. Eine weitere wichtige Gruppe der Phagozyten sind die polymorphonukleären neutrophilen Leukozyten. Diese sind normalerweise nicht im gesunden Gewebe vorhanden, jedoch werden sie im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses dorthin rekrutiert. Phagozyten können, indem sie oberflächliche Strukturen fremder und eigener Zellen unterscheiden, pathogene Mikroorganismen mit ihren Oberflächenrezeptoren erkennen. Zu diesen Oberflächenrezeptoren gehören unter anderem der Makrophagen-Mannose-Rezeptor, die Scavenger-Rezeptoren, das membrangebundene CD14 (mCD14) und die Toll-like Rezeptoren (TLR)<sup>35;36</sup>. Durch die Bindung von Pathogenen an die Oberflächenrezeptoren der Phagozyten kommt es zur Phagozytose, Bildung von Entzündungsmediatoren und Antigen-Präsentation.

Bei der Phagozytose werden die Pathogene in Phagosomen und nach Fusion mit Lysosomen in Phagolysosomen innerhalb der Phagozyten eingeschlossen, in denen sie anschließend durch verschiedene Mechanismen wie Säurebildung, Lysozyme, Defensine, Proteasen und hochreaktive Sauerstoffradikale abgetötet werden.

Bei der Antigenpräsentation wirken neben den Makrophagen maßgeblich auch die dendritischen Zellen (DZ) mit. DZ gehören mit den Makrophagen und den B-Zellen zu den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wobei DZ als einzige APZ in der Lage sind, primäre Immunantworten zu generieren. Somit nehmen DZ eine Zwischenstellung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystems ein. DZ wandern in ihrer unreifen Form ins Gewebe, wo sie durch Phagozytose und Makropinozytose Pathogene aufnehmen. Dies bewirkt ihre Ausreifung und anschließende Migration in Lymphknoten. Dort präsentieren sie das Antigen über MHC-Moleküle an naive T-Zellen, die für dieses Antigen den spezifischen T-Zellrezeptor besitzen, und leiten so die adaptive Immunantwort ein<sup>36</sup>.

Bei der Erkennung von Pathogenen mit anschließender Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems spielen die Toll-like Rezeptoren eine tragende Rolle. Kürzlich wurden Studien veröffentlicht, die eine Expression der TLR auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems zeigen. Somit könnten TLR auch direkt an Prozessen des adaptiven Immunsystems beteiligt sein<sup>34</sup>.

## **1.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems – Toll-like Rezeptoren und CD14**

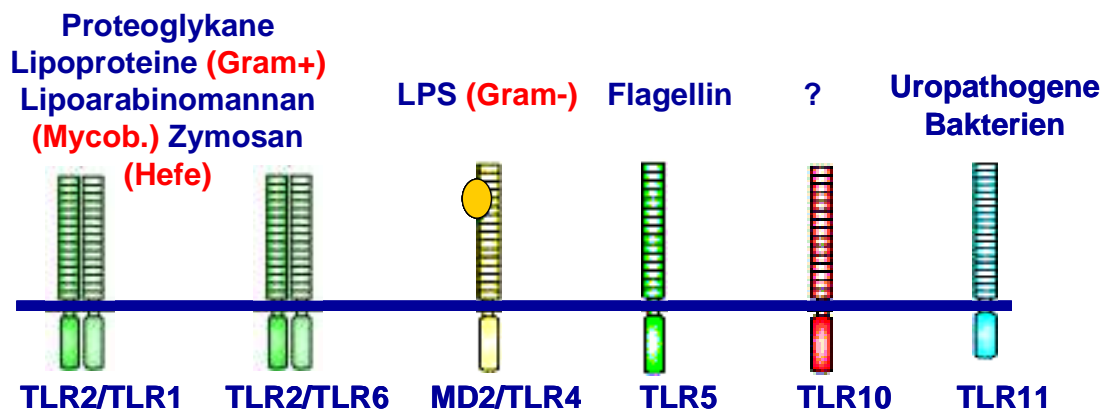
Der erste Toll-like Rezeptor (TLR) wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo er vor allem in der antifungalen Abwehr von Bedeutung ist<sup>35;74;85</sup>. 1997 entdeckten Medzhitov et al einen homologen Rezeptor im Menschen, der durch Bildung von inflammatorischen Zytokinen das adaptive Immunsystem aktivieren konnte. Poltorak et al fanden eine Resistenz in einer bestimmten Mausmutante, C3H/HeJ, gegen das Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien. Genetische Untersuchungen zeigten in diesem Mausstamm eine Punktmutation im Gen für den Rezeptor, der an der Erkennung des LPS beteiligt ist - heute als TLR4 bekannt<sup>35;85</sup>. Insgesamt sind bislang zehn aktive humane TLR beschrieben. Sie werden von diversen Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, beispielsweise von DZ, Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen, Neutrophilen und Endothelzellen<sup>65;69</sup>, aber auch von B- und T-Zellen des adaptiven Immunsystems<sup>34;84</sup>. TLR erkennen eine Vielzahl an Pathogenen anhand ihrer sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP – pathogen-associated molecular pattern), wobei jeder TLR für ihn spezifische PAMP erkennt<sup>85</sup>. TLR1, 2, 4, 5 und 6 werden an der Zelloberfläche exprimiert und haben sich vor allem auf die Erkennung bakterieller Pathogene spezialisiert. TLR3, 7, 8 und 9 sind intrazellulär lokalisiert und detektieren vor allem virale Pathogene<sup>34</sup>. Einige TLR sind sowohl intrazellulär wie auch an der Zelloberfläche vorhanden, beispielsweise TLR4<sup>101</sup>, TLR3<sup>51</sup> oder TLR2<sup>85</sup>. TLR sind transmembranöse Rezeptoren, deren cytoplasmatischer Anteil dem des Interleukin 1-Rezeptors sehr ähnelt, weshalb dieser auch Toll/ IL-1 Rezeptor-Domäne (TIR) genannt wird. Der extrazelluläre Anteil der Rezeptoren besteht in Leucin-reichen Wiederholungen. Tabelle 1.1 und Abb. 1.1 fassen eine Zuordnung einiger dieser Pathogene für die einzelnen TLR zusammen.

Tab. 1.1 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (Auswahl)

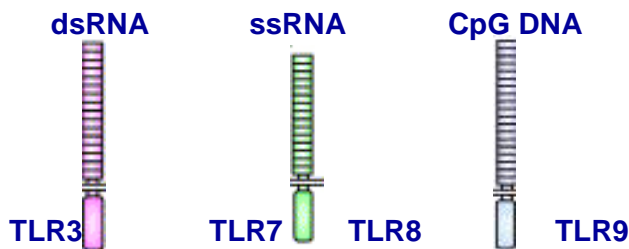
Rezeptoren	Ligand
TLR2 mit TLR1 oder TLR6	Der f, LPS von <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Helicobacter pylori</i> Grampositive Bakterien: Lipoprotein /-peptid, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure
TLR3	doppelsträngige (ds)RNA und Viren
TLR4	Lipopolysaccharid, Der p, Taxol, Hitzeschockproteine 60 und 70, RS-Virus
TLR5	Flagellin
TLR7	einsträngige RNA von Viren (z.B. HIV, Influenza Viren), Imiquimod
TLR8	einsträngige RNA von Viren (z.B. HIV, Influenza Viren), Imiquimod
TLR9	Unmethyliertes CpG-Motive von Bakterien und Viren (z.B. Cytomegalievirus)
TLR10	noch nicht sicher bekannt
TLR11	Uropathogene Bakterien

Abb. 1.1 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (Auswahl)

Extrazelluläre Pathogene



Intrazelluläre Pathogene

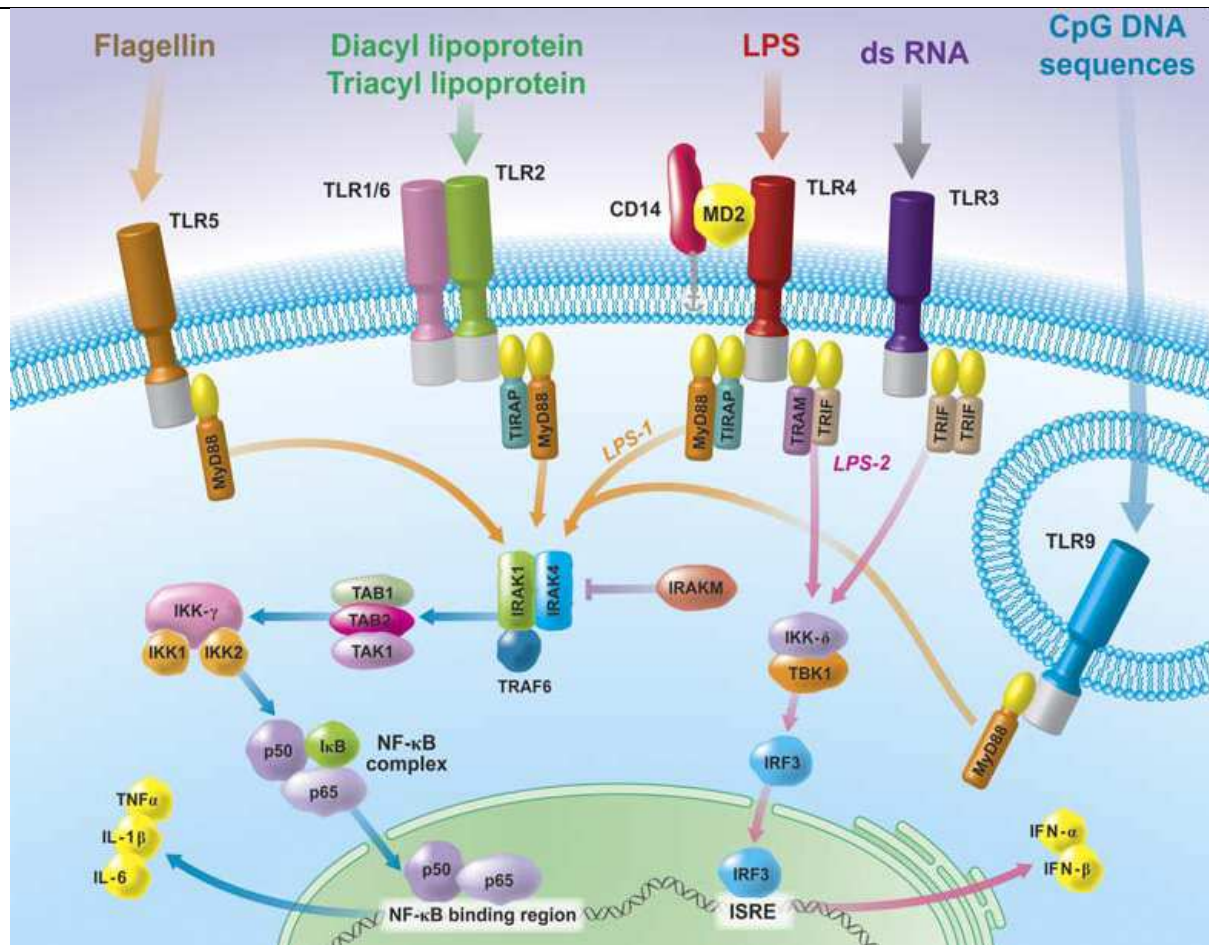


Darstellung von Liganden der TLR. In der oberen Reihe sind extrazelluläre, in der unteren Reihe intrazelluläre Liganden aufgezeigt.

Für die intrazelluläre Signalübertragung bilden TLR Dimere. TLR2 bildet mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere, während TLR4 sich typischerweise zu Homodimeren zusammenfügen<sup>74</sup>.

Über Adaptermoleküle, wie der Myeloid-Differenzierungs-Faktor 88 (MyD88) oder das TIR-Domäne enthaltende Adapterprotein (TIRAP), und Enzyme, die auch vom Signalweg des IL-1-Rezeptors benützt werden wie die IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase 4 (IRAK4), kommt es letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor (NF)- $\kappa$ B. Diese bewirkt eine gesteigerte Transkription proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 oder Tumornekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$ .

TLR4 benötigt neben der Anlagerung eines weiteren TLR4-Moleküls noch weitere Membranproteine, CD14 und MD-2. Neben dem oben beschriebenen Signalweg über MyD88 kann TLR4 auch einen alternativen Signalweg über den Toll-Rezeptor assoziierten Aktivator von Interferon (TRIF) oder das Toll-Rezeptor assoziierte Molekül (TRAM) induzieren, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Interferon-regulierender Faktor (IRF3) mit Bildung von Typ I Interferonen (INF- $\alpha$ , INF $\beta$ ) führt<sup>51</sup>. In Abhängigkeit von der TLR-exprimierenden Zelle, dem Gewebe, dem Pathogen, der Dosis des Pathogens und der Affinität der beteiligten Rezeptoren zu dem Pathogen differiert der aktivierte Signalweg<sup>34;65</sup>. Ein Überblick der Signalwege der TLR ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



CD14 kommt membrangebunden auf Zellen (mCD14) sowie in gelöster Form im Blutplasma (sCD14) vor und ist an der Erkennung von bakteriellem Lipopolysaccharid sowie anderen bakteriellen Bestandteilen und dem RS-Virus beteiligt<sup>101</sup>. Da CD14 auch in seiner membrangebundenen Form keinen intrazellulären Anteil besitzt, benötigt es einen zusätzlichen Rezeptor zu intrazellulären Signaltransduktion. Sowohl das mCD14 als auch das sCD14 binden dafür zusammen mit MD-2 an TLR4. CD14 scheint vor allem bei niedrigen Konzentrationen von Pathogenen eine wichtige Rolle für TLR2 und TLR4 zu spielen<sup>92</sup>. Die lösliche Form sCD14 unterstützt zudem die Aktivierung von Zellen, die CD14 nicht an ihrer Oberfläche exprimieren, wie zum Beispiel dendritische Zellen oder Epithelzellen<sup>37</sup>.

### 1.3 Toll-like Rezeptoren und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems

Für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems gegenüber einem Neo-Antigen mit konsekutiver Reifung und Differenzierung der Lymphozyten sind professionelle APZ wie DZ

notwendig. Nach Erkennung der Pathogene durch TLR kommt es zur Internalisierung der Pathogene, bei der TLR zwar eine wichtige Rolle spielen, aber nicht die aufnehmenden Rezeptoren selbst sind. Am Beispiel von Lipopolysaccharid und TLR4 wurde vielmehr gezeigt, dass es sich bei den internalisierenden Rezeptoren eher um den Co-Rezeptor CD14 handeln könnte<sup>5</sup>. Über TLR-abhängige Signalwege werden verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und IRF3 aktiviert, was letztendlich die Ausreifung der DZ bewirkt. Dabei wandern DZ in die lokalen Lymphknoten, um dort naive T-Helferzellen zu aktivieren. Hierfür wandeln sie pathogenabhängige Informationen in ein Signal um, das aus drei Komponenten besteht: 1) Dauer und Affinität der Antigenpräsentation, 2) Kostimulierende Moleküle wie CD80 und CD86, die auf DZ exprimiert werden, und ihrer Interaktion mit Liganden auf T-Zellen und 3) Zytokine. Kommt es zur Präsentation mit hoher Affinität und zur Bildung von IL-12 und INF- $\gamma$ , führt dies vorwiegend zu einer Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Lymphozyten. Umgekehrt bevorzugt die Präsentation mit niedriger Affinität und Bildung von IL-4 und IL-5 eine T<sub>H</sub>2-Lymphozytendifferenzierung<sup>36</sup>. Zumeist resultiert das Zusammenspiel der Pathogene und aller TLR in einer Differenzierung zu proinflammatorischen T<sub>H</sub>1-Lymphozyten<sup>34;65;74</sup>. Durch nachfolgende Aktivierung von B-Lymphozyten kommt es zur Bildung von vorwiegend IgG-Antikörpern<sup>18</sup>. Allerdings können sich die T-Lymphozyten nach Aktivierung der TLR-Signalwege auch zu T<sub>H</sub>2-Lymphozyten differenzieren<sup>34;65;74</sup> mit nachfolgender Bildung von IgE-Antikörpern und gegebenenfalls mit Entstehung atopischer Erkrankungen<sup>18</sup>.

#### **1.4 Die Hygiene-Hypothese – Pathogene und die Entwicklung von atopischen Erkrankungen**

In den letzten zwei bis drei Dekaden wurde in den Industrienationen eine erhöhte Prävalenz für atopische Erkrankungen wie das atopische Ekzem, die allergische Rhinokonjunktivitis oder das allergische Asthma bronchiale beobachtet<sup>4;5;16;102</sup>. Atopische Erkrankungen sind charakterisiert durch eine Verschiebung der Immunantwort mit bevorzugter Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Lymphozyten begleitet von einer erhöhten Bildung von IL-4, IL-5 und IL-13. Dieses wiederum führt zu einer erhöhten Sekretion von Immunglobulinen IgE im Blutserum und zu einer Eosinophilie<sup>39;58;96</sup>. Ein Erklärungsmodell für die erhöhte Prävalenz atopischer Erkrankungen liefert die „Hygiene-Hypothese“: 1989 stellte Strachan eine niedrigere Häufigkeit allergischer Rhinokonjunktividen und atopischen Ekzemen bei jüngeren Geschwistern aus großen Familien fest. Es wurde vermutet, dass jüngere Geschwister durch

Kontakt zu den älteren Geschwistern bereits in jüngerem Alter Infektionen durchmachen, und somit vor Allergien geschützt sind<sup>96</sup>. Umweltfaktoren dieserart scheinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Immunsystems spielen<sup>5</sup>. Mit zunehmendem Wohlstand in den Industrienationen und dem wachsenden Hygienebewusstsein nimmt die Exposition des Immunsystems zu mikrobiellen Pathogenen ab. Diese verringerte Exposition zu Mikroben in der Kindheit<sup>3;11;20;26;58</sup> bzw. bereits *in utero*<sup>5;10;18;29;37</sup> ist nach der Hygiene-Hypothese ein maßgeblicher Grund für die Entstehung von atopischen Erkrankungen.

Die Immunantwort des Neugeborenen ist im Vergleich zu älteren Kindern physiologischerweise T<sub>H</sub>2-lastig<sup>37;48</sup>. Bei Kindern, die später eine Allergie entwickelten, wurde eine verzögerte Ausreifung des T<sub>H</sub>1-Arms der Immunantwort gezeigt<sup>64</sup>. Mikroben rufen in der Regel eine T<sub>H</sub>1-Immunantwort hervor. Frühkindlicher oder sogar *in utero* stattfindender Kontakt zu Mikroben könnte daher die Ausreifung der T<sub>H</sub>1-Immunantwort fördern<sup>18;37</sup>. Mehrere Studien zeigen den Zusammenhang zwischen mikrobiellen Pathogenen und der Entwicklung von atopischen Erkrankungen<sup>3;5;10;11;18;20;25;29;58</sup>. Anfänglich wurde angenommen, dass manifeste frühkindliche Infektionen für die Entwicklung des Immunsystems notwendig seien, um der Entwicklung atopischer Erkrankungen vorzubeugen<sup>96</sup>. Neuere Studien lassen vermuten, dass hierfür die Exposition zu Mikroben auch ohne manifeste Infektion ausreichen kann<sup>11;26</sup>.

Kinder, die auf Bauernhöfen aufgewachsen sind, entwickelten seltener atopische Erkrankungen als Kinder, die nicht auf landwirtschaftlichen Betrieben aufwuchsen<sup>3;11;18;30</sup>. Aber auch Kinder, die zwar nicht auf einer Farm aufgewachsen sind, aber regelmäßigen Kontakt zu Stallvieh hatten, wiesen ein niedrigeres Risiko auf, eine atopische Erkrankung zu entwickeln<sup>67</sup>. Möglicherweise basiert der protektive Effekt, der in diesen Studien gezeigt wurde, auf der Vielzahl und den hohen Konzentrationen von mikrobiellen Pathogenen. Eine Assoziation der Entwicklung atopischer Erkrankungen oder Symptomen solcher Erkrankungen konnte mit Endotoxinniveaus<sup>11;15;26;61</sup> und Allergenen der Hausstaubmilbe wie Der p1 und Der f1<sup>82</sup> beobachtet werden. So konnten Braun-Fahrlander et al eine negative Assoziation zwischen Endotoxingehalt in Matratzenstaub, und antigenspezifischem IgE, allergischer Rhinokonjunktivitis und atopischem Asthma zeigen<sup>11</sup>. Gehring et al beobachteten zwar ebenfalls eine negative Assoziation zwischen Endotoxingehalt in Fußbodenstaub und antigenspezifischem IgE, jedoch erreichte der Zusammenhang zwischen Endotoxin und atopischen Symptomen keine statistische Signifikanz<sup>26</sup>. Schram-Bijkerk et al fanden eine



glockenförmige Assoziation zwischen Allergenniveau von Hausstaubmilben, Der p1 und Der f1, und antigenspezifischem IgE – bei niedriger und hoher Konzentration der Allergene war das gemessene IgE niedriger als bei mittlerer Allergenkonzentration<sup>82</sup>. Neben ihrer Rolle als Pathogene misst man Allergenen und Endotoxinen heute eine wichtige Bedeutung als Immunmodulatoren in der Kindheit<sup>102</sup>, wahrscheinlich aber auch bereits in der Fetalzeit, zu. Ebenso scheint der Zeitpunkt der Exposition eine maßgebliche Rolle zu spielen<sup>18;80</sup>.

## 1.5 Pathogene, Toll-like Rezeptoren und atopische Erkrankungen

Wie im Kapitel 1.3 bereits beschrieben, werden Pathogene unter anderem von Toll-like Rezeptoren erkannt. Je nach Pathogen und Pathogendosis variiert die Signalübertragung. So aktivieren niedrige LPS-Konzentrationen den MyD88-unabhängigen Signalweg, der zu einer T<sub>H</sub>2-gewichteten Immunantwort führt, während hohe LPS-Konzentrationen den MyD88-abhängigen Signalweg mit nachfolgender T<sub>H</sub>1-Immunantwort induzieren<sup>19;31</sup>. Die Erkennung von LPS über den TLR4-Komplex scheint allerdings überwiegend eine MyD88-abhängige Signalisierung mit anschließender Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und einer T<sub>H</sub>1-gewichteten Immunantwort zu bevorzugen - verdeutlicht an Studien *in vitro*<sup>1;69</sup> und *in vivo*<sup>14</sup>.

TLR2 erkennt, wie in Tab. 1.1 verdeutlicht, eine Vielzahl an Pathogenen. Der Einfluss von TLR2 auf die Differenzierung naiver T-Lymphozyten ist umstritten. So zeigten Re et al *in vitro*, dass die Aktivierung von dendritischen Zellen durch verschiedene TLR2-Liganden wie Peptidoglykan (Ppg) von Staphylococci aurei, Zymosan und das Lipopeptid Pam3Cys von Escherichia coli zu einer Bildung von IL-10, das seinerseits die IL-12-Produktion hemmte und somit eine T<sub>H</sub>2-gewichtete Immunantwort auslöste<sup>68;69</sup>. Auch Agrawal et al, Dillon et al und Redecke et al beschrieben eine T<sub>H</sub>2-gewichtete Immunantwort nach Stimulation von dendritischen Zellen mit dem TLR2-Liganden Pam<sub>3</sub>Cys *in vitro*<sup>1</sup> und *in vivo*<sup>14;70</sup>, während Patel et al eine T<sub>H</sub>1-gewichtete Immunantwort nach Injektion des Lipopeptids Pam<sub>3</sub>CSK4 in Mäusen beobachteten<sup>60</sup>. Schaub et al stellten eine dosis- und zeitabhängige Reaktion nach Stimulation von mononukleären Zellen in Nabelschnur- und peripheren Blut mit dem TLR2-Liganden Ppg fest, wobei die mononukleären Zellen bei einer mittelhohen Dosis und nach 72 Stunden der Stimulation die höchsten Konzentrationen sowohl von IL-13 (T<sub>H</sub>2) als auch INF- $\gamma$  (T<sub>H</sub>1) sezernierten. Die Autoren untersuchten außerdem die Sekretion der beiden Zytokine

nach Stimulation der mononukleären Zellen mit dem TLR4-Liganden Lipid A (LpA). Hier ergab sich keine Abhängigkeit von Dosis und Zeit<sup>78</sup>.

Aufgrund der Beobachtung, dass TLR die Fähigkeit zur Immunomodulation besitzen, und der Annahme, dass atopische Erkrankungen aufgrund eines Ungleichgewichts der Immunantwort durch T<sub>H</sub>1- / T<sub>H</sub>2-Lymphozyten entstehen, wurde eine Assoziation für die Prävalenz von atopischen Erkrankungen mit den Toll-like Rezeptoren vermutet. An Tiermodellen konnte sowohl nach Gabe von TLR4-Liganden<sup>19;71;72;91</sup> als auch von TLR2-Liganden<sup>60;71;91</sup> eine Besserung der allergischen Reaktionen beobachtet werden. Rodríguez et al zeigten, dass die suppressive Wirkung der TLR4-Liganden auf die allergische Reaktion unabhängig von der Bildung proinflammatorischer Zytokine war<sup>72</sup>. Umgekehrt berichteten Redecke et al ebenfalls an einem Tiermodell, dass die Stimulation von TLR2 durch Pam<sub>3</sub>Cys asthmatische Reaktionen verstärkte<sup>70</sup>.

In großen europaweiten Studien wurden signifikant höhere mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2<sup>44</sup> und zusätzlich TLR4<sup>18</sup> in Blutproben von Kindern, die auf Bauernhöfen aufgewachsen sind, gemessen. Bei diesen Studien konnte auch gezeigt werden, dass diese Kinder eine geringere Prävalenz für atopische Erkrankungen aufwiesen<sup>18;44</sup>. Als protektive Faktoren für diese Kinder vermuteten die Autoren den Verzehr von Kuhmilch, regelmäßigen Kontakt zu Stalltieren und die Stalltätigkeit der Mutter während der Schwangerschaft<sup>18</sup>. *In vitro*-Studien konnten bei Allergikern durch Stimulation von Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems einen antiallergischen Effekt von TLR2 und ihren Liganden feststellen<sup>87</sup>, wobei sich bei einer Studie gleichzeitig das T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2-Verhältnis von einer T<sub>H</sub>2- zu einer T<sub>H</sub>1-gewichteten Immunantwort wendete<sup>94</sup>. Tulic et al stimulierten *in-vitro* Nasenschleimhautbiopsien mit Allergenen und LPS. Dabei konnte bei allergischen Kindern eine verminderte Produktion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen und eine erhöhte Produktion von T<sub>H</sub>1-Zytokinen nach Aktivierung von TLR4 gezeigt werden<sup>88</sup>. Fransson et al untersuchten ebenfalls Nasenschleimhautproben von erwachsenen Allergikern vor und nach *in vivo*-Stimulation der Probanden mit Allergenen. Dabei beobachteten sie eine Hochregulierung von TLR2 und TLR4 nach Allergenexposition<sup>25</sup>.

## 1.6 Einzelnukleotid-Polymorphismen – Interaktionen von Genen und Umwelt

Mehrere Studien untersuchten sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen. Bei SNP ist ein einzelnes Nukleotid in einem kodierenden Gen durch ein anderes Nukleotid ersetzt, was meist die Aminosäuresequenz und die Funktion des Proteins verändert. Bisher veröffentlichte Studien haben verschiedene SNP untersucht und sie in Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen gesetzt, jedoch sind die Aussagen wie im folgenden dargestellt sehr widersprüchlich.

Studien über das CD14-Gen auf Chromosom 5q31 haben sich vor allem mit dem SNP im Promotor des CD14-Gens an der Nukleotidposition 159 im Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen befasst. Baldini et al beobachteten höhere sCD14- und erniedrigte Serum-IgE-Konzentrationen sowie weniger positive Prick-Testungen bei atopisch erkrankten Kindern mit dem Genotypen TT im Vergleich zu den Genotypen CC und CT<sup>9</sup>. Dieses wurde in weiteren Studien bestätigt, in denen der Genotyp CC mit erhöhten IgE-Spiegeln<sup>45;75</sup> oder positiven Prick-Testungen<sup>40</sup> assoziiert war. Es bestanden jedoch keine signifikanten Assoziationen mit manifesten klinischen Symptomen atopischer Erkrankungen. Das Risiko für die Entwicklung eines atopischen Ekzems und Serum-IgE-Konzentrationen waren bei zweijährigen Kindern in einer Studie mit dem homozygoten Genotyp -159 CC erhöht<sup>49</sup>. Eine longitudinale Studie in Australien verfolgte die Entwicklung von Kindern von ihrem 8. bis zum 25. Lebensjahr. Auch hier war der homozygote Genotyp -159 CC mit erhöhten IgE-Konzentrationen, positiven Prick-Testungen und erhöhtem Risiko für early-onset-Atopie und bronchialer Hyperreaktivität assoziiert. Die Assoziation mit Atopie konnte bis zum 18. jedoch nicht mehr im 25. Lebensjahr festgestellt werden<sup>58</sup>. LeVan et al erkannten eine erhöhte Transkriptionsaktivität des CD14-Gens, da durch das T-Allel an der Nukleotidposition 159 eine niedrigere Affinität der DNA zum Sp3-Protein vorliegt. Sp3 inhibiert durch Bindung an Promotergene die Gentranskription<sup>46</sup>. Vercelli et al beobachteten bei Homozygoten -159 CC, -1359 TT und -1145 AA die höchsten Serum-IgE- und die niedrigsten sCD14-Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Genotypen<sup>93</sup>. Tan et al konnten bei der Untersuchung derselben SNP die negative Assoziation der sCD14-Konzentrationen zum Serum-IgE allerdings nur für den -1359 TT-Genotyp darstellen<sup>86</sup>. Woo et al stellten hingegen eine Assoziation des -159TT-Genotypen mit vermehrtem Auftreten von nichtatopischem Asthma und Nahrungsmittelallergien fest<sup>98</sup>. Andere Studien fanden keine Assoziationen zwischen Serum-IgE, sCD14-Konzentrationen oder atopischen Erkrankungen mit Genotypen für SNP in

verschiedenen Nukleotidpositionen<sup>33;83</sup>. Eine kürzlich erschienene Studie im Rahmen des Allergie-und-Endotoxin-Studienteams (ALEX) zeigte den Zusammenhang von Umweltfaktoren und Genotypen des SNP -159 bei Kindern. Eine hohe Endotoxinexposition war mit den Serum-IgE-Konzentrationen in den Genotypen -159 CC / CT / TT assoziiert, wobei die Konzentration des Serum-IgE in der Reihenfolge -159 CC > CT > TT abnahm. Die Autoren fragten sich außerdem, ob eine Relation zu Tierkontakten bestand. Es konnte keine Assoziation zwischen Endotoxinexposition und Tierkontakten mit Serum-IgE gefunden werden. Jedoch zeigten Kinder mit Haustieren wiederum eine Abnahme der Serum-IgE-Konzentrationen nach dem Muster -159 CC > CT > TT, wohingegen der regelmäßige Kontakt zu Stalltieren umgekehrt assoziiert war mit dem Serum-IgE in der Reihenfolge -159 TT > CT > CC<sup>17</sup>.

Das Gen für TLR2 ist auf Chromosom 4 lokalisiert. Im Rahmen der ALEX-Studie zeigten Eder et al bei Kindern von Bauernhöfen, dass Träger des T-Allels in Position -16934 eine niedrigere Prävalenz für Asthma, allergische Rhinitis und atopische Sensibilisierung hatten als homozygote -16934 AA-Genotypen<sup>16</sup>. Ahmad-Nejad et al beobachteten eine höhere Prävalenz von atopischem Ekzem bei erwachsenen Probanden, die einen SNP im TLR2-Gen mit nachfolgendem Aminosäureaustausch Arg-753→Gln aufweisen<sup>2</sup>. Eine weitere Studie stellte bei japanischen Kindern hingegen keine Assoziation zwischen SNP im TLR2-Gen und atopischen Erkrankungen fest<sup>57</sup>.

TLR4 ist auf Chromosom 9 kodiert. Der SNP im TLR4-Gen an Nukleotidposition 896 mit Austausch in der Aminosäuresequenz von Asp-299→Gly war mit einer Hyporeaktivität<sup>6</sup> und einem geringeren Anstieg von Entzündungswerten im Blut<sup>55</sup> nach Stimulation mit LPS assoziiert. Eine andere Studie mit LPS-Stimulation beobachtete in diesem Zusammenhang ein erhöhtes Risiko für atopisches Asthma bei erniedrigter IL-12-Produktion<sup>22</sup>. Yang et al konnten zwar für denselben SNP keine Assoziation mit der Entstehung von Asthma beobachten, jedoch waren die allergische Sensibilisierung und die Positivität auf Prick-Testungen bei Gly-Allel-Träger stärker ausgeprägt<sup>100</sup>. Dazu steht eine andere Studie in Widerspruch, die den Polymorphismus Asp-299→Gly häufiger bei Probanden mit mildem atopischen Asthma fanden<sup>75</sup>. Dagegen konnten bei einer großen Studie an Kindern und deren Eltern aus Nordamerika keinerlei Assoziationen für fünf verschiedene SNP des TLR4-Genes mit atopischen Erkrankungen gezeigt werden<sup>66</sup>. Zwei weitere Studien untersuchten TLR4-Polymorphismen im Zusammenhang mit Endotoxinkonzentrationen. Bei hoher

Endotoxinexposition wiesen Kinder mit dem homozygoten Genotypen Gly / Gly in der Aminosäureposition 299 niedrigere antigenspezifische Serum-IgE-Konzentrationen auf, während sich der Effekt bei niedriger Endotoxinexposition genau ins Gegenteil kehrte<sup>16</sup>. Auch bei Erwachsenen erwiesen sich die TLR4-Polymorphismen Asp-299→Gly und Thr-399→Ile als protektive Faktoren in der Prävalenz für Asthma bei hohen Endotoxinkonzentrationen. Umgekehrt war auch hier eine niedrigere Endotoxinexposition ein Risikofaktor für die Entstehung von Asthma<sup>95</sup>.

## **1.7 Das Immunsystem des Neugeborenen, pränatale Exposition und atopische Erkrankungen**

Das Immunsystem des Neugeborenen unterscheidet sich von dem des Erwachsenen. Die Immunantwort des Neugeborenen auf Pathogene ist im hohen Maße zugunsten der T<sub>H</sub>2-Immunantwort ausgeprägt. Durch Aktivierung mit LPS oder bakteriellen Lipopeptiden bilden mononukleäre Zellen des neonatalen Immunsystems im Vergleich zum erwachsenen Immunsystem deutlich geringere Mengen an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder INF- $\gamma$ . Jedoch fällt die monozytäre Produktion von T<sub>H</sub>2-assoziierten Zytokinen wie IL-6, IL-8 und IL-10 nahezu gleich aus. Die basale Expression der Pathogen-erkennenden Rezeptoren an Zelloberflächen wie mCD14 und TLR4 ist bereits ähnlich hoch ausgebildet wie die des Erwachsenen. Hingegen beträgt das sCD14-Niveau bei Neugeborenen nur etwa 30 % des Erwachsenen<sup>48</sup>. Die sCD14-Konzentrationen im Blut nehmen im ersten Lebensjahr schnell zu. In einer Studie erreichten sie bereits im vierten Lebensmonat die Konzentrationen von Erwachsenen<sup>37</sup>. Im Zusammenhang mit Polymorphismen des CD14-Genes konnten LeVan et al bei Geburt noch keine Assoziation für die sCD14-Konzentrationen im Nabelschnurblut mit SNP des CD14-Genes erkennen, jedoch lag eine solche Assoziation signifikant ab dem vierten Lebensmonat vor, wobei der bereits oben genannte homozygote Genotype -159 CC mit erniedrigten sCD14-Konzentrationen einherging. Einerseits könnte hierfür der Einfluss von postnatalen Umweltfaktoren wie die Exposition zu Mikroorganismen auf die genetische Präposition des Neugeborenen ursächlich sein, andererseits könnten auch Einflüsse *in utero* eine Rolle spielen<sup>47</sup>. Dieses bestätigte die Beobachtung von Jones et al, die unabhängig von Polymorphismen keinen Unterschied der sCD14-Konzentrationen zwischen Kindern mit hohem und niedrigem Risiko für atopische Erkrankungen feststellten, wobei hier auch im Verlauf bis zum fünften Lebensjahr kein Unterschied gefunden wurde. Interessant war allerdings, dass die sCD14-Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit bei Kindern, die

später eine atopische Erkrankung entwickelten, niedriger waren. Die Autoren vermuteten daher in der geringeren Exposition des Foetus zu sCD14 über den Gastrointestinaltrakt einen möglichen pathogenetischen Faktor<sup>37</sup>.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie verdeutlichte die pränatalen Einflüsse auf das Immunsystem, indem sie die mütterliche Exposition zu Pathogenen während der Schwangerschaft mit der atopischen Sensibilisierung des Kindes in Beziehung setzte. Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft in Ställen gearbeitet haben, wiesen signifikant höhere mRNA-Expressionsniveaus von TLR2, TLR4 und CD14 bei niedrigeren antigenspezifischen IgE-Spiegeln im Blutserum auf. Zudem konnten sie eine altersabhängige Beziehung darstellen. Je früher im Leben der erste Kontakt zu Stallvieh stattfand, desto niedriger waren die antigenspezifischen IgE-Werte im Blutserum mit den niedrigsten Werten bei pränataler Exposition<sup>18</sup>. Eine weitere Studie, die einen Zusammenhang zwischen pränataler Exposition und den IgE-Spiegeln im Nabelschnurblut aufzeigte, bestimmte die Konzentration von Endotoxin und Allergenen in den Matratzen der schwangeren Mütter. Die Endotoxinkonzentration war wiederum negativ assoziiert mit den Serum-IgE-Niveaus, während es zu erhöhten IgE-Spiegeln bei hohen Konzentrationen des Katzenfellallergens Fel d1 und mittleren Konzentrationen der Milbenallergene Der p1 und Der f1 kam<sup>29</sup>. Schönberger et al beobachteten eine positive Assoziation der Gesamt-IgE-Spiegel drei bis fünf Tage alter Neugeborener und den Konzentrationen des Allergens der Hausstaubmilbe Der p1, die im Staub von den Fußböden und Matratzen der Mütter während der Schwangerschaft gemessen wurden<sup>81</sup>. An einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die pränatale Exposition zu LPS bei Mäusen postnatal die allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündungen verhindert<sup>10</sup>. Amnionflüssigkeit enthält auch ohne das Vorliegen einer Amnionitis Pathogene wie LPS<sup>21</sup>, was also nebst dem transplazentaren Weg eine weitere Möglichkeit der Exposition zu Mikroorganismen *in utero* darstellen könnte.

## 2. Zielsetzung

Die Hygiene-Hypothese stellt einen Versuch dar, die gestiegene Prävalenz für atopische Erkrankungen in den Industrienationen über die letzten Dekaden zu erklären. Seit der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLR) und seitdem ihre Bedeutung in der Entwicklung des Immunsystems sowie in der Immunregulation deutlich wurde, misst man ihnen eine wichtige Rolle in der Ätiologie von atopischen Erkrankungen bei. Es wird angenommen, dass sie als Rezeptoren für eine Vielzahl von Mikroorganismen das frühkindliche bzw. bereits das fetale Immunsystem modulieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Neugeborene von Müttern mit Typ I-Allergien ein Expressionsniveau von TLR2, TLR4 und CD14 aufweisen, das sich von Neugeborenen nicht-allergischer Mütter unterscheidet. Ferner vermuteten wir, dass das veränderte Immunsystem der Mütter auch die Entwicklung des Immunsystems ihrer Kinder beeinflusst.

Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir im Rahmen einer europäischen multizentrischen Studie, die sich mit dem Einfluss einer Fischölsupplementation während der Schwangerschaft auf mütterliche und fetale Plasmawerte von Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) befasste, das Expressionsniveau von TLR2, TLR4 und CD14 in mütterlichem Blut zum Entbindungszeitpunkt und Nabelschnurblut in einer randomisierten Population schwangerer Frauen mit und ohne Typ I-Allergien.

Wir stellten folgende Fragen auf:

- Ist die mütterliche Allergie assoziiert mit erniedrigten mRNA-Expressionsniveaus von TLR2, TLR4 und CD14?
- Beeinflusst die mütterliche Allergie die mRNA-Expression von TLR2, TLR4 und CD14 des Feten?
- Gibt es in diesem Zusammenhang Unterschiede je nach Nationalität?
- Gibt es in diesem Zusammenhang Unterschiede je nach ländlichem (Spanien), intermediärem (Deutschland) oder städtischem (Ungarn) Wohnraum?
- Gibt es in diesem Zusammenhang Unterschiede durch die Fischölsupplementation?

### **3. Probanden, Material und Methoden**

#### **3.1 Studiendesign und Probandinnen**

Die vorliegende Arbeit wurde als eigenständiges Projekt innerhalb der NUHEAL-Studie („**N**utraceutical for a **H**ealthier **L**ife“, EU FP5, CLK1-CT-1999-00888) durchgeführt. Bei der NUHEAL-Studie handelt es sich um eine doppelblind randomisierte, placebokontrollierte, multizentrische Studie, die den Einfluss einer Supplementation von Fischöl und Folsäure während der Schwangerschaft auf mütterliche und fetale Plasmawerte von DHA und EPA untersuchen sollte .

In die Studie wurden schwangere Frauen eingeschlossen, die sich zur pränatalen Routineuntersuchung in den Universitätskliniken von Granada (Spanien), Pecs (Ungarn) und München (Deutschland) vorstellten und sich zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie zwischen der 12. und 20. Schwangerschaftswoche befanden. Dabei sollte der Effekt einer Fischöl- und Folsäuresupplementation gemessen werden in einer Gruppe, die sich habituell von viel Fisch ernährt, folglich vermehrt DHA und EPA aufnimmt (Granada, Spanien), einer Gruppe, die eher selten Fisch, somit weniger DHA und EPA zu sich nimmt (Pecs, Ungarn), und einer mittleren Gruppe (München, Deutschland). Weitere Einschlusskriterien waren, dass die Frauen gesund waren, also keine chronischen Erkrankungen wie Diabetes, Hepatitis oder chronische Darmerkrankungen vorlagen, dass die Frauen die Absicht hatten, in den jeweiligen Kliniken zu entbinden, und keine Mehrlingsschwangerschaft vorlag. Es wurden Frauen in die Studie aufgenommen, deren Körpergewicht zwischen 50 kg und 92 kg betrug und die sich zwischen dem 18. und 42. Lebensjahr befanden. Ferner wurden Probandinnen ausgeschlossen, die unabhängig von dieser Studie nach der 16. Schwangerschaftswoche Fischölpräparate, Folsäure- oder Vitamin B<sub>12</sub>-Präparate als Nahrungsergänzungsmittel einnahmen. Die Probanden wurden durch eingewiesene Ärzte sorgfältig über die Studie, ihren Inhalt und ihr Ziel aufgeklärt. Nach Einholung des Einwilligungsbescideis wurden die Probanden in die Studie aufgenommen. Die Studie wurde von den jeweilig zuständigen Ethikkommissionen genehmigt.

Die Hauptfragestellung der NUHEAL-Studie war, ob ein Effekt durch die Supplementation von Fischöl und Folsäure während der Schwangerschaft auf die mütterlichen und fetalen Plasmawerte von DHA und EPA zu beobachten ist. Nebenzielkriterien waren mütterliche



Gewichtszunahme, mit Schwangerschaft und Entbindung zusammenhängende Parameter wie Proteinurie, Blutdruck, Eklampsie, Entbindungsart, Entbindungskomplikationen, Blutverlust und postnatale Depression bei Geburt und acht Wochen nach Geburt für die Probandinnen. Für die Neugeborenen wurden als Nebenzielkriterien der APGAR-Score, pH-Wert des Nabelschnurblutes, Geburtslänge und -gewicht erfasst. Außerdem wurde das Risiko der Kinder, an Allergien zu erkranken, untersucht, indem das Vorhandensein mütterlicher und väterlicher Allergien in die Analysen miteinbezogen wurde.

Die Probandinnen wurden im Zeitraum von November 2001 bis März 2003 rekrutiert. Insgesamt wurden 311 schwangere Frauen in die Studie aufgenommen und wurden in eine von vier Gruppen randomisiert. Sie erhielten ab der 22. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt täglich ein Nahrungsergänzungsmittel für Schwangere (Blemil plus, Laboratorios Ordesa, Barcelona, Spanien) verabreicht, welches je nach Zugehörigkeit der Gruppe 500 mg Docosahexaensäure (DHA) und 150 mg Eicosapentaensäure (EPA) (Pronova Biocare, Lysacker, Norwegen), 400 µg 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure (5-MTHF) (BASF, Ludwigshafen, Deutschland), DHA und EPA mit 5- MTHF oder keinen Zusatz (Placebogruppe) enthielt.

Für diese Studie eingewiesene Ärzte führten bei Aufnahme in die Studie und in der 30. Schwangerschaftswoche standardisierte Befragungen der Probanden durch, wobei gezielt nach Schwangerschaftsrisiken, Anzahl bisheriger Kinder, Vorliegen elterlicher atopischer Erkrankungen, Nikotingenuss, Haustieren, sozioökonomischer Situation der Eltern sowie der Wohngegend (städtisch oder ländlich) gefragt wurde. Bis zur und bei Entbindung wurden regelmäßig die Vitalparameter überprüft, Schwangerschaftskomplikationen dokumentiert und Entbindungsart und -kompliationen festgehalten. Daten des Neugeborenen umfassten Geburtslänge, Geburtsgewicht, Kopfumfang, APGAR-Score und eine postnatale körperliche Untersuchung. Im zweiten Lebensmonat füllten die Probandinnen einen standardisierten Fragebogen aus mit Fragen zu postnatalen Erkrankungen (ärztliche Diagnosen), Kinderarztbesuchen und mütterlicher Depression nach der Edinburgh-Skala für postnatale Depressionen.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Gewinnung und Lagerung der Proben**

Bei Entbindung wurden 2 ml Nabelschnurblut und 4 ml mütterliches Blut gewonnen. Die Blutproben wurden in Gefäße mit 10 vol TRIZOL LS Reagent (Invitrogen, Life Technologies) gegeben. Der Inhalt wurde kurz vermischt und anschließend bis zur mRNA-Extraktion bei -20°C aufbewahrt.

Bei 42 deutschen Probandinnen wurden zusätzlich 0,5 ml Nabelschnurblut gewonnen. Das Blut wurde mit EDTA antikoaguliert und binnen zwölf Stunden für die Durchflusszytometrie (siehe Kap. 3.2.4) weiterverarbeitet.

### **3.2.2 Aufbereitung der Proben**

#### **3.2.2.1 mRNA-Extraktion**

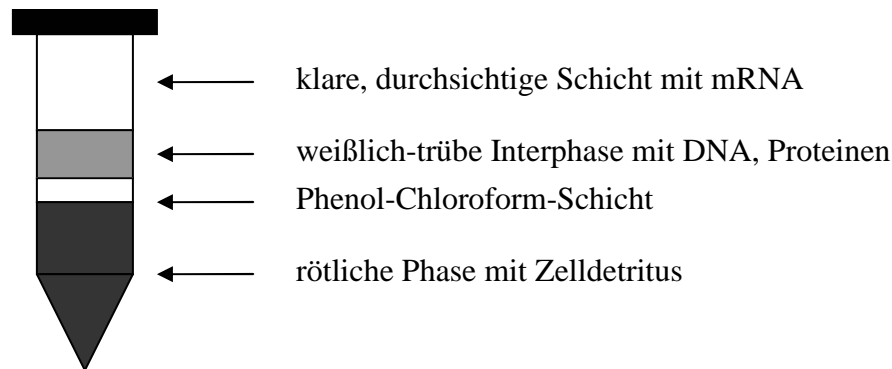
Die mRNA-Extraktion wurde wie vom Hersteller (Invitrogen, Life Technologies) angegeben durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Methode der Ein-Schritt-RNA-Extraktion mit Guanidium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform nach Chomczynski und Sacchi. TRIZOL LS ist eine Monophase-Lösung mit Phenol und Guanidin-Isothiozyanat, die nach Vermischung mit Blutproben oder anderen flüssigen Proben eine Zytolyse bewirkt ohne dabei die RNA-Struktur zu verändern. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation bilden sich eine organische und eine klare Phase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der klaren Phase und kann durch Präzipitation mit einem Isopropyl-Alkohol gewonnen werden.

Durchführung:

Die bei -20°C in TRIZOL LS aufbewahrten Blutproben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. 3 ml der Proben wurden in ein 15 ml-Plastikröhrchen (Falcon) umpipettiert und mit weiteren 5 ml TRIZOL LS Reagent gemischt, sodass ein Mischungsverhältnis TRIZOL LS Reagent zum Blut von 3:1 vorlag. Nach sorgfältigem Mischen mit dem Vortex-Gerät und einer weiteren Inkubationszeit von 5-10 Minuten bei Raumtemperatur wurden 2 ml Chloroform hinzugegeben. Die Röhrchen wurden fest verschlossen und für 15 Sekunden mit

der Hand geschüttelt. Darauf folgte eine weitere Inkubationszeit von 15-20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und bei 12.000\*g über 25 Minuten zentrifugiert. Dabei entstanden folgende Schichten:

Abb. 3.1 Schichten nach Ultrazentrifuge



Die oberste, mRNA-haltige Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und zu je 1.000 µl auf Safe-Lock Reaktionsgefäße (2 ml) verteilt. Zumeist konnten 2.000-4.000 µl abpipettiert werden, folglich also mit 2-4 Reaktionsgefäßen pro zentrifugiertem Röhrchen weitergearbeitet werden. In jedes Safe-Lock Reaktionsgefäß wurden weitere 1.000 µl einer 100 %-igen Isopropyl-Alkohollösung gegeben, mit dem Vortex-Genie 2 gut gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 4°C und 10.000\*g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war am Boden, z.T. auch an der Seitenwand, des Reaktionsgefäßes ein mRNA-Pellet zu sehen.

Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das mRNA-Pellet mit 2 ml 75%-iger Ethanollösung gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (4°C, 7.500\*g, 5 Minuten) wurde die Flüssigkeit abgekippt und das Pellet kurz an der Luft angetrocknet. Abschließend wurden 20 µl RNase-freies DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H<sub>2</sub>O auf das Pellet gegeben und das Pellet durch sorgfältiges Mischen aufgelöst. Die Konzentration von mRNA wurde über das A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>-Verhältnis im Photometer bestimmt:

$$C (\mu\text{g} / \text{ml}) = A_{260} / 0,025$$

(C = RNA-Konzentration; A<sub>260</sub>=Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 260 nm)

Die RNA-Präparation galt als hoch gereinigt, wenn ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,9 - 2,0 vorlag. Pro Extraktion wurden 1-5  $\mu\text{g}$  RNA/ ml Blut gewonnen. Die Reaktionsgefäße wurden bis zur cDNA-Synthese auf Trockeneis gelegt oder bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### 3.2.2.2 cDNA-Synthese

Die komplementäre DNA (cDNA) ist die einzel- oder doppelsträngige Kopie eines RNA-Moleküls, das durch reverse Transkription dieses RNA-Moleküls gebildet wird. Im Gegensatz zur genomischen DNA besteht die cDNA ausschließlich aus Exons. Bei der reversen Transkription wird mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (in der vorliegenden Arbeit Superscript II RT (Invitrogen, Life technologies)) mit dem RNA-Molekül als Matritze initial ein RNA/ DNA-Hybridmolekül hergestellt. Dabei benötigt die DNA-Polymerase kurze, doppelsträngige Nukleinsäuresequenzen, welche sich durch das zufällige Anbinden von Hexanukleotiden an das RNA-Molekül bilden. Durch die sich anschließende Polymerase Kettenreaktion entstehen aus den RNA/ DNA-Hybridmolekülen cDNA-Doppelstränge.

Durchführung:

Der gesamte Ansatz zur cDNA-Synthese wurde auf Eis durchgeführt. Zur reversen Transkription von mRNA zur cDNA verwendeten wir 1  $\mu\text{g}$  mRNA. Das Gesamtvolumen eines fertigen cDNA-Ansatzes betrug 50  $\mu\text{l}$  und setzte sich wie folgt zusammen:

20 $\mu\text{l}$	mRNA in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ gelöst
10 $\mu\text{l}$	5xBuffer
5 $\mu\text{l}$	DTT (0,1 M)
5 $\mu\text{l}$	dNTP (10 mM)
5 $\mu\text{l}$	randomisierte Hexamer-Primer
2 $\mu\text{l}$	Superscript II RT
2 $\mu\text{l}$	RNase-freies $\text{H}_2\text{O}$
1 $\mu\text{l}$	RNAsin

Abschließend wurden die fertig angesetzten Reaktionsgefäße in das cDNA-Synthese-Gerät eingeführt, um somit die cDNA-Synthese zu komplettieren.

Anschließend wurden die cDNA-Proben bis zur Weiterverarbeitung für die Real-time RT-PCR bei -20°C aufbewahrt.

Um Kontaminationen mit genomischer DNA während der RNA-Extraktion auszuschließen, fertigten wir Kontrollen bei der cDNA-Synthese an, in die wir keine reverse Transkriptase hinzugaben (RT-negativ-Kontrolle - s. Kap. 3.2.3.4.4).

### **3.2.3 Real-time reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren, bei dem durch drei sich zyklisch wiederholende Phasen doppelsträngige DNA-Abschnitte vervielfacht werden. Die PCR beginnt mit der Denaturierungs-Phase, bei der zunächst durch Erhitzen auf 90-95°C die DNA-Doppelstränge in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt werden. Darauf folgt die Annealing-Phase, bei der sich nach Abkühlen auf i.d.R. 50-60°C Primer an die Einzelstränge binden können. Bei der Extensions-Phase wird eine Temperatur eingestellt, bei der die DNA-Polymerase ihre höchste Aktivität aufweist (in der vorliegenden Arbeit Superscript II RT (Invitrogen, Life technologies) – zwischen 37°C und 50°C) und somit die mit Primern besetzten Stränge zu Doppelsträngen ergänzen kann. Durch Wiederholung dieser Phasen wird eine exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA erreicht.

Der grundlegende Vorteil der Real-Time RT-PCR gegenüber der konventionellen PCR ist die Möglichkeit einer quantitativen Messung des PCR-Produktes, um somit Rückschlüsse über die Ausgangsmenge der zu untersuchenden cDNA ziehen zu können. Dieses ist möglich, da der PCR-Vorgang und die Detektion des Amplifikats durchgehend „on-line“ aufgezeichnet werden. In der vorliegenden Arbeit kam das System iCycler iQ (Biorad) zur Anwendung. Es wurden die oben genannten PCR-Phasen (Denaturierung bei 93°C über 30 s, Annealing bei 55°C über 30 s, Extension bei 72°C über 45 s) über 43 Zyklen im iCycler durchlaufen. Zur Detektion des Amplifikats wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem SYBR Green IQ Supermix (Biorad) gearbeitet, welches auf der SYBR-Green-I-Methode basiert. Dabei wird das spezifische Fluoreszenzverhalten des SYBR Green I genutzt, welches eine Exzitationswellenlänge von 490 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm hat. Das SYBR Green I ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, dessen Eigenfluoreszenz bei seiner Bindung an doppelsträngige Nukleinsäuren um ein Vielfaches ansteigt. Diese Veränderung kann der iCycler nach jedem PCR-Zyklus detektieren und aufzeichnen. An jedem Zyklusende wird hierfür eine Detektions-Phase angeschlossen, bei der die Fluoreszenz in den

Reaktionsansätzen gemessen wird. Beim iCycler iQ können auf einer 96-well-Platte (Biorad) für jeden der 96 Reaktionsansätze gleichzeitig bis zu vier Fluoreszenzen detektiert werden.

### 3.2.3.1 Primer und das Haushaltsgen

Alle Primer und Sonden, die in der vorliegenden Arbeit benutzt worden sind, wurden mit der Primer Premier 5-Software (PREMIER Biosoft International) entworfen. Dabei sollten insbesondere Primer-Dimer, selbst-primende Sequenzen und Fehlprimen vermieden werden. Die Fertigstellung der Primer erfolgte durch TIB MOLBIOL. Die Primer waren ferner Intron-überspannend bzw. banden sich spezifisch an die Exon-Exon-Grenzen, um die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von genomischer DNA möglichst gering zu halten. Für die Optimierung der Primer wurden Gradienten-Cyclerläufe am iCycler durchgeführt, wobei Annealing-Temperaturen von 50°C bis 65°C ausgetestet wurden. Die optimale Annealing-Temperatur wurde definiert als die Temperatur, bei der das Amplifikat den Messpunkt C<sub>t</sub> (threshold cycle) am schnellsten erreicht (für die Erklärung Messpunkt C<sub>t</sub> s. Kap. 3.2.3.3). Die Sequenzen, Produktgrößen und die jeweiligen GC-Anteile der Primer sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. GC-Anteile am 3'-Ende der Primer sollten möglichst gering gehalten werden, da sie sonst in der Annealing-Phase vermehrt an unspezifische Produkte binden können.

Tab.3.1 Verwendete Primer-Paare

Zielprotein	Oligonukleotidsequenz (F/R*)	Produktgröße (bp)	GC-Anteil in %
TLR2	F: TGTCTTGTGACCGCAATGGTA	242	48
	R: GCTTGAACCAGGAAGACGAT		50
TLR4	F: GGAGCCCTGCGTGGAGA	299	71
	R: TATGCCCCATCTTCAATTGTC		43
CD14	F: AACCTTGTGAGCTGGACGAT	160	50
	R: AGCCTTGACCGTGTTCAGC		61
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	188	58
	R: GAAGATGGTGTGATGGGATTTC		45

\*F: forward primer, R: reverse primer

Um einzelne Proben direkt untereinander vergleichen zu können, müssten exakt die gleichen Mengen an cDNA für die Probenverarbeitung verwendet werden, was nicht möglich ist.

Daher werden Referenzgene, sog. Haushaltsgene, verwendet. Haushaltsgene sind Gene, die unabhängig von äußeren Stimuli weitgehend konstant transkribiert werden. Hierzu eignen sich beispielsweise GAPDH,  $\beta$ -Actin,  $\beta$ 2-Mikroglobulin und andere. In der vorliegenden Arbeit wurde die GAPDH verwendet. Indem man die Werte einer Probe auf den jeweiligen GAPDH-Wert bezieht, können Unterschiede der Ausgangsmenge der cDNA und Unterschiede der Effektivität der PCR ausgeglichen werden.

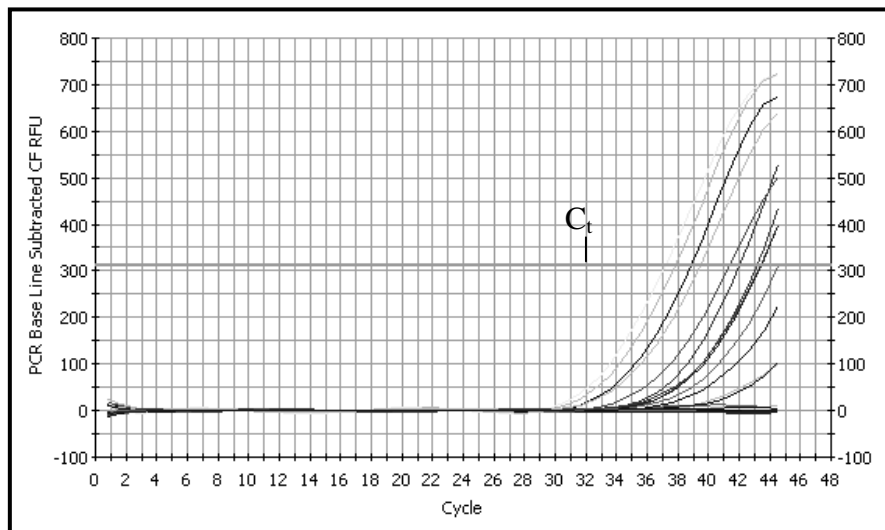
### 3.2.3.2 Durchführung

Die Reaktionsansätze für den iCycler wurden in 96-well-Platten pipettiert. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 20  $\mu$ l und setzte sich wie folgt zusammen:

10 $\mu$ l	SYBR Green IQ Supermix
1 $\mu$ l	Vorwärts-Primer (5 pmol/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	Rückwärts-Primer (5 pmol/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	cDNA
7 $\mu$ l	RNase-freies H <sub>2</sub> O

Bei der Durchführung wurde zunächst für jedes Primer-Paar ein Mastermix angefertigt. Das jeweilige Mastermix wurde dann auf die 96-well-Platte verteilt und am Ende die cDNA hinzupipettiert. Das verwendete SYBR Green IQ Supermix enthielt dNTP (0,4 mM), Pufferlösung, eine angepasste MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, SYBR Green I, Stabilisatoren und die iTaq-Polymerase (sog. „Hot-start“ Taq-Polymerase), die sich erst nach 3-4 Minuten in der ersten Denaturationsphase aktiviert. Dieses sollte die unspezifische Bildung von Primer-Oligomeren bei niedrigen Temperaturen vor Beginn der PCR weitgehend verhindern. Der fertig gestellte Gesamtansatz wurde sofort in den iCycler eingesetzt. Die Real-time RT-PCR wurde dann, wie oben unter Kap. 3.2.3 beschrieben, durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 43 Zyklen durchlaufen. Die Abbildung 3.2 zeigt eine Aufzeichnung eines Real-time-RT-PCR-Durchlaufes.

Abb. 3.2 Amplifizierung am iCycler



Darstellung von Amplifizierungskurven am Beispiel von TLR4  
Abszisse: Zykluszahl ; Ordinate: Fluoreszenz  
Ct: threshold cycle

### 3.2.3.3 Auswertung

Die relative Quantifizierung der iCycler-Produkte erfolgte durch das jeweilige Verhältnis zu dem Haushaltsgen GAPDH. Um dieses Verhältnis darstellen zu können, wurde nach einem iCycler-Durchlauf der Messpunkt  $C_t$  (threshold cycle) für jede Probe und für das Haushaltsgen definiert. Diese wurde bestimmt, indem die vom iCycler aufgezeichnete Spur der jeweiligen Probe als Gleichung dargestellt und von dieser die zweite Ableitung gebildet wurde. Daraufhin wurde der Punkt mit der stärksten Krümmung, d.h. der Punkt des maximalen Anstiegs der Fluoreszenz, gesucht und als Messpunkt  $C_t$  definiert. Die relative Quantifizierung der cDNA-Proben wurde mit der „Relativen Expressions Software Tool“ (REST) nach folgender Formel errechnet<sup>62;63</sup>:

$$\text{ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control-sample})}$$

$E_{\text{target}}$  stellt dabei die Real-time RT-PCR-Effizienz der Probe,  $E_{\text{ref}}$  die des Referenzgens GAPDH dar. Die Effizienz eines RT-PCR-Laufes wird anhand verschiedener Ansatzmengen von cDNA und des jeweils zugehörigen  $C_t$ -Wertes bestimmt nach der Formel  $E = 10^{-1/\text{slope}}$  errechnet. Der Effizienzwert einer PCR beträgt  $1 \leq E \leq 2$ . Bei optimaler und identischer Amplifizierung des Referenzgens und der Probe sowie bei Vorliegen optimaler PCR-Bedingungen beträgt der Wert für die Effizienz  $E=2$ . Da in der vorliegenden Arbeit nicht mit



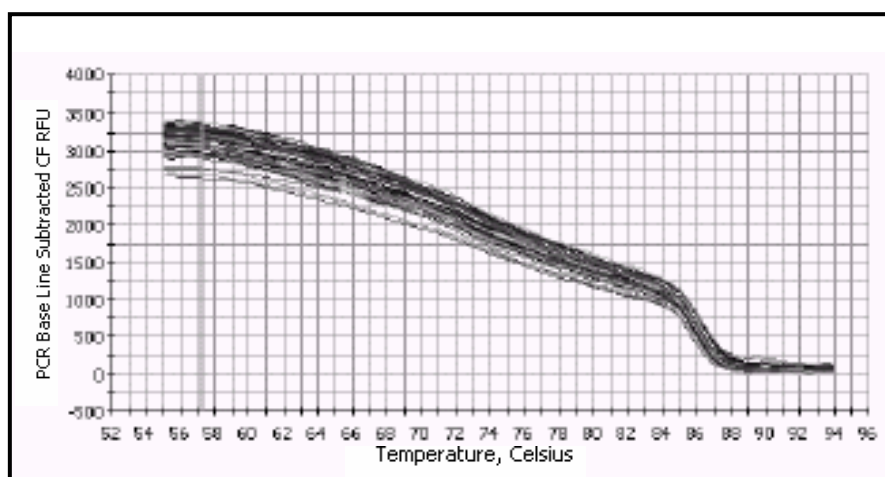
verschiedenen cDNA-Anfangsmengen gearbeitet wurde, ging das REST-Programm von einer Effizienz von  $E=2$  aus. Das  $\Delta CP_{\text{target}}$  war bei der vorliegenden Arbeit definiert als die Differenz zwischen dem ermittelten  $C_T$ -Mittelwert aus den für eine cDNA-Probe durchgeführten beiden iCycler-Ansätzen und des  $C_T$ -Mittelwertes beider iCycler-Ansätze einer Kontroll-cDNA-Probe. Als  $\Delta CP_{\text{ref}}$  wurde die Differenz zwischen den ermittelten  $C_T$ -Werten beider iCycler-Ansätze des Referenzgens errechnet.

### 3.2.3.4 Produktkontrolle

#### 3.2.3.4.1 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die Real-time RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des jeweiligen Produktes zu überprüfen und so eine eventuelle Kontamination durch Nebenprodukte auszuschließen. Dabei wurde der Gesamtansatz noch einmal in  $0,5^\circ\text{C}$ -Schritten bis  $100^\circ\text{C}$  erwärmt. Je nach Sequenz, Länge und GC-Anteil trennte sich der Doppelstrang des Produktes bei einer spezifischen Temperatur auf. Dieses resultierte in einer Dissoziation des SYBR Green I-Moleküls aus der Bindung mit dem DNA-Molekül, was zu einem Abfall der Fluoreszenz führte. Eine solche Schmelzkurvenanalyse ist in Abbildung 3.3 grafisch dargestellt.

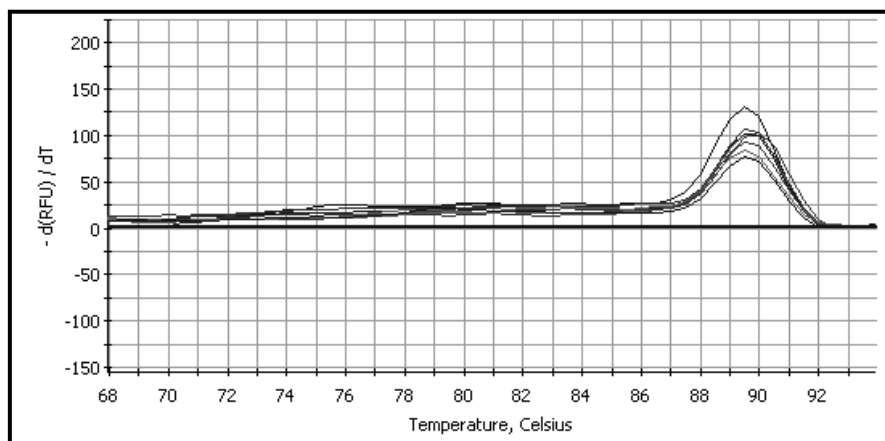
Abb. 3.3 Schmelzkurvenanalyse



Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse  
Abszisse: Temperatur in  $^\circ\text{Celsius}$ ; Ordinate: Fluoreszenz

Um die spezifische Schmelztemperatur eines Produktes grafisch darzustellen, werden die Daten konvertiert. Dabei wird die negative 1. Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur ermittelt und gegen die Temperatur aufgetragen. Diese grafische Darstellung wird als *melting-peak*-Darstellung bezeichnet. Kontaminationen durch unerwünschte Nebenprodukte wie Primer-Dimere würde man in dieser Darstellung durch einen zweiten Gipfel sehen. In der vorliegenden Arbeit wurden über die durchgeführten 43 RT-PCR-Zyklen in keinem der Ansätze Primer-Dimere gefunden. Ein Beispiel dieser Darstellungsweise wird in Abbildung 3.4 gezeigt.

Abb. 3.4 *melting-peak*-Darstellung der Schmelzkurvenanalyse



Darstellung einer *melting-peak* Schmelzanalyse

Abszisse: Temperatur in °Celsius ; Ordinate: negative 1. Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur

### 3.2.3.4.2 Gelelektrophorese

Als weitere Kontrolle der Produkte wurden im Anschluss an die Real-time RT-PCR die Produktgrößen in der Elektrophorese mit 2,5 %-igem Agarosegel und dem Farbstoff Ethidiumbromid kontrolliert. Bei der Gelelektrophorese werden die elektrochemischen Eigenschaften der Nukleinsäuren genutzt. Nukleinsäuren sind bei einem pH-Wert von 8,0-8,5 negativ geladen und wandern bei der Elektrophorese somit zur Anode.

Durchführung:

1 g einer 2,5 %-igen Agarose wurde in 100 ml 10xTBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Beim Abkühlen wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ ml), das als interkalierender Farbstoff an die DNA bindet. Die gesamte Agaroselösung wurde auf einen

Gelträger gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelmasse in eine mit 10xTBE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer übertragen und der Kamm vorsichtig entfernt. Die Produkte aus dem iCycler wurden ebenso wie ein DNA-Molekulargewicht-Standardmarker in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei 100 Volt über etwa eine Stunde durchgeführt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde unter UV-Licht dokumentiert und ausgewertet.

#### **3.2.3.4.3 Wasserkontrolle**

Für jede Probe und jedes Primer-Paar wurde im iCycler eine Wasserkontrolle durchgeführt. Dabei wurde zu den jeweiligen Ansätzen Wasser anstatt der cDNA-Probe gegeben. So konnte eine Kontamination durch Fremd-DNA sowie das Auftreten von Primer-Dimeren und weiteren unerwünschten Nebenprodukten kontrolliert werden.

#### **3.2.3.4.4 RT-negativ-Kontrolle**

Wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben wurde bei der cDNA-Synthese für jede Probe auch eine RT-negativ-Kontrolle durchgeführt, indem der RNA-Probe keine reverse Transkriptase beigefügt wurde. Da keine doppelsträngigen Nukleinsäuren gebildet werden, sollte es bei unkontaminierten Proben während der PCR zu keiner Amplifikation kommen. Hierdurch konnte eine Kontamination der Probe mit genomischer DNA bei der RNA-Extraktion kontrolliert werden. Proben mit Hinweis auf eine Kontamination mit genomischer DNA wurden von einer weiteren Analyse ausgeschlossen.

#### **3.2.3.4.5 Intra-assay-Kontrolle**

Jede cDNA-Probe wurde im iCycler in Duplikaten gemessen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Real-time RT-PCR-Laufes zu überprüfen. Bei der Auswertung wurden die Mittelwerte beider Ansätze verwendet.

#### **3.2.3.4.6 Sequenzierung der iCycler-Produkte**

Die sicherste Kontrolle für die Spezifität eines PCR-Produktes stellt dessen Sequenzierung dar. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit durch Medigenomix (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

#### **3.2.4 Durchflusszytometrie**

Für die Durchflusszytometrie werden sogenannte FACS („fluorescence activated cell sorter“) -Geräte benutzt. Dabei passieren hintereinander angeordnete Zellen einen Laserstrahl. Der Strahl wird dabei abhängig von physikalischen Parametern der Zellen, wie Querschnittsfläche, Membranstruktur oder Granulationsgrad, unterschiedlich abgelenkt. Die entstehende unterschiedliche Streuung des Lichts nutzt man, um Größe und Granularität der Zellen zu messen. Dabei korreliert die Streuung des axial auf die Zellen treffenden Lichtstrahls mit der Zellgröße („Forward Angle Light Scatter“ – FSC) und die Streuung des orthogonal auf die Zellen treffenden Lichtstrahls mit der Zellgranularität („Side Angle Light Scatter“ – SSC). Nach Färbung der Zellen mit Fluorochrommarkierten Antikörpern ist es zusätzlich möglich, Oberflächenantigene zu markieren. Dabei unterscheidet man die direkte und die indirekte Fluoreszenzfärbung. Bei der direkten Färbung bindet ein fluoreszenzmarkierter Antikörper direkt an das Antigen. Bei der indirekten Fluoreszenzfärbung bindet zunächst ein Antikörper an das Antigen. Ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper bindet dann an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die Fluorochrome haben ein jeweils für sie charakteristisches Exzitations- und Emissionsspektrum. Sie werden mit einem Laserstrahl auf ihrer charakteristischen Exzitationswellenlänge angeregt. Die hierdurch entstehende Emission wird durch Photomultiplier detektiert. Die Auswertung erfolgt durch eine Auswertungssoftware, wobei der Prozentsatz der markierten Zellen bestimmt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Messung der Proben der Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) und zur Auswertung das Programm Cell Quest 3.1f (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden die Nabelschnurblutproben mit EDTA antikoaguliert und innerhalb von zwölf Stunden für die Durchflusszytometrie weiterbearbeitet. Die Stabilität der Oberflächenmoleküle innerhalb dieses Zeitfensters wurde in Vorexperimenten untersucht und sichergestellt. Für die Fluoreszenzfärbung der Monozyten wurden folgende Antikörper

verwendet: TLR2-PE IgG2a (Maus), TLR4-PE IgG2a (Maus), CD14-FITC IgG2a (Maus) (eBioscience, San Diego) und als Isotyp-Kontrolle IgG2a (Maus) (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Blutproben wurden über 30 Minuten mit den Antikörpern inkubiert und zweimal mit Phosphat-gebufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurde Ammoniumchlorid-Puffer zur Erythrozytenlyse hinzugegeben. In der Durchflusszytometrie wurde nach dem prozentualen Anteil der TLR2<sup>+</sup>- und TLR4<sup>+</sup>-Monozyten innerhalb der Gesamtzellpopulation gesucht. Ferner wurde nach der Häufigkeit von CD14<sup>+</sup>-Monozyten gesucht, wobei das Verhältnis zwischen der Anzahl der Monozyten und der Lymphozyten berücksichtigt wurde. Es wurden insgesamt über 10.000 Zellen analysiert. Die prozentualen Anteile der TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>- und CD14<sup>+</sup>-Monozyten wurden bestimmt, nachdem ein cut-off-Wert anhand der Isotypenkontrolle festgesetzt worden war.

Die Abgrenzung der Monozytenpopulationen im Nabelschnurblut erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der Leukozytensubpopulationen im FSC/SCC-Plot. Die Leukozytensubpopulationen wurden dabei als Punktwolken dargestellt, wobei die Wolke A in der Abbildung 4.5 durch Lymphozyten, die Wolke B durch Monozyten und die Wolke C durch Granulozyten gebildet wurden (s. Abb. 4.5 in Kap. 4.5).

Die Monozytenpopulation wurde eingegrenzt und für die Analyse der spezifischen Marker - TLR2, TLR4 und CD14 - auf weitere Analysefenster übertragen. Um die Verteilung der Oberflächenmarker zu beurteilen, wählten wir ein Histogramm, das die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (Abszisse - logarithmisch) der spezifischen Marker TLR2, TLR4 und CD14 (in den Abbildungen 4.6 - 4.8 violett dargestellt – s. Kap. 4.5) gegen die Zellzahl (Ordinate - linear) aufträgt. Die Fluoreszenzintensität war hierbei proportional zur Anzahl der markierten Oberflächenmoleküle auf den Monozyten. Um unspezifische Bindungen bei der Auswertung zu berücksichtigen, benutzten wir Isotypkontrollen des Immunglobulins IgG2 (in den Abbildungen 4.6 - 4.8 grün dargestellt – s. Kap. 4.5).

### **3.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der gesamten Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (Dr. J. Heinrich). Für die Errechnung der Korrelationen wurde das SPSS-Programm, Version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Die multivariaten Analyse wurde mit dem SAS-Programm für Windows, Version 8 (SAS Institute, Cary, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als geometrische Mittelwerte mit einem Konfidenzintervall von 95 % angegeben, da bei den mRNA-Daten

keine Normalverteilung zu erwarten war. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, ferner wurden beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben der nicht-parametrische Wilcoxon-Rangsummentest oder beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Nach logarithmischer Transformation der Daten, um eine Normalverteilung zu erhalten, wurde eine multivariate lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden mögliche Einflussgrößen wie Fischölsupplementation, das Geschlecht, die Anzahl der Kinder, ländliche oder städtische Wohnverhältnisse, Haustiere und sozioökonomische Faktoren berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden in Mittelwerts-Verhältnissen dargestellt, beispielsweise zum Vergleich zwischen dem geometrischen Mittelwert von Müttern mit bekannter allergischer Vorerkrankung und dem geometrischen Mittelwert von Müttern ohne bekannter allergischer Vorerkrankung. Um Korrelationen stetiger Variablen zu berechnen, wurde der Spearman-Rho-Test angewandt. Eine signifikante Korrelation wurde angenommen, wenn der Korrelationskoeffizient  $r > 0,3$  und das Signifikanzniveau  $p < 0,05$  betrug.

### 3.4 Material

#### 3.4.1 Chemikalien, Puffer und Primer

▪ TRIZOL LS Reagent	Invitrogen, Life technologies
▪ Randomisierte Hexamer Primer	Roche
▪ Superscript II RT	Invitrogen, Life technologies
▪ SYBR Green IQ Supermix	Biorad
▪ Primer (TLR2, TLR4, CD14, GAPDH)	TIB MOLBIOL
▪ DEPC Treated Water	Invitrogen, Life technologies
▪ Chloroform	Sigma
▪ 100 %-ige Isopropyl-Alkohollösung	Sigma
▪ 75 %-iges Ethanol	Sigma
▪ DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Life technologies
▪ dNTP	Invitrogen, Life technologies
▪ 5xBuffer	Invitrogen, Life technologies
▪ RNAsin	Invitrogen, Life technologies
▪ Seakem LE Agarose	Biozym

- 10xTBE-Puffer Serva

### 3.4.2 Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße (1,5ml) Eppendorf
- PCR-Gefäße (0,2 ml) Eppendorf
- Safe-Lock Reaktionsgefäße (2ml) Eppendorf
- Glasmesspipetten für die Pipettierhilfe Eppendorf
- Plastikspitzen für Mikropipetten Eppendorf
- Plastikröhrchen (15ml, 50ml) Falcon
- 96-well Platten für den iCycler Biorad

### 3.4.3 Geräte

- Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS Heraeus Sepatech
- Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C Eppendorf
- Temperaturzyklusautomat UNO II Biometra
- Real-time-RT-PCR: iCycler IQ Biorad
- Photometer Eppendorf
- Elektrophorese Power Pac 300 Biorad
- Mischgerät Vortex-Genie 2 Scientific Industries
- Mikropipetten Eppendorf  
(0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 2,0-20µl; 10-100µl; 50-200µl; 100-1000µl; 500-5000µl)
- Easypet Pipettierhilfe Eppendorf

### 3.4.4 Software

- Reference Manager Version 10 Adept Scientific Plc., GB
- SPSS 11.0 SPSS Inc., Chicago, USA
- SAS for Windows V 8 SAS Institute, Cary, USA
- Primer Premier 5 primer design software PREMIER Biosoft International

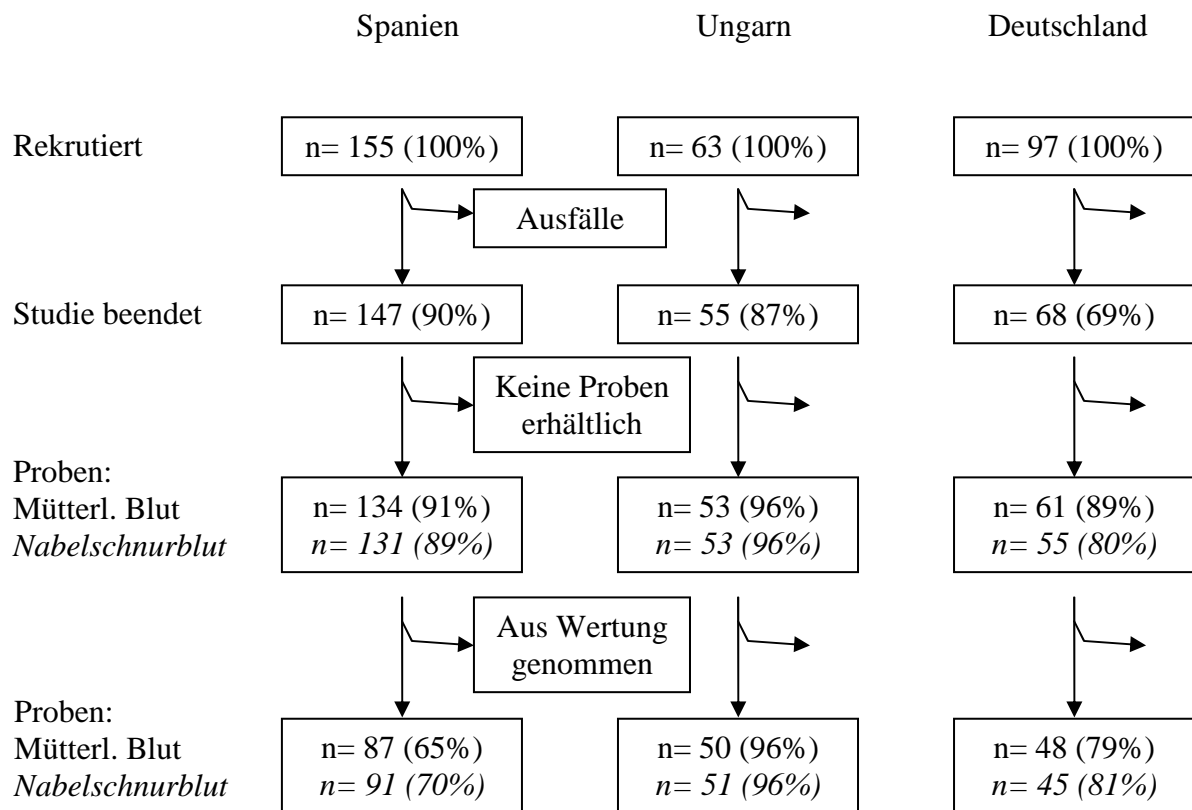
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Probandengruppen**

Die Studienpopulation umfasste nach Beendigung der Rekrutierungsphase insgesamt 315 Probandinnen, von denen vier die Einschlusskriterien nicht erfüllten: Zwei Frauen lagen über der Maximalgrenze von 92 kg Körpergewicht, von denen eine Frau zusätzlich ein kommerzielles Folsäurepräparat einnahm; zwei weitere Frauen nahmen ebenfalls regelmäßig Folsäurepräparate zu sich. 311 Probandinnen wurden letztlich in die Studie aufgenommen, von denen 41 die Studie nicht beendeten (Ausfallquote 13,18 %). Folglich vollendeten 270 Probandinnen die Studie. Blutproben konnten wir von 248 Probandinnen und aus 239 plazentaren Nabelschnurvenen gewinnen. Bei der Verarbeitung dieser Proben wurden weitere 63 mütterliche Proben und 52 Nabelschnurproben aus der Wertung genommen. Gründe hierfür waren zum Beispiel zu geringe mRNA-Konzentrationen oder Kontaminationen mit genomischer DNA nach der Verarbeitung der Proben. Insgesamt konnten wir 185 mütterliche und 187 Nabelschnurproben für unsere Analysen verwenden, davon 87 spanische, 50 ungarische und 48 deutsche Frauen sowie 91 spanische, 51 ungarische und 45 deutsche Neugeborene. Abbildung 4.1 zeigt den Verlauf der Anzahl der Probandinnen. Für unsere Analysen über den direkten Einfluss von im Blut gemessenen Parametern der Mütter auf ihre Kinder benötigten wir Mutter-Kind-Paare. Von den 185 mütterlichen und 187 Nabelschnurproben konnten wir 166 Mutter-Kind-Paare in unsere Analysen einschließen.



Abb. 4.1 Studienpopulation.



Verlauf der teilnehmenden Probanden. Proben, die bei der Bearbeitung zu wenig mRNA enthielten oder in der Schmelzkurve oder in der Gelelektrophorese eine Kontamination aufwiesen, wurden herausgenommen.

Einzelheiten über die Studienpopulation sind in der Tabelle 4.1 dargestellt. Es traten zwischen den drei Studienzentren keine signifikanten Unterschiede bei den Müttern auf bezüglich der wichtigsten Basisdaten wie Anzahl der Kinder und Schwangerschaften. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den Neugeborenen hinsichtlich ihrer Geburtsdaten wie Geschlecht, Geburtsgewicht und APGAR-Score.

Tab. 4.1 Merkmale der Studienpopulation

<b>Mütter</b>	n / N	%		n / N	%
Gesamtzahl	185 / 185	100	Elterliche Ausbildung		
Mütterliche Allergie			Niedrig	60 / 183	33
Ja	51 / 183	28	Mittel	90 / 183	49
Nein	132 / 183	72	Hoch	33 / 183	18
Väterliche Allergie			Fischölsupplementation		
Ja	38 / 181	21	Ja	95 / 185	51
Nein	143 / 181	79	Nein	90 / 185	49
Land			Entbindungsart		
Deutschland	48 / 185	26	Spontan	111 / 185	60
Ungarn	50 / 185	27	Forceps	5 / 185	3
Spanien	87 / 185	47	Vakuumextraktion	10 / 172	6
Wohngegend			Sectio caesarea	46 / 172	27
Ländlich	97 / 183	53			
Städtisch	86 / 183	47	<b>Neugeborene</b>		
Alter			Gesamtzahl	187 / 187	100
< 25 Jahre	21 / 181	12	Geschlecht		
≥ 25 ≤ 35 Jahre	129 / 181	71	Männlich	97 / 182	53
> 35 Jahre	31 / 181	17	Weiblich	85 / 182	47
Nikotinabusus			Land		
Ja	19 / 185	10	Deutschland	45 / 187	24
Nein	166 / 185	90	Ungarn	51 / 187	27
Hauttiere			Spanien	91 / 187	49
Ja	132 / 185	71	Atopische Familienanamnese		
Nein	53 / 185	29	Mütterlich		
Anzahl bisheriger Kinder			Ja	50 / 187	27
Keine	92 / 182	51	Nein	137 / 187	73
1	67 / 182	37	Väterlich		
≥ 2	23 / 182	13	Ja	35 / 186	19
			Nein	151 / 186	81

Atopische Erkrankungen waren bei den Eltern der deutschen Neugeborenen am häufigsten (Mütter 43,4 %, Väter 41,5 %), gefolgt von den ungarischen (Mütter 32 %, Väter 24 %) und traten bei den Eltern der spanischen Neugeborenen am wenigsten auf (Mütter 16,8 %, Väter 8,3 %). Im Einzelnen wurden Asthma bei den Müttern zu 5,4 % und bei den Vätern zu 3,2 %, allergische Rhinitis zu 10,8 % bei den Müttern und zu 11,4 % bei den Vätern und Ekzeme bei den Müttern zu 6,5 % und bei den Vätern zu 1,6 % angegeben. Andere Manifestationen der

Allergien vom Typ I waren zu 11,4 % bei den Müttern und zu 10,8 % bei den Vätern vorhanden. Drei Mütter und acht Väter hatten mehr als eine Diagnose für atopische Erkrankungen.

## 4.2 mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 im mütterlichen Blut

### 4.2.1 Bivariate Assoziationen bei den Müttern

Die Tabelle 4.2 zeigt die im Real-time RT-PCR gemessenen mRNA-Expressionsniveaus der mütterlichen Blutproben für CD14, TLR2 und TLR4 dargestellt als geometrische Mittelwerte (GM) und 95%-Konfidenzintervalle (95% KI).

Tab. 4.2 Geometrische Mittelwerte der mütterlichen mRNA-Expressionsniveaus

Mütter	N	CD14	TLR4	TLR2
		GM (95% KI)	GM (95% KI)	GM (95% KI)
Gesamtzahl	185	<b>1,03</b> (1,01 – 1,05)	<b>0,82</b> (0,79 – 0,84)	<b>0,89</b> (0,87 – 0,91)
Mütterliche Allergie				
Ja	51	<b>0,95</b> (0,92 – 0,98)***	<b>0,72</b> (0,68 – 0,76)***	<b>0,81</b> (0,78 – 0,84)***
Nein	132	<b>1,07</b> (1,04 – 1,09)	<b>0,86</b> (0,83 – 0,89)	<b>0,92</b> (0,89 – 0,95)
Väterliche Allergie				
Ja	38	<b>0,96</b> (0,92 – 1,01)**	<b>0,73</b> (0,69 – 0,78)***	<b>0,82</b> (0,78 – 0,86)***
Nein	143	<b>1,05</b> (1,03 – 1,07)	<b>0,84</b> (0,81 – 0,87)	<b>0,90</b> (0,88 – 0,93)
Land				
Spanien	87	<b>1,11</b> (1,08 – 1,14)***	<b>0,96</b> (0,93 – 0,99)***	<b>0,98</b> (0,95 – 1,01)***
Deutschland	48	<b>0,94</b> (0,91 – 0,98)	<b>0,70</b> (0,67 – 0,73)	<b>0,82</b> (0,79 – 0,85)
Ungarn	50	<b>0,99</b> (0,97 – 1,03)	<b>0,73</b> (0,69 – 0,76)	<b>0,81</b> (0,78 – 0,83)
Wohngegend				
Städtisch	86	<b>1,00</b> (0,98 – 1,03)**	<b>0,79</b> (0,75 – 0,82)**	<b>0,86</b> (0,84 – 0,89)**
Ländlich	97	<b>1,07</b> (1,03 – 1,10)	<b>0,85</b> (0,82 – 0,89)	<b>0,92</b> (0,88 – 0,95)
Alter				
< 25 Jahre	21	<b>1,10</b> (1,03 – 1,17)**	<b>0,86</b> (0,78 – 0,95)*	<b>0,94</b> (0,88 – 1,00)
≥ 25 ≤ 35 Jahre	129	<b>1,04</b> (1,01 – 1,06)	<b>0,83</b> (0,80 – 0,86)	<b>0,88</b> (0,86 – 0,91)
> 35 Jahre	31	<b>0,97</b> (0,92 – 1,02)	<b>0,75</b> (0,70 – 0,81)	<b>0,88</b> (0,83 – 0,93)

Nikotinabusus				
Ja	19	<b>1,09</b> (1,02 – 1,17)	<b>0,97</b> (0,86 – 1,08)***	<b>0,94</b> (0,86 – 1,02)
Nein	166	<b>1,03</b> (1,01 – 1,05)	<b>0,80</b> (0,78 – 0,83)	<b>0,88</b> (0,86 – 0,90)
Haustiere				
Ja	132	<b>1,03</b> (1,01 – 1,06)	<b>0,82</b> (0,79 – 0,86)	<b>0,89</b> (0,86 – 0,91)
Nein	53	<b>1,04</b> (0,99 – 1,08)	<b>0,81</b> (0,77 – 0,86)	<b>0,89</b> (0,86 – 0,93)
Anzahl bisheriger Kinder				
Keine	92	<b>1,03</b> (1,01 – 1,07)	<b>0,82</b> (0,78 – 0,86)	<b>0,89</b> (0,87 – 0,92)
1	67	<b>1,03</b> (0,99 – 1,06)	<b>0,81</b> (0,77 – 0,86)	<b>0,88</b> (0,84 – 0,92)
≥ 2	23	<b>1,03</b> (0,96 – 1,11)	<b>0,82</b> (0,74 – 0,90)	<b>0,88</b> (0,82 – 0,94)
Elterliche Ausbildung				
Niedrig	60	<b>1,07</b> (1,02 – 1,12)*	<b>0,91</b> (0,86 – 0,95)***	<b>0,95</b> (0,92 – 0,99)***
Mittel	90	<b>1,02</b> (0,99 – 1,05)	<b>0,78</b> (0,75 – 0,82)	<b>0,86</b> (0,84 – 0,89)
Hoch	33	<b>0,99</b> (0,94 – 1,03)	<b>0,76</b> (0,71 – 0,82)	<b>0,83</b> (0,79 – 0,87)
Fischölsupplementation				
Ja	95	<b>1,02</b> (0,99 – 1,05)	<b>0,80</b> (0,76 – 0,83)	<b>0,88</b> (0,85 – 0,91)
Nein	90	<b>1,04</b> (1,01 – 1,07)	<b>0,84</b> (0,81 – 0,88)	<b>0,89</b> (0,87 – 0,92)
Entbindungsart				
Spontan	111	<b>1,04</b> (1,01 – 1,07)	<b>0,81</b> (0,78 – 0,85)	<b>0,88</b> (0,85 – 0,91)
Forceps	5	<b>0,99</b> (0,88 – 1,12)	<b>0,87</b> (0,76 – 0,99)	<b>0,88</b> (0,81 – 0,95)
Vakuumentraktion	10	<b>1,06</b> (0,94 – 1,19)	<b>0,88</b> (0,75 – 1,03)	<b>0,91</b> (0,83 – 0,99)
Sectio caesarea	46	<b>1,00</b> (0,96 – 1,05)	<b>0,81</b> (0,75 – 0,86)	<b>0,89</b> (0,85 – 0,94)

Fett gedruckt sind die geometrischen Mittelwerte, in Klammern stehen die 95%-Konfidenzintervalle

Für die Untersuchung der Unterschiede innerhalb einer Gruppe wurde bei zwei Parametern der nichtparametrische Wilcoxon-Test, bei mehr als zwei Parametern der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test angewendet.

p-Werte sind angegeben für den Vergleich der Parameter in einer Gruppe – z.B. mütterliche Allergie ja / nein

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001

Sowohl eine mütterliche als auch eine väterliche Allergie waren assoziiert mit signifikant erniedrigten geometrischen Mittelwerten der mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR4 und TLR2 im mütterlichen Blut gegenüber Blutproben von Probandinnen, bei denen keine allergische Erkrankung vorlag. Eine ähnliche Assoziation wurde außerdem für eine städtische Wohngegend beobachtet. Hingegen waren die spanische Herkunft (CD14, TLR4, TLR2), das junge Alter der Probandinnen (CD14, TLR4), der Nikotinabusus (TLR4) und eine niedrige elterliche Ausbildung (CD14, TLR4, TLR2) mit erhöhten mRNA-Expressionsniveaus assoziiert.

## 4.2.2 Multivariate Regressionsanalysen bei den Müttern

Nach Adjustierung der Daten mit multipler Regression unter Berücksichtigung der übrigen möglichen Einflussfaktoren wie Wohngegend, Allergie, Haustiere, Anzahl der Kinder und Bildung mit Ausnahme der Nationalität blieb die signifikante Assoziation zwischen den erniedrigten geometrischen Mittelwerten der mRNA-Expressionsniveaus im mütterlichen Blut und der mütterlichen Allergie erhalten (CD14:  $p < 0,009$  ; TLR4 :  $p < 0,005$  ; TLR2:  $p < 0,001$ ). Die Tabelle 4.3 zeigt die nicht-adjustierten Daten und die adjustierten Daten der mRNA-Expressionsniveaus im mütterlichen Blut für den Einfluss elterlicher Allergien.

Tab. 4.3 Adjustierte Daten für geometrische Mittelwerte der mütterlichen mRNA-Expressionsniveaus

Mütter	CD14		TLR4		TLR2	
	MR	95% KI	MR	95% KI	MR	95% KI
Allergie (nicht-adjustiert)						
Nein	1	–	1	–	1	–
Ja	0,89	[0,85 ; 0,93]**	0,83	[0,78 ; 0,89]***	0,88	[0,84 ; 0,92]***
Allergie (adjustiert)						
Nein	1	–	1	–	1	–
Ja	0,94	[0,90 ; 0,98]**	0,92	[0,87 ; 0,97]**	0,93	[0,89 ; 0,97]***

Stratifizierte Werte für das Vorhandensein und Nichtvorhandensein von mütterlichen Allergien. Dargestellt als Verhältnis der geometrischen Mittelwerte für nicht-adjustierte (oben) Analysen und adjustierte Analysen (unten) und multipler Regressionsanalyse für mögliche Einflussfaktoren wie Land, Wohngegend, Haustiere, Anzahl der Kinder, elterliche Bildung, Entbindungsart, Alter, Nikotinabusus und Fischölsupplementation  
MR = Verhältnis der geometrischen Mittelwerte (means ratio)  
95% KI = 95%-Konfidenzintervall  
\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

### 4.3 mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 im Nabelschnurblut

#### 4.3.1 Bivariate Assoziationen bei den Neugeborenen

Die Tabelle 4.4 zeigt die im Real-time RT-PCR gemessenen mRNA-Expressionsniveaus der Nabelschnurblutproben für CD14, TLR2 und TLR4 dargestellt als geometrische Mittelwerte (GM) und 95%-Konfidenzintervalle (95% KI).

Tab. 4.4 Geometrische Mittelwerte der neonatalen mRNA-Expressionsniveaus

Neugeborene	N	CD14	TLR4	TLR2
		GM (95% KI)	GM (95% KI)	GM (95% KI)
Geschlecht				
Männlich	97	<b>1,00</b> (0,98 – 1,03)	<b>0,82</b> (0,78 – 0,85)	<b>0,84</b> (0,81 – 0,86)
Weiblich	85	<b>1,00</b> (0,97 – 1,03)	<b>0,81</b> (0,78 – 0,85)	<b>0,83</b> (0,80 – 0,86)
Land				
Spanien	91	<b>1,06</b> (1,03 – 1,08)***	<b>0,94</b> (0,91 – 0,96)***	<b>0,92</b> (0,89 – 0,95)***
Deutschland	45	<b>0,93</b> (0,90 – 0,95)	<b>0,71</b> (0,68 – 0,73)	<b>0,73</b> (0,70 – 0,75)
Ungarn	51	<b>0,97</b> (0,94 – 1,01)	<b>0,73</b> (0,70 – 0,77)	<b>0,79</b> (0,77 – 0,81)
Atopische Familienanamnese				
Mütterlich				
Ja	50	<b>0,94</b> (0,92 – 0,96)***	<b>0,72</b> (0,68 – 0,75)***	<b>0,75</b> (0,72 – 0,77)***
Nein	137	<b>1,03</b> (1,00 – 1,05)	<b>0,86</b> (0,83 – 0,88)	<b>0,87</b> (0,85 – 0,89)
Väterlich				
Ja	35	<b>0,94</b> (0,91 – 0,98)**	<b>0,72</b> (0,68 – 0,76)***	<b>0,75</b> (0,72 – 0,79)***
Nein	151	<b>1,02</b> (0,99 – 1,04)	<b>0,84</b> (0,82 – 0,87)	<b>0,85</b> (0,83 – 0,87)

Fett gedruckt sind die geometrischen Mittelwerte, in Klammern stehen die 95% Konfidenzintervalle

Für die Untersuchung der Unterschiede innerhalb einer Gruppe wurden die Varianzanalyse und bei zwei Parametern der nichtparametrische Wilcoxon-Test, bei mehr als zwei Parametern der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test angewendet.

p-Werte sind angegeben für den Vergleich der Parameter in einer Gruppe – z.B. mütterliche Allergie ja / nein

\* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01 ; \*\*\* p < 0,001

Ähnlich wie schon bei mütterlichem Blut waren auch die mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR4 und TLR2 bei positiver atopischer Familienanamnese sowohl mütterlicher- wie

auch väterlicherseits signifikant erniedrigt. Auch der länderspezifische Unterschied verhielt sich ähnlich mit signifikant erhöhten mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR4 und TLR2 bei Nabelschnurproben aus Spanien gegenüber Deutschland und Ungarn.

#### 4.3.2 Multivariate Regressionsanalysen bei den Neugeborenen

Auch bei den Neugeborenen führten wir eine multivariate Analyse durch, um den Einfluss der atopischen Familienanamnese auf die mRNA-Expressionsniveaus im Nabelschnurblut durch unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren wie Land, Haustiere, Anzahl der Geschwister, elterlicher Bildung sowie Entbindungsart, Alter, Nikotinabusus und Fischölsupplementation der Mutter zu untersuchen. Die Assoziation zwischen atopischer Familienanamnese mütterlicherseits und den erniedrigten mRNA-Expressionsniveaus in Nabelschnurblut blieb auch nach multipler Regression signifikant. Hingegen war die Assoziation zur väterlichen Familienanamnese nach der Bereinigung der Störgrößen nicht mehr signifikant (Tab. 4.5).

Tab. 4.5 Angeglichene Daten für geometrische Mittelwerte der neonatalen mRNA-Expressionsniveaus

Neugeborene	CD14		TLR4		TLR2	
	MR	95% KI	MR	95% KI	MR	95% KI
Mütterliche Allergie						
(nicht-adjustiert)						
Nein	1	–	1	–	1	–
Ja	0,92	[0,88 ; 0,95]***	0,83	[0,79 ; 0,88]***	0,86	[0,82 ; 0,90]***
(adjustiert)						
Nein	1	–	1	–	1	–
Ja	0,95	[0,92 ; 0,99]*	0,91	[0,86 ; 0,96]**	0,92	[0,88 ; 0,97]**
Väterliche Allergie						
(nicht-adjustiert)						
Nein	1	–	1	–	1	–
Ja	0,92	[0,88 ; 0,97]**	0,85	[0,78 ; 0,91]***	0,85	[0,81 ; 0,99]***
(adjustiert)						
Nein	1	–	1	–	1	–
Ja	0,99	[0,94 ; 1,03]	0,95	[0,89 ; 1,01]	0,95	[0,90 ; 1,00]

---

Angepasste Werte für das Vorhandensein und Nichtvorhandensein von elterlichen Allergien. Dargestellt als Verhältnis der geometrischen Mittelwerte für unangeglichene (oben) Analysen und angegliche Analysen (unten) anhand multipler Regression für mögliche Einflussfaktoren wie Land, Wohngegend, Haustiere, Anzahl der Geschwister, elterliche Bildung, Entbindungsart sowie Alter, Nikotinabusus und Fischölsupplementation der Mutter

MR = Verhältnis der geometrischen Mittelwerte (means ratio)

95% KI = 95%-Konfidenzintervall

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

---

Ähnlich wie bei den Müttern blieben bei den spanischen Nabelschnurproben die mRNA-Expressionsniveaus für TLR4 und TLR2 signifikant erhöht im Vergleich zu den deutschen und ungarischen Proben. Die mRNA-Expressionsniveaus für CD14 waren hingegen nur gegenüber den deutschen weiterhin erhöht, nicht jedoch gegenüber den ungarischen Proben. Hohe elterliche Bildung war mit niedrigen CD14-mRNA-Expressionsniveaus in Nabelschnurblut assoziiert.

#### **4.4 Korrelationen zwischen mütterlichen und neonatalen mRNA-Expressionsniveaus**

Nachdem wir die Assoziationen der mRNA-Expressionsniveaus mit verschiedenen Parametern in mütterlichem Blut und in Nabelschnurblut getrennt von einander untersucht hatten, stellten wir uns die Frage, ob die mRNA-Expressionsniveaus in mütterlichem Blut direkt mit mRNA-Expressionsniveaus in Nabelschnurblut assoziiert sind. Hierfür untersuchten wir die Korrelation der mRNA-Expressionsniveaus in den Proben der Mutter-Kind-Paare. Die Gesamtheit der mütterlichen mRNA-Expressionsniveaus korrelierte positiv mit der Gesamtheit der neonatalen mRNA-Expressionsniveaus unabhängig der atopischen Familienanamnese (CD14  $r = 0,43$  ; TLR2  $r = 0,55$  ; TLR4  $r = 0,59$  ;  $r :=$  Spearman Korrelationskoeffizient). Nach Auftrennung der Mutter-Kind-Paare mit Berücksichtigung der atopischen Familienanamnese (positiv gegen negativ) stellten wir nur noch in der Gruppe mit negativer Familienanamnese eine signifikant positive Korrelation fest. Die Abbildungen 4.2 – 4.4 zeigen die mRNA-Expressionsniveaus von CD14 (Abb. 4.2), TLR2 (Abb.4.3) und TLR4 (Abb.4.4).



Abb. 4.2 CD14 - mRNA-Expressionsniveaus von Müttern und Neugeborenen

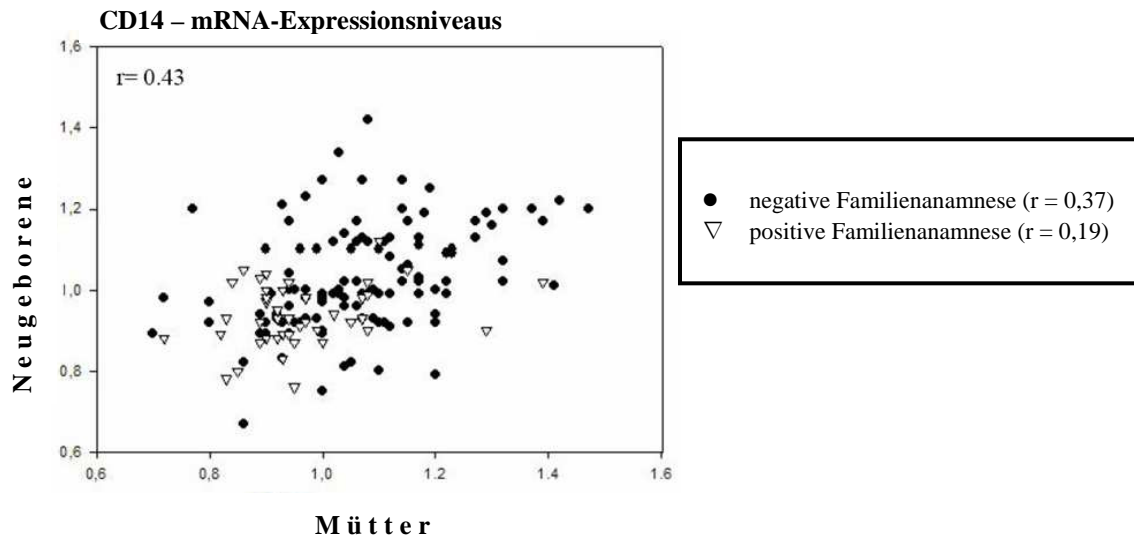


Abb. 4.3 TLR2 - mRNA-Expressionsniveaus von Müttern und Neugeborenen

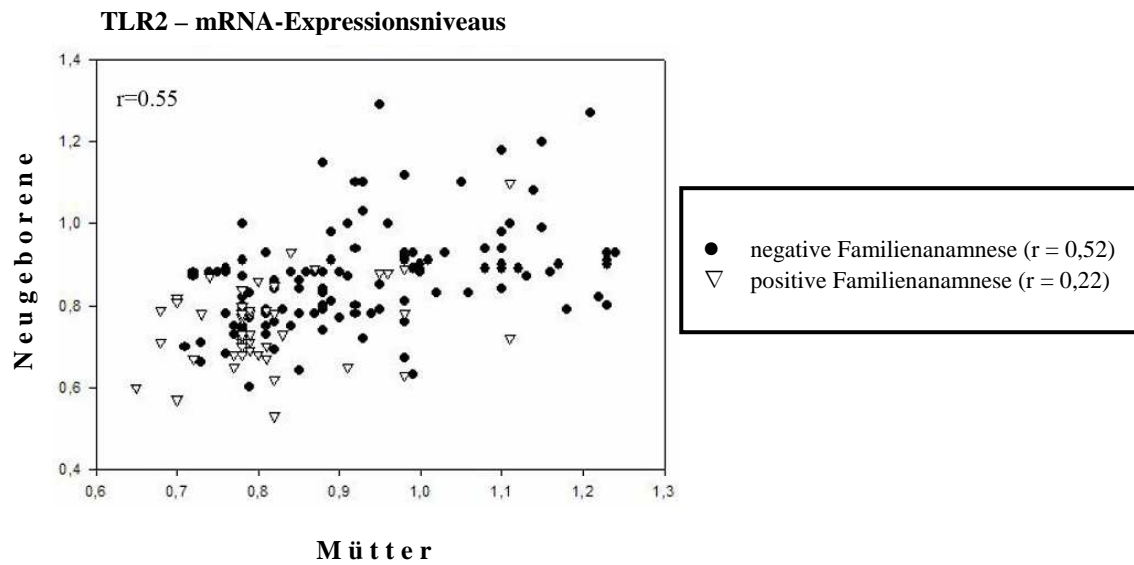


Abb. 4.4 TLR4 - mRNA-Expressionsniveaus von Müttern und Neugeborenen

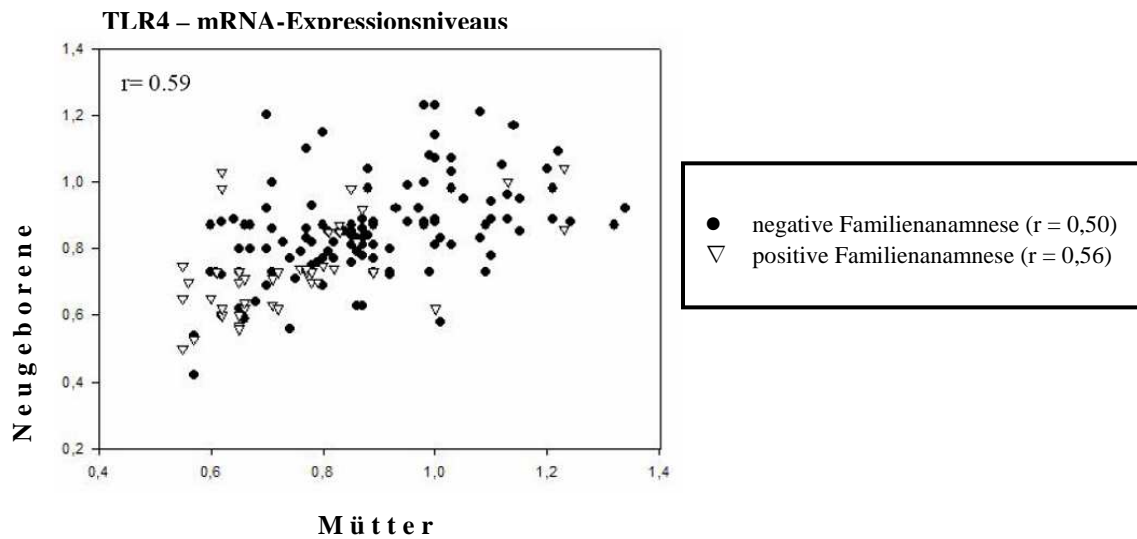


Abb. 4.2 – 4.4 Im linken oberen Eck der Diagramme befinden sich die Korrelationen für alle Mutter-Kind-Paare unabhängig von der Familienanamnese, im Rechteck zur Rechten der Diagramme sind die Korrelationen für die einzelnen Gruppen ohne atopische Erkrankungen (schwarzer Kreis) und mit atopischen Erkrankungen (weißes Dreieck) in der Familienanamnese aufgeführt.

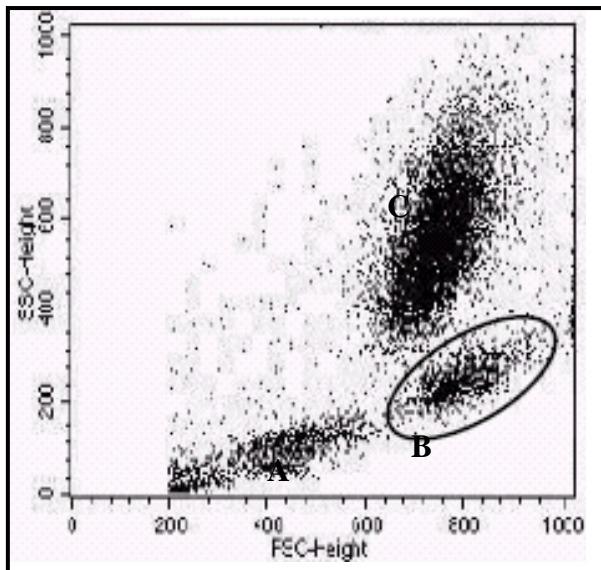
#### 4.5 Rezeptorexpression auf Monozyten in Nabelschnurblut

Da die Bildung von mRNA nicht zwingend zu einer Proteinexpression der jeweils kodierten Moleküle führt, wurde mit dem Durchflusszytometer die Oberflächenexpression von TLR2, TLR4 und CD14 auf Monozyten in Nabelschnurblut bestimmt. Hierfür wurden 42 Proben aus Nabelschnurblut, die wir bei der Entbindung aus den Plazentas der deutschen Probandinnen gewonnen haben, mit der Durchflusszytometrie analysiert, um diese Ergebnisse dann im nächsten Schritt mit den mRNA-Expressionsniveaus der dazugehörigen Nabelschnurblutproben zu korrelieren (s. Kap. 4.6).

Die Abbildung 4.5 zeigt eine Darstellung der Leukozytensubpopulationen im FSC/SCC-Plot. Das Oval um Punktwolke B grenzt die Monozytensubpopulation ein (Abb. 4.5).

Abb. 4.5 Monozytenabgrenzung in Nabelschnurblut

---



Monozytenabgrenzung in Nabelschnurblut der 42 Nabelschnurproben in der deutschen Subpopulation.

Abszisse: FSC ; Ordinate: SSC

Wolke A: Lymphozyten

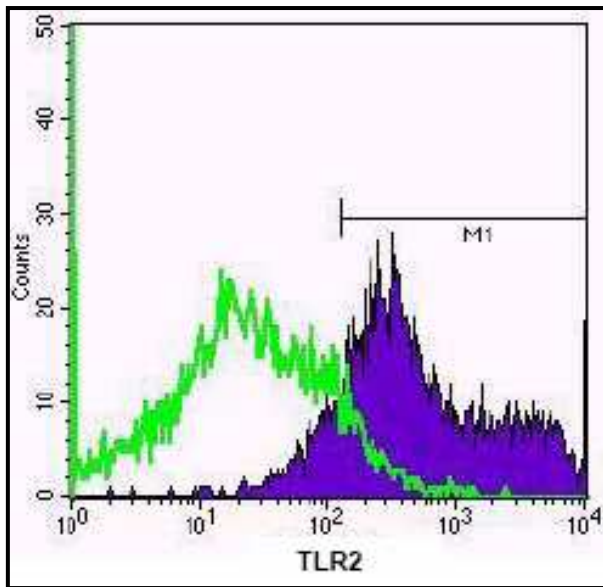
Wolke B: Monozyten

Wolke C: Granulozyten

---

Die Abbildungen 4.6 – 4.8 zeigt die Verteilung der Oberflächenmarker TLR2, TLR4 und CD14 auf Monozyten. Auf der Abszisse ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) logarithmisch, auf der Ordinate ist die Zellzahl linear aufgetragen. Die violett ausgefüllten Kurven stellen dabei die Fluoreszenzintensität von TLR2, TLR4 und CD14, die grün umrandeten Kurven die der Isotypkontrollen dar (Abb. 4.6 – 4.8).

Abb. 4.6 TLR2<sup>+</sup>-Expression auf Monozyten in Nabelschnurblut

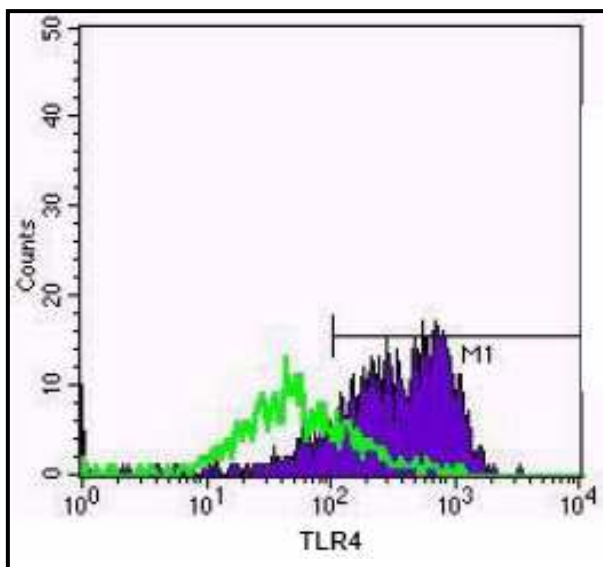


Darstellung der TLR2<sup>+</sup>-Monozyten

Abszisse: Fluoreszenzintensität von TLR2-PE ; Ordinate: Zellzahl

grün: Isotyp-Kontrolle ; violett: TLR2-PE

Abb. 4.7 TLR4<sup>+</sup>-Expression auf Monozyten in Nabelschnurblut

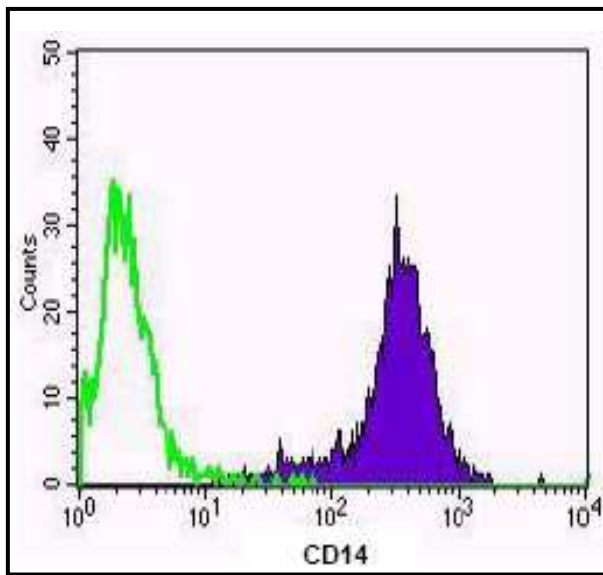


Darstellung der TLR4<sup>+</sup>-Monozyten

Abszisse: Fluoreszenzintensität von TLR4-PE ; Ordinate: Zellzahl

grün: Isotyp-Kontrolle ; violett: TLR4-PE

Abb. 4.8 CD14<sup>+</sup>-Expression auf Monozyten in Nabelschnurblut



Darstellung der CD14<sup>+</sup>-Monozyten

Abszisse: Fluoreszenzintensität von CD14-FITC ; Ordinate: Zellzahl

grün: Isotyp-Kontrolle ; violett: CD14-FITC

#### 4.6 Korrelation von mRNA-Expressionsniveaus mit der Rezeptorenexpression auf Monozyten

Es ergab sich eine hohe Korrelation für die mRNA-Expressionsniveaus für TLR2 und TLR4 in Nabelschnurblut mit dem prozentualen Anteil von TLR2<sup>+</sup>- ( $r = 0,5$  ;  $p < 0,01$ ) und TLR4<sup>+</sup>- ( $r = 0,61$  ;  $p < 0,01$ ) Monozyten. Für CD14 wurde keine signifikante Korrelation festgestellt (Abb. 4.9 – 4.11).

Abb. 4.9 Korrelation von TLR4 - mRNA-Expressionsniveaus und TLR4<sup>+</sup>-Monozyten in Nabelschnurblut

---

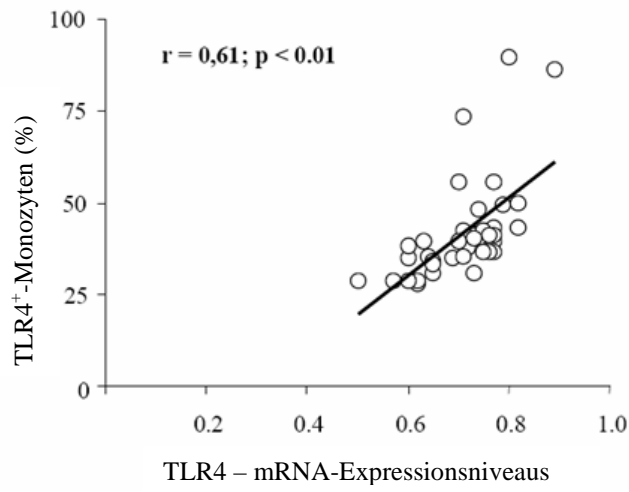


Abb. 4.10 Korrelation von TLR2- mRNA-Expressionsniveaus und TLR2<sup>+</sup>-Monozyten in Nabelschnurblut

---

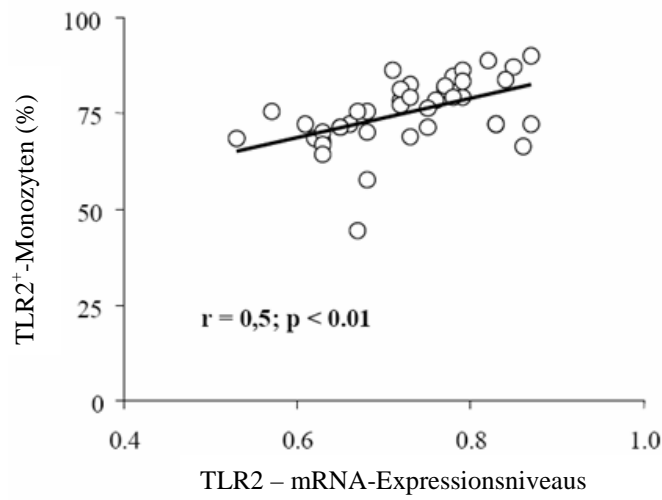


Abb. 4.11 Korrelation von CD14 - mRNA-Expressionsniveaus und CD14<sup>+</sup>-Monozyten in Nabelschnurblut

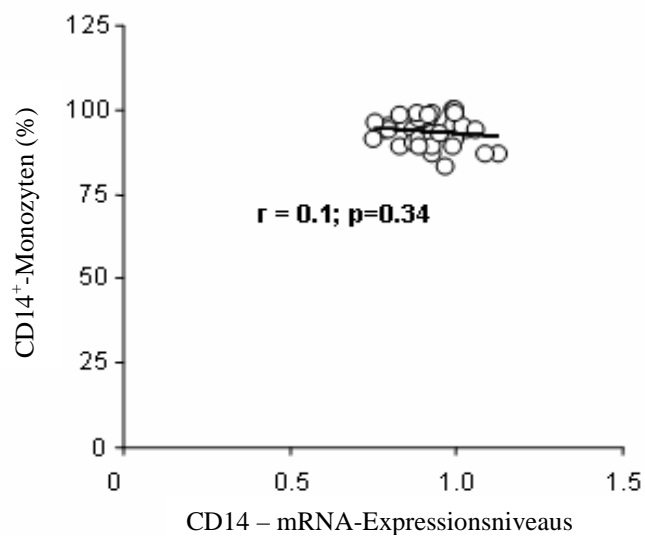


Abb. 4.9 – 4.11 Korrelation von mRNA-Expressionsniveaus und Oberflächenexpression von Monozyten für TLR4, TLR2 und CD14 in Nabelschnurblut. Bei 42 Proben aus Deutschland wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt und die Ergebnisse mit den Ergebnissen der zugehörigen mRNA-Proben korreliert.  
r = Spearman Korrelationskoeffizient

## 5. Diskussion

### 5.1 Studie und Probanden

Für die Analysen standen der vorliegenden Arbeit 185 mütterliche und 187 Nabelschnurblutproben, von denen 166 x 2 Blutproben Mutter-Kind-Paare bildeten, zur Verfügung. Zudem wurden 42 Nabelschnurblutproben durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden erniedrigte mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR2 und TLR4 in unstimulierten peripheren Blutproben bei allergischen schwangeren Frauen, deren Männer ebenfalls allergisch erkrankt waren, beobachtet. In unstimulierten Nabelschnurproben wurden ebenfalls erniedrigte mRNA-Expressionsniveaus bei positiver atopischer Familienanamnese festgestellt. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für die 42 Nabelschnurblutproben bestätigten, dass auch die Expression der TLR auch auf Proteinebene erniedrigt war. Die Korrelation der Mutter-Kind-Paare bezüglich der mRNA-Expressionsniveaus war ebenfalls positiv, weshalb wir vermuten, dass die Einflüsse während der Schwangerschaft, die zur Expression dieser Rezeptoren bei der Mutter führten, auch eine Wirkung auf den Fetus *in utero* hatten.

Eine Verzerrung bei der Auswahl der Probandinnen hinsichtlich atopischer Variablen ist eher unwahrscheinlich, da diese Studie primär darauf ausgerichtet war, den Einfluss von Nahrungsergänzungsmitteln (Folsäure und Fischöl) während der Schwangerschaft auf die neuromentale Entwicklung des Kindes zu untersuchen. Immunologische Parameter und die Entwicklung von atopischen Erkrankungen des Kindes waren sekundäre Zielsetzungen der Studie. Ferner sind Artefakte durch lokale Deviationen eher unwahrscheinlich durch die multizentrische Rekrutierung der Probandinnen.

Allerdings hat die vorliegende Arbeit zwei wesentliche Einschränkungen in Bezug auf die Population und das Studiendesign. 1.) Aufgrund des Studiendesigns hatten wir kein Maß für die Exposition der Probandinnen zu Mikroorganismen in der Umwelt, weshalb die mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 nicht in direkten Zusammenhang mit Konzentrationen der Exposition zu beispielsweise Endotoxin oder Allergenen gemessen werden konnten. Wie eingangs erwähnt, scheint der Einfluss von Mikroorganismen auf das Immunsystem insbesondere auf die TLR-Expression dosisabhängig zu sein<sup>19;31;82</sup>. Jedoch war in unserem Studienprotokoll die Beschreibung über die Wohngegend – städtisch oder ländlich - eingeschlossen. Für ländliche Gegenden ist eine höhere Exposition gegenüber Mikroben



anzunehmen. Dabei fiel auf, dass 63,5 % der spanischen Probandinnen in ländlichen Gegenden wohnten, gegenüber 43,8 % der deutschen und 22 % der ungarischen Frauen. Dieses könnte zumindest teilweise die erhöhten mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 der spanischen gegenüber den deutschen und ungarischen Frauen erklären. Außerdem waren die mRNA-Expressionsniveaus für dieselben Gene bei Probandinnen aus städtischen Wohngebieten erniedrigt. Unter der Annahme, dass erniedrigte mRNA-Expressionsniveaus von TLR2, TLR4 und CD14 mit atopischen Erkrankungen assoziiert sind, stehen diese Beobachtungen im Einklang mit der Studie von Alfvén et al. In dieser Studie wurden Kinder, deren Eltern in der Landwirtschaft tätig waren oder einer anthroposophischen Lebensweise folgten, auf atopische Erkrankungen untersucht. Dabei stellten die Autoren unter anderem fest, dass ländliches Wohnen auch unabhängig von landwirtschaftlicher Tätigkeit mit einer niedrigeren Prävalenz für atopische Erkrankungen gegenüber städtischem oder vorstädtischem Wohnen assoziiert war<sup>3</sup>.

2.) Die zweite Einschränkung der vorliegenden Arbeit lag in der fehlenden Information über landwirtschaftliche Tätigkeiten der Familien unter den Probandinnen, die in ländlichen Gegenden wohnten. In europaweiten Studien wurde der Zusammenhang vom Aufwachsen in landwirtschaftlichen Betrieben und erhöhten mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR2<sup>44</sup> und TLR4<sup>18</sup> bei gleichzeitig erniedrigter Prävalenz für atopische Erkrankungen innerhalb derselben Population beschrieben<sup>18</sup>.

## **5.2 Quantitative Real-time RT-PCR**

Die quantitative Real-time RT-PCR ist ein etabliertes Verfahren, um mRNA-Moleküle in biologischen Proben zu messen. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber konventionellen Messungsarten von mRNA liegt in der hohen Sensitivität, der Möglichkeit, viele Proben auf einmal bearbeiten zu können, und einer besseren Quantifizierbarkeit der Proben. Besonders nützlich ist die Real-time-PCR bei Messungen von Molekülen, die nur in kleinen Konzentrationen vorliegen wie beispielsweise Cytokine<sup>28;32</sup>.

Die Real-time RT-PCR wird in der Forschung häufig angewendet, um Veränderungen von mRNA-Expressionsniveaus darzustellen. Dabei entsteht eine Reihe von Problemen bei der Bearbeitung von mRNA-Proben. Die mRNA wird in jedem Individuum und in jeder einzelnen Zelle unterschiedlich hoch exprimiert. Ferner variieren häufig die Protokolle für die

RNA-Extraktion und für die cDNA-Synthese und Kontaminationen der Proben können auftreten<sup>32</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mittels verschiedener Kontrollen das Problem der interindividuellen Unterschiede in der mRNA-Expression zu beheben. Die mRNA-Proben wurden aus homogenen Probenmaterial, peripher-venösem Blut und Nabelschnurblut, gewonnen. Die mRNA-Extraktion führten wir gemäß dem Hersteller-Protokoll durch, auch unter Berücksichtigung der Empfehlungen der „aktuellen Protokolle in der molekularen Biologie“ (current protocols in molecular biology)<sup>52</sup>. Die Konzentrationen der gewonnenen mRNA-Proben wurden anschließend photometrisch anhand des  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnisses (s. Kap. 3.2.2.1) bestimmt. Bei der cDNA-Synthese setzten wir nahezu gleiche Konzentrationen der mRNA ein. Um interindividuelle und interzelluläre Unterschiede der mRNA-Expression auszugleichen, verglichen wir die Ergebnisse der Real-time RT-PCR als Verhältnisse der gesuchten mRNA-Expressionsniveaus und des Referenzgenes GAPDH. Durch verschiedene Kontrollen, die im Methodenteil näher beschrieben sind, versuchten wir ferner, Kontaminationen der mRNA-Proben und der Real-time RT-PCR-Produkte mit Fremdprodukten wie zum Beispiel genomischer DNA und Primer-Dimer möglichst auszuschließen (s. Kap. 3.2.3.4.1 bis 3.2.3.4.6).

Ein Problem bei der Auswertung der Real-time RT-PCR-Ergebnisse besteht darin, dass die mRNA-Expression nicht unbedingt mit der Proteinexpression der Moleküle korrelieren muss. Um dieses in der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, wurden die mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4 in einer Subpopulation mit den jeweiligen Expressionen derselben Rezeptoren in der Durchflusszytometrie korreliert. Für TLR2 und TLR4 zeigten sich hohe Korrelationen. Für CD14 beobachteten wir jedoch keine signifikante Korrelation.

### **5.3 Pathogene und die Hygiene-Hypothese**

Die Hygiene-Hypothese vermutet einen Zusammenhang zwischen der angestiegenen Prävalenz für atopische Erkrankungen in den Industrienationen über die letzten Dekaden<sup>4;5;16;102</sup> und der reduzierten Exposition zu Mikroorganismen im frühen Kindesalter<sup>3;11;20;26;58</sup> bzw. bereits *in utero*<sup>5;10;18;29;37</sup>. Atopische Erkrankungen sind mit einer  $T_H2$ -gewichteten Immunantwort mit anschließender Bildung von vorwiegend IgE-Antikörpern assoziiert. Pathogen-erkennende Rezeptoren wie CD14 und TLR können in

Abhängigkeit von der Dosis der Pathogene und dem Zeitpunkt der Exposition zu diesen eine  $T_H1$ -gewichtete Immunantwort mit nachfolgender Bildung von vornehmlich IgG-Antikörpern induzieren<sup>18;34;65;74</sup>. Eine Vielzahl an Studien beobachtete den möglichen protektiven Effekt der frühkindlichen<sup>3;11;18;26;30;61;67;82</sup> bzw. pränatalen<sup>18;29</sup> Exposition zu Mikroorganismen auf die Entwicklung von atopischen Erkrankungen. In einer Studie wurde beobachtet, dass die Expression von TLR2 und TLR4 nach Exposition zu Allergenen in Nasenschleimhautbiopsien von Allergikern signifikant zunahm<sup>25</sup>. Verschiedene Studien zeigten einen protektiven Effekt durch die Stimulation von TLR2<sup>87;94</sup> und TLR4<sup>88</sup>. Europäische Studien stellten eine Hochregulierung von CD14, TLR2<sup>44</sup> sowie TLR4<sup>18</sup> im Blut von Kindern, die in landwirtschaftlichen Betrieben aufgewachsen sind, bei gleichzeitig erniedrigter Prävalenz für atopische Erkrankungen in dieser Subpopulation fest<sup>11;18;44</sup>. In Übereinstimmung mit diesen Studien stellten wir eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression von CD14, TLR2 und TLR4 in Probanden fest, die ein erhöhtes Risiko für atopische Erkrankungen hatten. Die erniedrigten mRNA-Expressionsniveaus für die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Pathogen-erkennenden Rezeptoren CD14, TLR2 und TLR4 in der Probandengruppe mit positiver atopischer Familienanamnese weisen indirekt auf eine mögliche Verschiebung des  $T_H1$  /  $T_H2$ -Gleichgewichtes zugunsten eines  $T_H2$ -gewichteten Immunstatus hin.

Zwar wird der Endotoxinexposition in der frühen Kindheit überwiegend eine mögliche protektive Rolle in der Entwicklung von atopischen Erkrankungen beigemessen, jedoch beschreiben einige Autoren eine symptomverstärkende Wirkung bei bereits manifestierten atopischen Erkrankungen<sup>53;90</sup>. Die proallergische Wirkung wurde vor allem in Zusammenhang mit Berufskrankheiten bei regelmäßigem Kontakt zu Baumwolle, Schweinen und Geflügel beobachtet<sup>53;88;90</sup>. In einigen Studien war die Endotoxinexposition mit verschiedenen pathologischen Symptomen wie Giemen bei nichtatopischem Asthma in Kindern verbunden<sup>11;59;61</sup>. Dieser Beobachtung stehen Studien gegenüber, die eine negative Assoziation zwischen der Exposition zu TLR-Liganden und einer Verbesserung der Symptome wie Giemen feststellten<sup>15;89</sup>. In einer weiteren Studie kam es nach inhalativer Stimulation mit LPS zur Erhöhung von Entzündungsparametern im peripheren Blut wie dem C-reaktiven Protein, dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein, dem endothelialen Selektin und der Neutrophilie bei gleichzeitigem Abfall der Ein-Sekundenkapazität in der Lungenfunktion. Vor allem bei nichtatopischen Probanden kam es zu diesen Veränderungen<sup>54</sup>. Eine weitere Studie mit atopisch erkrankten Erwachsenen zeigte eine negative Assoziation

zwischen der Intensität der Endotoxinexposition und dem Schweregrad der allergischen Sensibilisierung, gemessen an antigen-spezifischen IgE-Spiegeln<sup>27</sup>.

Beim momentanen Stand der Studien kann aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse kein eindeutiger Zusammenhang von Endotoxinkonzentrationen und atopischen Erkrankungen festgestellt werden. Dieses liegt unter anderem an der Verschiedenheit der Studiendesigns und an der unterschiedlichen Angabe der Endotoxinkonzentrationen. Bei der Methodik beschränkten sich viele Studien auf die Messung von antigen-spezifischem IgE, in älteren Studien von Gesamt-IgE, oder die Auswertung von Prick-Testungen als prädiktive Faktoren für die Beurteilung von atopischen Erkrankungen, anstatt die manifesten Symptome zu beobachten. In einer vergleichenden Studie variierte die Spezifität von IgE-Messungen in Nabelschnurblut als prädiktiver Wert für eine tatsächliche Manifestation atopischer Erkrankungen zwischen 20 – 95 % bei einer sehr niedrigen Sensitivität, sodass die Autoren IgE-Messungen in Nabelschnurblut als alleinigen Wert für die Definition atopischer Erkrankungen für ungeeignet hielten<sup>4</sup>. Bei der Messung von Endotoxinkonzentrationen gaben Autoren die Konzentration in verschiedenen Einheiten an, einige in Endotoxin Units (EU) pro Volumen Lösungsmedium, andere in EU pro Gramm Staub und wieder andere in EU pro m<sup>2</sup> der gestaubsaugten Fläche<sup>96</sup>, wobei die Konzentrationen innerhalb der Studien erhebliche Unterschiede aufwiesen. Dies sei an einem Beispiel der Studie von Gehring et al verdeutlicht, in der die gemessene Konzentrationsspanne 149 – 3.119.999 EU / m<sup>2</sup> bzw. 203 – 1.661.491 EU / g betrug, gemessen im Bodenstaub aus Wohnzimmern in deutschen Städten<sup>27</sup>. Zudem wird der direkte Vergleich der verschiedenen Studien untereinander erschwert durch die Unterschiede der Konzentrationen. In einer vergleichbaren Studie von Park et al, in der die Endotoxinkonzentrationen im Bodenstaub aus Wohnzimmern in Boston gemessen wurden, betrug die Konzentrationsspanne 2.000 – 713.000 EU / g<sup>59</sup>. Vermutlich kommt es aufgrund verschiedener Methoden bei der Probengewinnung, -lagerung und -bearbeitung sowie durch unterschiedliche Standards der Laboranalysen zu dieser Diskrepanz<sup>96</sup>.

Wie weiter oben bereits erwähnt, wurden in der vorliegenden Arbeit keine Konzentrationen von Endotoxinen gemessen, aber es konnte der Zusammenhang zwischen ländlichem oder städtischem Wohnen und der mRNA-Expressionsniveaus in den Blutproben untersucht werden. Dabei vermuteten wir, dass die erhöhten mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR2 und TLR4 in den Proben der spanischen Probanden mit dem hohen Anteil ländlichen Wohnens in dieser Subpopulation zusammenhing. Unsere Beobachtung in diesem

Zusammenhang basiert auf der Annahme, dass ländliches Wohnen mit einer höheren Exposition zu Mikroorganismen verbunden ist. Perzanowski et al führten eine Studie in New York City durch, in der sie die Assoziation von Endotoxinkonzentrationen mit atopischen Erkrankungen untersuchten. Dabei schlussfolgerten sie, dass sich die Konzentrationen von Endotoxinen in Städten gegenüber ländlichen, nicht-landwirtschaftlichen Wohngebieten nur wenig unterscheiden<sup>61</sup>. Endotoxinkonzentrationen hängen allerdings auch unter anderem von klimatischen Faktoren wie der relativen Luftfeuchtigkeit ab<sup>89</sup>. Die klimatischen Bedingungen in Spanien (warmes, sommertrockenes, subtropisches Klima) unterscheiden sich von denen in Deutschland und Ungarn (warmgemäßigtes, winterfeuchtkaltes, kontinentales Klima), wodurch vermutlich auch die Mikroorganismenflora und folglich die Einflüsse auf das Immunsystem differieren. Ferner erkennen die TLR und das CD14 neben den Endotoxinen eine Vielzahl anderer Mikroorganismen und Allergene (siehe Tab. 1.1, Kap. 1.2), die ebenfalls eine Rolle in der Modulation des Immunsystems spielen, sodass die Messung von Endotoxinkonzentrationen alleine den Einfluss der Mikroorganismen auf das Immunsystem nicht darstellen kann.

#### **5.4 Genetische Prädisposition und die Hygiene-Hypothese**

In den letzten Jahren wurde der genetischen Prädisposition des Individuums eine zunehmend größere Bedeutung in der Entwicklung von atopischen Erkrankungen beigemessen. Bislang sind mehr als 20 Loci auf verschiedenen Chromosomen bekannt, die mit atopischen Erkrankungen assoziiert sind<sup>76</sup>. Die Anzahl der assoziierten Gen-Loci deutet bereits auf die Komplexität der atopischen Erkrankungen hin. In der Genforschung der atopischen Erkrankungen gibt es viele Studien zu Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) von Genen für Pathogen-erkennende Rezeptoren. Während einige Studien eine Assoziation von atopischen Erkrankungen oder atopischer Sensibilisierung mit bestimmten SNP für die Gene von CD14<sup>9;17;38;40;45;49;58;75;86;93</sup>, TLR2<sup>2;16</sup> und TLR4<sup>22;100</sup> feststellen konnten, beobachteten andere umgekehrte<sup>75;98</sup> oder keine<sup>33;57;66;83</sup> Assoziationen. Auch hier sind die Ergebnisse widersprüchlich, wobei hierfür unter anderem Unterschiede in den Probandenpopulationen (Alter, Land, ethnische Zugehörigkeit) ursächlich sein könnten. Im Bezug auf das Alter untersuchte eine longitudinale Studie aus Australien die Assoziationen zwischen den SNP im Promotorgen von CD14 an der Nukleotidposition 159 und die Prävalenz für atopische Erkrankungen bei Probanden zwischen dem 8. und 25. Lebensjahr. Der -159CC-Genotyp war mit erhöhten antigen-spezifischen IgE-Werten, vermehrt positiven Prick-Testungen, erhöhtem

Risiko für early-onset-Atopien und bronchialer Hyperreaktivität verbunden, jedoch nur bis zum 18. Lebensjahr. Die Assoziationen konnten im 25. Lebensjahr nicht mehr beobachtet werden<sup>58</sup>. Eine andere mögliche Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse besteht darin, dass die wenigsten Studien den Zusammenhang der SNP mit den Umwelteinflüssen wie der Endotoxinexposition untersucht haben. Eder et al und Werner et al konnten dosisabhängige Effekte von Endotoxinen auf die Entwicklung von atopischen Erkrankungen im Zusammenhang mit SNP für die Gene von CD14<sup>17</sup> und TLR4<sup>16;95</sup> zeigen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass in der Pathogenese von atopischen Erkrankungen das Zusammenwirken von genetischer Prädisposition und der Zeitpunkt und die Konzentration der Exposition zu Mikroorganismen von großer Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine genetischen Analysen durchgeführt. Als Anhalt für die genetische Prädisposition wurde der Einfluss von elterlicher Atopie auf das Immunsystem der Probanden untersucht. In der Literatur wird vor allem die mütterliche Atopie als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von atopischen Erkrankungen genannt<sup>8;97</sup>.

## **5.5 Pränatale Einflüsse und die Entwicklung von atopischen Erkrankungen**

Für den protektiven Effekt der Exposition zu Mikroorganismen und Allergenen scheinen neben anderen Faktoren Zeitpunkt und Dosis der Exposition ausschlaggebend zu sein<sup>39;53;90;102</sup>. Während die Exposition zu Endotoxinen bei bereits bestehender atopischer Erkrankung die Symptome verstärken<sup>53;90</sup> und bei Kindern bis zum 2. Lebensjahr häufiger pathologische Atemgeräusche wie Giemen verursachen kann<sup>11;59;99</sup>, scheint die frühkindliche Exposition einen protektiven Effekt auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen in der späteren Kindheit zu haben<sup>11;18;44;53;87;90;94;99</sup>. Ebenso kann die pränatale Exposition zu Mikroorganismen und Allergenen die Entwicklung von atopischen Erkrankungen beeinflussen<sup>10;18;29;81</sup>. Bei den Untersuchungen zum prä- und perinatalen Einfluss von Allergenen gibt es widersprüchliche Aussagen. Während Allergene im Allgemeinen eher als proatopische Faktoren betrachtet wurden<sup>12;29;81;102</sup>, konnte in einer Studie keine Assoziationen beispielsweise zu Asthma gefunden werden<sup>43</sup>. Andere Autoren wiederum berichteten, wenn auch nicht pränatal, sondern in der Kindheit, von einem protektiven Effekt durch bestimmte Allergene wie das Fel d1 von Katzen<sup>102</sup>. Die Widersprüche könnten aufgrund von unterschiedlicher Art und Dosis der Allergenexposition entstanden sein. Eine Studie beschrieb

die zeitliche Abhängigkeit der Allergenexposition, die in den ersten Lebensjahren mit rekurrendem Giemen assoziiert war, im späteren Kindesalter jedoch nicht mehr<sup>99</sup>.

Die pränatale Endotoxinexposition wurde mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung atopischer Erkrankungen assoziiert<sup>10;18;29</sup>. Ege et al beobachteten erhöhte mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR2 und TLR4 in Kindern landwirtschaftlicher Betriebe, die gleichzeitig eine geringere atopische Sensibilisierung, gemessen an antigenspezifischen IgE, aufwiesen<sup>18</sup>. Diese Beobachtung stimmt überein mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In den Blutproben der Probanden mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung atopischer Erkrankungen wurden erniedrigte mRNA-Konzentrationen von CD14, TLR2 und TLR4 nachgewiesen. Ege et al untersuchten ferner den Zusammenhang vom ersten Kontakt zu Farmtieren und der atopischen Sensibilisierung, wobei die antigenspezifischen IgE-Niveaus niedriger waren, je früher der Kontakt stattfand mit dem niedrigsten Niveau bei Kontakt *in utero* durch Stallarbeiten der Mutter während der Schwangerschaft. Auch die mRNA-Expressionsniveaus für CD14, TLR2 und TLR4 waren signifikant höher bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft im Stall tätig waren. Sie schlussfolgerten, dass die pränatale Exposition zu Mikroorganismen einen größeren Effekt hat als die in der frühen Kindheit<sup>18</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde eine umgekehrte Assoziation für die mRNA-Expressionen von CD14, TLR2 und TLR4 und der positiven atopischen Familienanamnese sowohl bei den Müttern wie auch bei den Neugeborenen beobachtet. Als jedoch die mütterlichen mit den neonatalen mRNA-Expressionen als Anhalt für den direkten Einfluss *in utero* im Zusammenhang mit der atopischen Familienanamnese untersucht wurden, zeigte sich eine signifikante Korrelation für alle drei Marker nur bei negativer atopischer Familienanamnese. Bei positiver Familienanamnese korrelierten nur die mRNA-Expressionsniveaus für TLR4 miteinander.

Ursächlich für diese Beobachtungen hinsichtlich der Korrelationen bei Kindern mit positiver atopischer Familienanamnese könnte ein von Wjst hypothetisch beschriebener T<sub>H</sub>1-Maturationsdefekt sein. Wjst stellte die Hypothese auf, dass die Entstehung asthmatischer Erkrankungen einerseits von einem T<sub>H</sub>1-Maturationsdefekt, andererseits von einem T<sub>H</sub>1-Triggerdefekt abhängen könnte. Er verdeutlichte seine Hypothese anhand einer Studie von Celedon et al, bei der die Autoren den frühkindlichen Besuch einer Tagesstätte – als Anhalt einer erhöhten Exposition zu Erregern von Atemwegserkrankungen – und eine mütterliche Asthmaerkrankung mit der Entwicklung des kindlichen Asthmas im 6. Lebensjahr

assoziierten. Dabei war die Asthmaprävalenz bei Kindern mit asthmatischen Müttern erhöht ( $T_H1$ -Maturationsdefekt), hingegen bei Kindern nichtasthmatischer Müttern erniedrigt (nicht- $T_H1$ -Triggerdefekt)<sup>13;97</sup>. Inwieweit der hypothetische  $T_H1$ -Maturationsdefekt in dieser Studie durch beispielsweise Einzelnukleotid-Polymorphismen bedingt war, kann nicht beurteilt werden. Es kann jedoch sein, dass dieser  $T_H1$ -Maturationsdefekt aufgrund eines direkten Einflusses *in utero* durch den mütterlichen Immunstatus auf das kindliche Immunsystem entstanden ist. Amoudruz et al beobachteten eine signifikant erniedrigte Expression von TLR2 und TLR4 auf Monozyten in Nabelschnurblut von Kindern im Vergleich zu ihren allergischen Müttern, allerdings nicht für CD14. Die Expression dieser Rezeptoren war in der Vergleichsgruppe bei Kindern gegenüber ihren nichtallergischen Müttern nicht signifikant verschieden<sup>5</sup>. In der vorliegenden Arbeit könnte es demnach sein, dass die Korrelation zwischen neonatalen und mütterlichen mRNA-Expressionsniveaus von CD14, TLR2 und TLR4, die wir in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der Familienanamnese und bei negativer atopischer Familienanamnese beobachtet haben, bei den Nabelschnurblutproben von atopischen Müttern aufgrund von *in utero*-Einflüssen durch den atopischen Immunstatus der Mutter aufgehoben wurde ( $T_H1$ -Maturationsdefekt).

## 5.6 Regulierung des Immunsystems – Eine erweiterte Hygiene-Hypothese?

Die Hygiene-Hypothese wird allgemein als ein plausibles Modell für die erhöhte Prävalenz atopischer Erkrankungen angesehen, gleichzeitig wird sie jedoch kontrovers diskutiert<sup>20;31;73</sup>. Ein Gegenargument begründet sich durch die Beobachtung, dass parallel zu den atopischen Erkrankungen, die mit einer  $T_H2$ -typischen Immunantwort assoziiert sind, auch die Prävalenz für  $T_H1$ -gewichtete Erkrankungen wie den Typ I - Diabetes mellitus, die Multiple Sklerose, den Morbus Crohn und anderen Autoimmunerkrankungen ebenfalls über die letzten Dekaden angestiegen ist<sup>20;24;39;92;96</sup>. So wurde in Niedersachsen eine Verdoppelung der Inzidenz für die Multiple Sklerose zwischen den Jahren 1969 und 1986 beobachtet. Die Inzidenz für den Morbus Crohn verdreifachte sich in Nordeuropa zwischen den fünfziger und neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts<sup>7;23</sup>. Ein solcher Anstieg scheint zwar wahr zu sein, jedoch muss dabei die verbesserte Möglichkeit der Diagnostik berücksichtigt werden<sup>24</sup>. Der Anstieg der Prävalenz für atopische Erkrankungen wurde vor allem in den Jahren 1964 bis 1983 gezeigt, wobei jetzt ein Plateau erreicht worden zu sein scheint<sup>97</sup>. Ein weiteres Gegenargument besteht aufgrund von Studien, die eine erniedrigte Prävalenz für atopische Erkrankungen in endemischen



Gebieten helminthischer Infektionen, die ebenfalls durch eine  $T_H2$ -typische Immunantwort charakterisiert sind, feststellten<sup>20;73;77;97</sup>.

Diese Beobachtungen für die parallel zu atopischen Erkrankungen gestiegene Prävalenz von Autoimmunerkrankungen und für den protektiven Effekt helminthischer Infektionen auf die Entstehung atopischer Erkrankungen führten zu der Theorie, dass nicht das veränderte  $T_H1/T_H2$ -Gleichgewicht des Immunsystems durch den fehlenden Triggereffekt bei geringerer Exposition zu Mikroorganismen für die Entwicklung von atopischen Erkrankungen verantwortlich ist. Vielmehr wird angenommen, dass die geringere Mikroorganismusexposition zu einem Verlust regulatorischer Funktionen des Immunsystems führt, wodurch die  $T_H1/T_H2$ -Balance sekundär verändert wird<sup>20;56;73;84;90;96</sup>. Das regulatorische System ist sehr komplex, und die einzelnen Mechanismen sind bislang noch nicht vollständig erforscht. Unter anderem besteht es aus den  $T_{reg}$ -Lymphozyten wie den  $CD4^+ CD25^+$  T-Lymphozyten, den  $T_R1$ -Lymphozyten und den  $T_H3$ -Lymphozyten<sup>36;73</sup>. Die Expression von TLR wurde auch auf regulatorischen Zellen beschrieben<sup>84</sup>. Durch die Erkennung von Mikroorganismen durch die TLR können regulatorische T-Lymphozyten entweder direkt durch die exprimierten TLR oder indirekt durch sezernierte Zytokine beispielsweise von dendritischen Zellen oder Makrophagen aktiviert beziehungsweise inaktiviert werden<sup>34;36;50;79;80;84;90;96</sup>.  $T_{reg}$ -Lymphozyten sezernieren Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  und können sowohl  $T_H1$ - als auch  $T_H2$ -Immunantworten supprimieren<sup>36</sup>.

In diesem Zusammenhang beschrieben Schaub et al eine erhöhte Expression von IL-10 und erhöhten mRNA-Expressionsniveaus von  $T_{reg}$ -Lymphozyten-assoziierten Markern (Foxp3, CTLA4) im Nabelschnurblut von Kindern mit nichtatopischen Müttern verglichen mit den Nabelschnurblutproben von Kindern mit atopischen Müttern nach Stimulation der Monozyten mit dem TLR2-Liganden Ppg<sup>79</sup>. Tulic et al stimulierten Nasenschleimhautbiopsien von atopischen Kindern und Erwachsenen mit Allergenen und dem TLR4-Liganden LPS. Die Aktivierung von TLR4 über die Exposition zu LPS führte bei den kindlichen Proben, nicht jedoch bei den Erwachsenen zu einer Suppression der  $T_H2$ -typischen und zu einer Induktion einer  $T_H1$ -gewichteten Immunantwort bei gleichzeitig erhöhten mRNA-Expressionsniveaus von IL-10. Durch die Zugabe von Antikörpern gegen IL-10 und IL-12 wurde der Effekt auf die Immunantwort aufgehoben, was auf einen synergistischen Effekt dieser Zytokine auf den antiallergischen Effekt hinweist<sup>88</sup>. Dass der antiallergische Effekt in der Studie von Tulic et al nur bei den atopischen Kindern und nicht bei den Erwachsenen auftrat, lag vermutlich an der

Empfänglichkeit des sich noch entwickelnden Immunsystems der Kinder<sup>96</sup>. In einer weiteren Studie zeigten Amoudruz et al eine verminderte Sekretion von IL-6 bei Kindern mit atopischen Müttern. Antigenpräsentierende Zellen können IL-6 sezernieren und dadurch die Aktivität von T<sub>reg</sub>-Lymphozyten hemmen<sup>5</sup>. Somit scheint auch das regulatorische System eine Rolle bei der Entstehung von atopischen Erkrankungen zu spielen.

Zusammenfassend kann man hypothesieren, dass die frühkindliche bzw. bereits *in utero*-Exposition zu TLR-Liganden wie dem LPS der Entstehung atopischer Erkrankungen vorbeugen kann, indem sie das T<sub>H</sub>1- / T<sub>H</sub>2-Gleichgewicht herstellt und / oder indem sie die Entwicklung des regulatorischen Systems mit T<sub>reg</sub>-Lymphozyten unterstützt<sup>96</sup>.

## 6. Zusammenfassung

Der Kontakt mit Mikroorganismen im frühen Kindesalter oder bereits *in utero* kann die Entwicklung des Immunsystems und folglich die Entstehung von atopischen Erkrankungen beeinflussen. Toll-like Rezeptoren (TLR) - wie das TLR2 und TLR4 - und das Cluster of Differentiation 14 (CD14) sind maßgeblich an der Erkennung von Mikroorganismen beteiligt. Wir stellten die Hypothese auf, dass mütterliche Allergien mit erniedrigten mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 im Blut der Mütter sowie im Nabelschnurblut ihrer Kinder einhergehen.

Für die vorliegende Arbeit konnten im Rahmen einer europäischen Multizentrum-Studie 185 gesunde schwangere Probandinnen aus Deutschland (n = 48), Ungarn (n = 50) und Spanien (n = 87) untersucht werden. Bei Geburt wurde peripheres Blut der Probandinnen sowie Nabelschnurblut derer Kinder gewonnen. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde mittels Real-Time RT-PCR die mRNA-Expression von TLR2, TLR4 und CD14 quantifiziert. Bei 42 Nabelschnurblutproben in der deutschen Subpopulation bestimmten wir außerdem den Anteil der TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-und CD14<sup>+</sup>-Monozyten in der Durchflusszytometrie. Zur Auswertung wurden bivariate und multivariate Regressionsanalysen durchgeführt.

Mütterliche Allergien waren assoziiert mit signifikant erniedrigten mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 in mütterlichem sowie im Nabelschnurblut. Ferner korrelierten die mRNA-Expressionsniveaus in mütterlichem Blut signifikant mit denen in fetalem Blut. Der durchflusszytometrisch untersuchte Prozentsatz der TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-und CD14<sup>+</sup>-Monozyten korrelierte mit den dazugehörigen mRNA-Expressionsniveaus für TLR2 (r = 0,5 ; p < 0,01) und TLR4 (r = 0,61 ; p < 0,01), jedoch nicht mit CD14 (r = 0,1 ; p = 0,34).

## Schlussfolgerungen:

- Die mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 waren signifikant erniedrigt in peripherem Blut von allergischen gegenüber den gesunden Probandinnen.
- Die mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 in Nabelschnurblut waren signifikant erniedrigt, wenn eine positive elterliche Allergieranamnese bestand, wobei die mütterliche Allergie eine höhere Assoziation mit erniedrigten mRNA-Expressionsniveaus als die väterliche Allergie zeigte.
- Die mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 in mütterlichem Blut korrelierten mit den Expressionsniveaus im Nabelschnurblut. Eine signifikante Korrelation war jedoch nur bei negativer atopischer Familienanamnese zu beobachten. Bei positiver atopischer Familienanamnese war nur die Korrelation der mRNA-Expressionsniveaus für TLR4 signifikant.
- Die mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 variierte in unserer Studie je nach Nationalität, wobei die spanischen Proben die höchsten mRNA-Expressionsniveaus aufwiesen.
- Die mRNA-Expressionsniveaus für TLR2, TLR4 und CD14 waren signifikant erniedrigt bei Probandinnen, die aus städtischen Wohngebieten stammten, gegenüber denen, die in ländlichen Gebieten wohnten.
- Eine Supplementation mit Fischölen in der Schwangerschaft hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von TLR2, TLR4 und CD14.
- Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass die mütterliche Allergie einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von Allergien in Kindern hat. Möglicherweise sind bereits *in utero*-Effekte über die Regulation der TLR oder ihrer Signalwege ein bedeutendes Glied in der Pathogenese allergischer Erkrankungen. Es wäre daher wichtig, weitere Studien durchzuführen, bei denen die Konzentrationen von TLR-Liganden in der Umwelt während der Schwangerschaft und die genetischen Prädispositionen berücksichtigt werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Agrawal, S., A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke, and B. Pulendran. 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J.Immunol.* 171:4984-4989.
2. Ahmad-Nejad, P., S. Mrabet-Dahbi, K. Breuer, M. Klotz, T. Werfel, U. Herz, K. Heeg, M. Neumaier, and H. Renz. 2004. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:565-567.
3. Alfven, T., C. Braun-Fahrlander, B. Brunekreef, E. von Mutius, J. Riedler, A. Scheynius, M. van Hage, M. Wickman, M. R. Benz, J. Budde, K. B. Michels, D. Schram, E. Ublagger, M. Waser, and G. Pershagen. 2006. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. *Allergy* 61:414-421.
4. Allam, J. P., O. Zivanovic, C. Berg, U. Gembruch, T. Bieber, and N. Novak. 2005. In search for predictive factors for atopy in human cord blood. *Allergy* 60:743-750.
5. Amoudruz, P., U. Holmlund, V. Malmstrom, C. Trollmo, K. Bremme, A. Scheynius, and E. Sverremark-Ekstrom. 2005. Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy? *J.Allergy Clin.Immunol.* 115:1304-1310.

6. Arbour, N. C., E. Lorenz, B. C. Schutte, J. Zabner, J. N. Kline, M. Jones, K. Frees, J. L. Watt, and D. A. Schwartz. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat.Genet.* 25:187-191.
7. Bach, J. F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347:911-920.
8. Backlund, A. B., M. S. Perzanowski, T. Platts-Mills, T. Sandstrom, B. Lundback, and E. Ronmark. 2006. Asthma during the primary school ages--prevalence, remission and the impact of allergic sensitization. *Allergy* 61:549-555.
9. Baldini, M., I. C. Lohman, M. Halonen, R. P. Erickson, P. G. Holt, and F. D. Martinez. 1999. A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:976-983.
10. Blumer, N., U. Herz, M. Wegmann, and H. Renz. 2005. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin.Exp.Allergy* 35:397-402.
11. Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. P. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak, and E. von Mutius. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N.Engl.J.Med.* 347:869-877.
12. Brussee, J. E., H. A. Smit, R. T. van Strien, K. Corver, M. Kerkhof, A. H. Wijga, R. C. Aalberse, D. Postma, J. Gerritsen, D. E. Grobbee, J. C. de Jongste, and B.

- Brunekreef. 2005. Allergen exposure in infancy and the development of sensitization, wheeze, and asthma at 4 years. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115:946-952.
13. Celedon, J. C., R. J. Wright, A. A. Litonjua, D. Sredl, L. Ryan, S. T. Weiss, and D. R. Gold. 2003. Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 167:1239-1243.
  14. Dillon, S., A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, and B. Pulendran. 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J.Immunol.* 172:4733-4743.
  15. Douwes, J., R. van Strien, G. Doekes, J. Smit, M. Kerkhof, J. Gerritsen, D. Postma, J. de Jongste, N. Travier, and B. Brunekreef. 2006. Does early indoor microbial exposure reduce the risk of asthma? The Prevention and Incidence of Asthma and Mite Allergy birth cohort study. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:1067-1073.
  16. Eder, W., W. Klimecki, L. Yu, E. von Mutius, J. Riedler, C. Braun-Fahrlander, D. Nowak, and F. D. Martinez. 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:482-488.
  17. Eder, W., W. Klimecki, L. Yu, E. von Mutius, J. Riedler, C. Braun-Fahrlander, D. Nowak, and F. D. Martinez. 2005. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116:601-607.
  18. Ege, M. J., C. Bieli, R. Frei, R. T. van Strien, J. Riedler, E. Ublagger, D. Schram-Bijkerk, B. Brunekreef, M. van Hage, A. Scheynius, G. Pershagen, M. R. Benz, R.

- Lauener, E. von Mutius, and C. Braun-Fahrlander. 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.* 117:817-823.
19. Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick, and K. Bottomly. 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J.Exp.Med.* 196:1645-1651.
20. Elston, D. M. 2006. The hygiene hypothesis and atopy: bring back the parasites? *J.Am.Acad.Dermatol.* 54:172-179.
21. Espinoza, J., R. Romero, T. Chaiworapongsa, J. C. Kim, J. Yoshimatsu, S. Edwin, C. Rathnasabapathy, J. Tolosa, A. Donnenfeld, F. Craparo, R. Gomez, and E. Bujold. 2002. Lipopolysaccharide-binding protein in microbial invasion of the amniotic cavity and human parturition. *J.Matern.Fetal Neonatal Med.* 12:313-321.
22. Fageras, B. M., M. Hmani-Aifa, A. Lindstrom, M. C. Jenmalm, X. M. Mai, L. Nilsson, H. A. Zdzienicka, B. Bjorksten, P. Soderkvist, and O. Vaarala. 2004. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J.Allergy Clin.Immunol.* 114:561-567.
23. Farrokhyar, F., E. T. Swarbrick, and E. J. Irvine. 2001. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol.* 36:2-15.
24. Feillet, H. and J. F. Bach. 2004. Increased incidence of inflammatory bowel disease: the price of the decline of infectious burden? *Curr.Opin.Gastroenterol.* 20:560-564.



25. Fransson, M., M. Adner, J. Erjefalt, L. Jansson, R. Uddman, and L. O. Cardell. 2005. Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis. *Respir.Res.* 6:100.
26. Gehring, U., W. Bischof, B. Fahlbusch, H. E. Wichmann, and J. Heinrich. 2002. House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:939-944.
27. Gehring, U., W. Bischof, G. Schlenvoigt, K. Richter, B. Fahlbusch, H. E. Wichmann, and J. Heinrich. 2004. Exposure to house dust endotoxin and allergic sensitization in adults. *Allergy* 59:946-952.
28. Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon, and C. Mathieu. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386-401.
29. Heinrich, J., G. Bolte, B. Holscher, J. Douwes, I. Lehmann, B. Fahlbusch, W. Bischof, M. Weiss, M. Borte, and H. E. Wichmann. 2002. Allergens and endotoxin on mothers' mattresses and total immunoglobulin E in cord blood of neonates. *Eur.Respir.J.* 20:617-623.
30. Horak, F., Jr., M. Studnicka, C. Gartner, A. Veiter, E. Tauber, R. Urbanek, and T. Frischer. 2002. Parental farming protects children against atopy: longitudinal evidence involving skin prick tests. *Clin.Exp.Allergy* 32:1155-1159.
31. Horner, A. A. 2006. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:1133-1140.
32. Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279-284.

33. Hui, L., X. W. Cheung, H. C. Kiat, L. J. Jun, L. C. Wei, B. Lim, and W. D. Yun. 2006. CD14 promoter polymorphisms have no functional significance and are not associated with atopic phenotypes. *Pharmacogenet.Genomics* 16:229-236.
34. Iwasaki, A. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 5:987-995.
35. Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
36. Janeway, C. 2005. Immunobiology - The immune system in health and disease. 6th edition. Garland Science, New York.
37. Jones, C. A., J. A. Holloway, E. J. Popplewell, N. D. Diaper, J. W. Holloway, G. H. Vance, J. A. Warner, and J. O. Warner. 2002. Reduced soluble CD14 levels in amniotic fluid and breast milk are associated with the subsequent development of atopy, eczema, or both. *J.Allergy Clin.Immunol.* 109:858-866.
38. Kabesch, M., K. Hasemann, V. Schickinger, I. Tzotcheva, A. Bohnert, D. Carr, M. Baldini, H. Hackstein, W. Leupold, S. K. Weiland, F. D. Martinez, E. Mutius, and G. Bein. 2004. A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. *Allergy* 59:520-525.
39. Kabesch, M. and R. P. Lauener. 2004. Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis. *J.Leukoc.Biol.* 75:383-387.
40. Koppelman, G. H., N. E. Reijmerink, S. O. Colin, T. D. Howard, P. A. Whittaker, D. A. Meyers, D. S. Postma, and E. R. Bleeker. 2001. Association of a promoter

- polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:965-969.
41. Krauss-Etschmann, S., D. Hartl, J. Heinrich, A. Thaqi, C. Prell, C. Campoy, F. S. Molina, A. Hector, T. Decsi, D. J. Schendel, and B. V. Koletzko. 2006. Association between levels of Toll-like receptors 2 and 4 and CD14 mRNA and allergy in pregnant women and their offspring. *Clin.Immunol.* 118:292-299.
  42. Krauss-Etschmann, S., Shadid, R., Campoy, C., Hoster, E., Demmelmair, H., Jiménez, M., Gil, A., Rivero, M., Veszprémi, B., Decsi, T., Koletzko, B. V., and NUHEAL study group. Effects of fish oil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal DHA and EPA plasma levels - a randomized European multicenter trial. 200x. Ref Type: Unpublished Work
  43. Lau, S., S. Illi, C. Sommerfeld, B. Niggemann, R. Bergmann, E. von Mutius, and U. Wahn. 2000. Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet* 356:1392-1397.
  44. Lauener, R. P., T. Birchler, J. Adamski, C. Braun-Fahrlander, A. Bufe, U. Herz, E. von Mutius, D. Nowak, J. Riedler, M. Waser, and F. H. Sennhauser. 2002. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 360:465-466.
  45. Leung, T. F., N. L. Tang, Y. M. Sung, A. M. Li, G. W. Wong, I. H. Chan, and C. W. Lam. 2003. The C-159T polymorphism in the CD14 promoter is associated with serum total IgE concentration in atopic Chinese children. *Pediatr.Allergy Immunol.* 14:255-260.

46. LeVan, T. D., J. W. Bloom, T. J. Bailey, C. L. Karp, M. Halonen, F. D. Martinez, and D. Vercelli. 2001. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J.Immunol.* 167:5838-5844.
47. LeVan, T. D., S. Guerra, W. Klimecki, M. M. Vasquez, I. C. Lohman, F. D. Martinez, M. Halonen, and A. L. Wright. 2006. The impact of CD14 polymorphisms on the development of soluble CD14 levels during infancy. *Genes Immun.* 7:77-80.
48. Levy, O. 2005. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *J.Endotoxin.Res.* 11:113-116.
49. Litonjua, A. A., K. Belanger, J. C. Celedon, D. K. Milton, M. B. Bracken, P. Kraft, E. W. Triche, D. L. Sredl, S. T. Weiss, B. P. Leaderer, and D. R. Gold. 2005. Polymorphisms in the 5' region of the CD14 gene are associated with eczema in young children. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115:1056-1062.
50. Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F. Y. Liew. 2006. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:7048-7053.
51. Martin, T. R. and C. W. Frevert. 2005. Innate immunity in the lungs. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:403-411.
52. Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School 1994. Kap. 4.2 ; A.3D. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, editors Current protocols in molecular biology Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York.

53. Michel, O. 2003. Role of lipopolysaccharide (LPS) in asthma and other pulmonary conditions. *J.Endotoxin.Res.* 9:293-300.
54. Michel, O., M. Dentener, F. Corazza, W. Buurman, and R. Rylander. 2001. Healthy subjects express differences in clinical responses to inhaled lipopolysaccharide that are related with inflammation and with atopy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 107:797-804.
55. Michel, O., T. D. LeVan, D. Stern, M. Dentener, J. Thorn, D. Gnat, M. L. Beijer, P. Cochaux, P. G. Holt, F. D. Martinez, and R. Rylander. 2003. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112:923-929.
56. Netea, M. G., J. W. Van der Meer, R. P. Suttmuller, G. J. Adema, and B. J. Kullberg. 2005. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49:3991-3996.
57. Noguchi, E., F. Nishimura, H. Fukai, J. Kim, K. Ichikawa, M. Shibasaki, and T. Arinami. 2004. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin.Exp.Allergy* 34:177-183.
58. O'Donnell, A. R., B. G. Toelle, G. B. Marks, C. M. Hayden, I. A. Laing, J. K. Peat, J. Goldblatt, and P. N. Le Souef. 2004. Age-specific relationship between CD14 and atopy in a cohort assessed from age 8 to 25 years. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 169:615-622.
59. Park, J. H., D. R. Gold, D. L. Spiegelman, H. A. Burge, and D. K. Milton. 2001. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:322-328.

60. Patel, M., D. Xu, P. Kewin, B. Choo-Kang, C. McSharry, N. C. Thomson, and F. Y. Liew. 2005. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J.Immunol.* 174:7558-7563.
61. Perzanowski, M. S., R. L. Miller, P. S. Thorne, R. G. Barr, A. Divjan, B. J. Sheares, R. S. Garfinkel, F. P. Perera, I. F. Goldstein, and G. L. Chew. 2006. Endotoxin in inner-city homes: associations with wheeze and eczema in early childhood. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:1082-1089.
62. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
63. Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36.
64. Prescott, S. L., C. Macaubas, T. Smallacombe, B. J. Holt, P. D. Sly, and P. G. Holt. 1999. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353:196-200.
65. Pulendran, B. 2005. Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J.Immunol.* 174:2457-2465.
66. Raby, B. A., W. T. Klimecki, C. Laprise, Y. Renaud, J. Faith, M. Lemire, C. Greenwood, K. M. Weiland, C. Lange, L. J. Palmer, R. Lazarus, D. Vercelli, D. J. Kwiatkowski, E. K. Silverman, F. D. Martinez, T. J. Hudson, and S. T. Weiss. 2002. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:1449-1456.

67. Radon, K., V. Ehrenstein, G. Praml, and D. Nowak. 2004. Childhood visits to animal buildings and atopic diseases in adulthood: an age-dependent relationship. *Am.J.Ind.Med.* 46:349-356.
68. Re, F. and J. L. Strominger. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J.Biol.Chem.* 276:37692-37699.
69. Re, F. and J. L. Strominger. 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J.Immunol.* 173:7548-7555.
70. Redecke, V., H. Hacker, S. K. Datta, A. Fermin, P. M. Pitha, D. H. Broide, and E. Raz. 2004. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J.Immunol.* 172:2739-2743.
71. Revets, H., G. Pynaert, J. Grooten, and P. De Baetselier. 2005. Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J.Immunol.* 174:1097-1103.
72. Rodriguez, D., A. C. Keller, E. L. Faquim-Mauro, M. S. de Macedo, F. Q. Cunha, J. Lefort, B. B. Vargaftig, and M. Russo. 2003. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J.Immunol.* 171:1001-1008.
73. Romagnani, S. 2004. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112:352-363.

74. Sabroe, I., L. C. Parker, A. G. Wilson, M. K. Whyte, and S. K. Dower. 2002. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin.Exp.Allergy* 32:984-989.
75. Sackesen, C., C. Karaaslan, O. Keskin, N. Tokol, F. Tahan, E. Civelek, O. U. Soyer, G. Adalioglu, A. Tuncer, E. Birben, C. Oner, and O. Kalayci. 2005. The effect of polymorphisms at the CD14 promoter and the TLR4 gene on asthma phenotypes in Turkish children with asthma. *Allergy* 60:1485-1492.
76. Salvatore, S., K. Keymolen, B. Hauser, and Y. Vandenplas. 2005. Intervention during pregnancy and allergic disease in the offspring. *Pediatr.Allergy Immunol.* 16:558-566.
77. Schafer, T., T. Meyer, J. Ring, H. E. Wichmann, and J. Heinrich. 2005. Worm infestation and the negative association with eczema (atopic/nonatopic) and allergic sensitization. *Allergy* 60:1014-1020.
78. Schaub, B., A. Bellou, F. K. Gibbons, G. Velasco, M. Campo, H. He, Y. Liang, M. W. Gillman, D. Gold, S. T. Weiss, D. L. Perkins, and P. W. Finn. 2004. TLR2 and TLR4 stimulation differentially induce cytokine secretion in human neonatal, adult, and murine mononuclear cells. *J.Interferon Cytokine Res.* 24:543-552.
79. Schaub, B., M. Campo, H. He, D. Perkins, M. W. Gillman, D. R. Gold, S. Weiss, E. Lieberman, and P. W. Finn. 2006. Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. *Respir.Res.* 7:40.
80. Schaub, B., R. Lauener, and E. von Mutius. 2006. The many faces of the hygiene hypothesis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:969-977.



81. Schonberger, H. J., E. Dompeling, J. A. Knottnerus, S. Kuiper, C. van Weel, and C. P. Schayck. 2005. Prenatal exposure to mite and pet allergens and total serum IgE at birth in high-risk children. *Pediatr.Allergy Immunol.* 16:27-31.
82. Schram-Bijkerk, D., G. Doekes, M. Boeve, J. Douwes, J. Riedler, E. Ublagger, E. von Mutius, J. Budde, G. Pershagen, M. van Hage, M. Wickman, C. Braun-Fahrlander, M. Waser, and B. Brunekreef. 2006. Nonlinear relations between house dust mite allergen levels and mite sensitization in farm and nonfarm children. *Allergy* 61:640-647.
83. Sengler, C., A. Haider, C. Sommerfeld, S. Lau, M. Baldini, F. Martinez, U. Wahn, and R. Nickel. 2003. Evaluation of the CD14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort. *Clin.Exp.Allergy* 33:166-169.
84. Sutmuller, R. P., M. H. den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea, and G. J. Adema. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J.Clin.Invest* 116:485-494.
85. Takeda, K. and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 17:1-14.
86. Tan, C. Y., Y. L. Chen, L. S. Wu, C. F. Liu, W. T. Chang, and J. Y. Wang. 2006. Association of CD14 promoter polymorphisms and soluble CD14 levels in mite allergen sensitization of children in Taiwan. *J.Hum.Genet.* 51:59-67.
87. Taylor, R. C., P. Richmond, and J. W. Upham. 2006. Toll-like receptor 2 ligands inhibit T(H)2 responses to mite allergen. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117:1148-1154.

88. Tulic, M. K., P. O. Fiset, J. J. Manoukian, S. Frenkiel, F. Lavigne, D. H. Eidelman, and Q. Hamid. 2004. Role of toll-like receptor 4 in protection by bacterial lipopolysaccharide in the nasal mucosa of atopic children but not adults. *Lancet* 363:1689-1697.
89. van Strien, R. T., R. Engel, O. Holst, A. Bufe, W. Eder, M. Waser, C. Braun-Fahrlander, J. Riedler, D. Nowak, and E. von Mutius. 2004. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:860-867.
90. Vandebulcke, L., C. Bachert, P. Van Cauwenberge, and S. Claeys. 2006. The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 139:159-165.
91. Velasco, G., M. Campo, O. J. Manrique, A. Bellou, H. He, R. S. Arestides, B. Schaub, D. L. Perkins, and P. W. Finn. 2005. Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 32:218-224.
92. Vercelli, D. 2004. Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:381-386.
93. Vercelli, D., M. Baldini, and F. Martinez. 2001. The monocyte/IgE connection: may polymorphisms in the CD14 gene teach us about IgE regulation? *Int.Arch.Allergy Immunol.* 124:20-24.
94. Weigt, H., P. F. Muhlradt, M. Larbig, N. Krug, and A. Braun. 2004. The Toll-like receptor-2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 cooperates with IFN-

- gamma to reverse the Th2 skew in an in vitro allergy model. *J.Immunol.* 172:6080-6086.
95. Werner, M., R. Topp, K. Wimmer, K. Richter, W. Bischof, M. Wjst, and J. Heinrich. 2003. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112:323-330.
96. Williams, L. K., D. R. Ownby, M. J. Maliarik, and C. C. Johnson. 2005. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 94:323-332.
97. Wjst, M. 2004. Is the increase in allergic asthma associated with an inborn Th1 maturation or with an environmental Th1 trigger defect? *Allergy* 59:148-150.
98. Woo, J. G., A. Assa'ad, A. B. Heizer, J. A. Bernstein, and G. K. Hershey. 2003. The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112:438-444.
99. Wright, A. L. 2004. The epidemiology of the atopic child: who is at risk for what? *J.Allergy Clin.Immunol.* 113:S2-S7.
100. Yang, I. A., S. J. Barton, S. Rorke, J. A. Cakebread, T. P. Keith, J. B. Clough, S. T. Holgate, and J. W. Holloway. 2004. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun.* 5:41-45.
101. Yang, I. A., K. M. Fong, S. T. Holgate, and J. W. Holloway. 2006. The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 6:23-28.

102. Zeldin, D. C., P. Eggleston, M. Chapman, G. Piedimonte, H. Renz, and D. Peden.  
2006. How exposures to biologics influence the induction and incidence of asthma.  
*Environ.Health Perspect.* 114:620-626.

## 7.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1.1 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	12
Tabelle 3.1 Verwendete Primer-Paare	30
Tabelle 4.1 Merkmale der Studienpopulation	42
Tabelle 4.2 Geometrische Mittelwerte der mütterlichen mRNA-Expressionsniveaus	43
Tabelle 4.3 Adjustierte Daten für geometrische Mittelwerte der mütterlichen mRNA-Expressionsniveaus	45
Tabelle 4.4 Geometrische Mittelwerte der neonatalen mRNA-Expressionsniveaus	46
Tabelle 4.5 Adjustierte Daten für geometrische Mittelwerte der neonatalen mRNA-Expressionsniveaus	47

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abbildung 1.1	Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	12
Abbildung 1.2	Überblick der Toll-like Rezeptoren-Signalwege (Quelle: Martin et al 2005)	14
Abbildung 3.1	Schichten nach Ultrazentrifuge	27
Abbildung 3.2	Amplifizierung am iCycler	32
Abbildung 3.3	Schmelzkurvenanalyse	33
Abbildung 3.4	<i>melting-peak</i> -Darstellung der Schmelzkurvenanalyse	34
Abbildung 4.1	Studienpopulation	41
Abbildung 4.2	CD14 - mRNA-Expressionsniveaus von Müttern und Neugeborenen	49
Abbildung 4.3	TLR2 - mRNA-Expressionsniveaus von Müttern und Neugeborenen	49
Abbildung 4.4	TLR4 - mRNA-Expressionsniveaus von Müttern und Neugeborenen	50
Abbildung 4.5	Monozytenabgrenzung in Nabelschnurblut	51
Abbildung 4.6	TLR2 <sup>+</sup> -Expression auf Monozyten in Nabelschnurblut	52
Abbildung 4.7	TLR4 <sup>+</sup> -Expression auf Monozyten in Nabelschnurblut	52
Abbildung 4.8	CD14 <sup>+</sup> -Expression auf Monozyten in Nabelschnurblut	53
Abbildung 4.9	Korrelation von TLR4 - mRNA-Expressionsniveaus und TLR4 <sup>+</sup> - Monozyten in Nabelschnurblut	54
Abbildung 4.10	Korrelation von TLR2 - mRNA-Expressionsniveaus und TLR2 <sup>+</sup> - Monozyten in Nabelschnurblut	54
Abbildung 4.11	Korrelation von CD14 - mRNA-Expressionsniveaus und CD14 <sup>+</sup> - Monozyten in Nabelschnurblut	55

## 7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann für die Überlassung des Themas, für die Betreuung meiner Labortätigkeiten und für die große Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation. Ihre kritische Betrachtungsweise und ihre offene Art schufen ein produktives und freundliches Arbeitsklima.

Herrn Dr. med. Dominik Hartl bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet, der mich in die Methodik meiner Doktorarbeit einarbeitete und mir stets bis zur Fertigstellung dieser Dissertation mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit in den Laboratorien des Forschungszentrums Kubus des Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Weiterhin möchte ich mich bei den medizintechnischen Assistentinnen und meinen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden des Laboratoriums der Klinischen Kooperationsgruppe „Pädiatrische Immunregulation“ bedanken, die mich gerade zu Beginn meiner Labortätigkeiten hilfreich und bereitwillig unterstützten.

An dieser Stelle möchte ich mich zutiefst bedanken bei meinen Eltern und bei Frau J. Beier für ihre Unterstützung bei der Verfassung der Dissertation.

## 7.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Andreas Hector  
Adresse: Augustenstr. 81; 80333 München  
Geburtsdatum / -ort: 09.12.1977 in Tokyo / Japan  
Nationalität: Deutsch

### Schulbildung:

1984-1986 Deutsche Schule Tokyo (Japan)  
1986-1988 Grundschule Häusern (Deutschland)  
1988-1997 Gymnasiums Kolleg St.Blasien und Abitur  
  
1997-1998 Einjähriger Aufenthalt in Tokyo (Japan) zur Sprachschulung  
1999-2000 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Filderstadt bei Stuttgart

### Hochschulausbildung:

04/2000 - 04/2002 Vorklinisches Studium an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen und Ärztliche Vorprüfung im 04/2002  
04/2002 Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität in München  
03/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2005 - 09/2006 Praktisches Jahr  
Innere Medizin in der Medizinischen Klinik III (Hämato-Onkologie) und I (Pneumologie, Kardiologie, Nephrologie) in Großhadern (Ludwig-Maximilians-Universität München)  
Kinderchirurgie im Schwabinger Stadtkrankenhaus (München)  
Pädiatrie im Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Hämato-Onkologie, Gastroenterologie, Neurologie)



12/2006                   Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2006                   Erhalt der ärztlichen Approbation

**Beruflicher Werdegang:**

seit 01/2007           Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungszentrum Kubus des Dr.  
                                  von Haunerschen Kinderspitals der Universität München

**Publikationen:**

Krauss-Etschmann, S., Hartl, D., Heinrich, J., Thaqi, A., Prell, C., Campoy, C., Molina, F. S., Hector, A., Decsi, T., Schendel, D. J., and Koletzko, B. V.. Association between levels of Toll-like receptors 2 and 4 and CD14 mRNA and allergy in pregnant women and their offspring. Clin.Immunol. 118[2-3], 292-299. 2006.

Hector, A., Herrera, E., Prell, C., Hartl, D., Ortega, H., Campoy, C., Diaz, J.M., Reinhardt, D., Schendel, D.J., Krauss-Etschmann, S., Koletzko, B.. n-3 LC-PUFAS in human colostrum milk and TH1/TH2-related mRNA levels in cord blood and maternal blood (Posterpräsentation am 2. World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition – Young Investigator Award)

Hartl, D., Prell, C., Hector, A., Diaz, J.M., Campoy, C., Demmelmair, H., Klinger, M., Reinhardt, D., Schendel, D.J., Krauss-Etschmann, S., Koletzko, B.. Association of T cell cytokine and chemokine receptor mRNA expressions in cord and maternal blood with placental n-3 LC-PUFA (Posterpräsentation am 2. World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition)

**Fremdsprachen:**

Englisch fließend in Wort und Schrift

Japanisch mündlich fließend, schriftlich Grundkenntnisse