

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Genexpressionsanalysen im Nabelschnurblut von Bauern und  
Nicht-Bauern im Rahmen der PASTURE-Studie: Untersuchungen zur Rolle  
regulatorischer Immunzellen bei der Entstehung atopischer Erkrankungen**



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

vorgelegt von

Daniela Plabst

aus

München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Erika von Mutius

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Katja Radon

Priv. Doz. Dr. Elfriede Nößner

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Priv. Doz. Dr. Susanne Krauss-Etschmann

Dekan:

Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

20.03.2008

---

|          |                                                                 |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>                               | <b>5</b>  |
| <b>2</b> | <b>Einleitung.....</b>                                          | <b>6</b>  |
| 2.1      | Prävalenz atopischer Erkrankungen.....                          | 6         |
| 2.2      | Risikofaktoren für die Entwicklung atopischer Erkrankungen..... | 6         |
| 2.2.1    | Genetische Faktoren.....                                        | 6         |
| 2.2.2    | Umwelt - und Sozialfaktoren; Hygienehypothese.....              | 7         |
| 2.3      | Die PASTURE-Studie.....                                         | 8         |
| 2.4      | Immunologische Grundlagen.....                                  | 8         |
| 2.4.1    | Th1/Th2-Modell.....                                             | 8         |
| 2.4.2    | Mechanismen der Toleranz.....                                   | 10        |
| 2.5      | Regulatorische T-Zellen (T <sub>reg</sub> ).....                | 10        |
| 2.5.1    | Populationen von regulatorischen T-Zellen.....                  | 10        |
| 2.5.2    | Regulatorische T-Zellen und allergische Erkrankungen.....       | 11        |
| 2.5.3    | Forkhead Box P3 (FOXP3).....                                    | 12        |
| 2.5.4    | Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO).....                            | 13        |
| 2.5.5    | Immunoglobulin-ähnliche Transkripte (ILT).....                  | 17        |
| 2.5.6    | Regulator of G-protein signalling 1 (RGS1).....                 | 19        |
| <b>3</b> | <b>Zielsetzung.....</b>                                         | <b>21</b> |
| <b>4</b> | <b>Material und Methoden.....</b>                               | <b>22</b> |
| 4.1      | Studiendesign und Studienpopulation.....                        | 22        |
| 4.2      | Fragebögen.....                                                 | 23        |
| 4.3      | Sammlung von Staub-, Milch- und Stuhlproben.....                | 23        |
| 4.4      | Blutabnahme und Lagerung.....                                   | 24        |
| 4.5      | RNA-Isolation.....                                              | 25        |
| 4.6      | Quantifizierung der RNA.....                                    | 25        |
| 4.7      | Reverse Transkription (RT).....                                 | 26        |
| 4.8      | Das Prinzip der Real-time TaqMan PCR.....                       | 27        |
| 4.9      | TaqMan Low Density Array.....                                   | 29        |
| 4.10     | Vorbereitung und Durchführung der Real time RT-PCR.....         | 30        |
| 4.11     | Relative Quantifizierung.....                                   | 32        |
| 4.12     | Statistische Auswertung.....                                    | 34        |
| <b>5</b> | <b>Ergebnisse.....</b>                                          | <b>36</b> |
| 5.1      | Studienteilnahme.....                                           | 36        |
| 5.2      | Charakterisierung der Studienpopulation.....                    | 38        |

---

|           |                                                                    |            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3       | Korrelation der Haushaltshaltsgene .....                           | 44         |
| 5.4       | Berechnungen mit den nicht-adjustierten Genexpressionsdaten.....   | 44         |
| 5.4.1     | Explorative Datenanalyse.....                                      | 44         |
| 5.4.2     | Analyse der nicht-adjustierten, stetigen Genexpressionsdaten ..... | 47         |
| 5.4.3     | Analyse der nicht-adjustierten, kategorisierten Daten .....        | 49         |
| 5.4.4     | Assoziation potentieller Störfaktoren mit der Genexpression.....   | 54         |
| 5.5       | Ergebnisse der multivariaten Analysen.....                         | 62         |
| 5.5.1     | Logistische Regressionsanalysen .....                              | 62         |
| 5.6       | Subgruppenanalysen.....                                            | 68         |
| <b>6</b>  | <b>Diskussion .....</b>                                            | <b>75</b>  |
| <b>7</b>  | <b>Zusammenfassung.....</b>                                        | <b>90</b>  |
| <b>8</b>  | <b>Anhang .....</b>                                                | <b>92</b>  |
| <b>9</b>  | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                                   | <b>98</b>  |
| <b>10</b> | <b>Danksagung .....</b>                                            | <b>106</b> |

## 1 Abkürzungsverzeichnis

|                       |                                                                               |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| APC                   | Antigenpräsentierende Zelle                                                   |
| cDNA                  | <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA                                  |
| Ct-Wert               | <i>threshold cycle</i> , "Schwellenwertzyklus"                                |
| $\Delta$ Ct           | delta Ct-Wert                                                                 |
| $\Delta\Delta$ Ct     | delta delta Ct-Wert                                                           |
| DC                    | Dendritische Zelle                                                            |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure                                                        |
| dNTP                  | Desoxyribonukleotidtriphosphat                                                |
| dUTP                  | Desoxyuridintriphosphat                                                       |
| Fa.                   | Firma                                                                         |
| HLA                   | Humane Leukozytenantigene                                                     |
| IgE                   | Immunglobulin E                                                               |
| IFN                   | Interferon                                                                    |
| IL                    | Interleukin                                                                   |
| KI                    | Konfidenzintervall                                                            |
| LPS                   | Lipopolysaccharid                                                             |
| MgCl <sub>2</sub>     | Magnesiumchlorid                                                              |
| MHC                   | <i>Major Histocompatibility Complex</i> ,<br>Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MuLV                  | Murines Leukämie-Virus                                                        |
| mRNA                  | <i>messenger ribonucleic acid</i> , „Boten“-Ribonukleinsäure                  |
| OR                    | Odds Ratio                                                                    |
| PAMP                  | Pathogenassoziierte molekulare Muster                                         |
| PBMC                  | periphere mononukleäre Zellen                                                 |
| PRR                   | <i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor                |
| rRNA                  | ribosomale RNA                                                                |
| RNase                 | Ribonuklease                                                                  |
| RT                    | Reverse Transkription                                                         |
| T <sub>H</sub> -Zelle | T-Helfer-Zelle                                                                |
| TLR                   | Toll-like Rezeptor                                                            |
| T <sub>reg</sub>      | regulatorische T-Zellen                                                       |
| TNF                   | Tumornekrosefaktor                                                            |

## **2 Einleitung**

### **2.1 Prävalenz atopischer Erkrankungen**

Allergische Erkrankungen stellen eines der größten gesundheitlichen Probleme in den westlichen Industrieländern dar. Dies gilt sowohl für Erwachsene als auch in noch stärkerem Ausmaß für Kinder.

Die weltweit umfassendste Studie, die die Häufigkeit atopischer Erkrankungen untersuchte, ist die „International Study of Asthma and Allergy in Childhood“ (ISAAC 1998). Diese bei über einer halben Million 6- bis 7-jähriger und 13- bis 14-jähriger Kinder durchgeführte Querschnittsstudie zeigte, dass die Prävalenzen sehr stark zwischen den einzelnen Ländern bzw. Regionen variieren (Asher et al., 1995). Tendenziell sind Allergien am seltensten in Entwicklungsländern und in Ländern des ehemaligen Ostblocks und am häufigsten in den westlichen Industrienationen. In einer Fortführung der ISAAC-Studie wurde die Prävalenz atopischer Erkrankungen 2002 bis 2003 nach durchschnittlich sieben Jahren unter gleichen Bedingungen erneut untersucht (ISAAC III). Man fand heraus, dass in Deutschland der Anteil der sechs- bis siebenjährigen Kinder mit Asthma-Symptomen innerhalb von fünf Jahren von 9,6 auf 12,8 %, der Anteil von Kindern mit allergischer Rhinokonjunktivitis auf 6,9 % (vorher 5,4) und derjenigen mit Neurodermitis auf 7,9 % (vorher 6,7) gestiegen war (Asher et al., 2006).

### **2.2 Risikofaktoren für die Entwicklung atopischer Erkrankungen**

#### **2.2.1 Genetische Faktoren**

Trotz intensiver Forschung sind die Entstehungsmechanismen allergischer Erkrankungen nicht vollständig geklärt. Es spielen sowohl endogene (genetisch bedingte) als auch exogene Faktoren im intrauterinen und postnatalen Umfeld des Kindes (z.B. Allergene, Mikroorganismen) eine wichtige Rolle.

Bekanntermaßen erhöht eine familiäre Disposition das Risiko für atopische Erkrankungen. Je mehr Familienmitglieder betroffen sind, desto höher ist das Risiko des Kindes, eine atopische Erkrankung zu entwickeln. So ist nach Litonjua das Risiko des Kindes, Asthma zu entwickeln, dreifach erhöht, wenn eines der Elternteile asthmatisch ist, und sechsfach, wenn beide Elternteile an Asthma leiden (Litonjua et al., 1998).

Zwillingsstudien haben gezeigt, dass die Konkordanz allergischer Krankheiten zwischen monozygoten Zwillingen relativ gering ist im Vergleich zu anderen genetisch determinierten Krankheiten, jedoch höher als bei Heterozygoten (Strachan et al., 2001).

### 2.2.2 Umwelt - und Sozialfaktoren; Hygienehypothese

Die genetische Prädisposition alleine kann nicht den Anstieg in der Prävalenz allergischer Krankheiten erklären. Dies wurde offensichtlich durch die Veröffentlichung von Studien, die die Häufigkeit allergischer Erkrankungen in West- und Ostdeutschland nach der Wiedervereinigung verglichen. Es handelte sich dabei um Bevölkerungen mit ähnlichem genetischen Hintergrund und geographischer Lage, die 40 Jahre lang unter völlig unterschiedlichen Bedingungen lebten. Die Prävalenz von allergischen Erkrankungen war in Westdeutschland signifikant höher als in Ostdeutschland (von Mutius et al., 1992).

Die erstmals 1989 von David Strachan vorgeschlagene „Hygiene“-Hypothese besagt, dass frühkindliche Infektionen der Entstehung einer atopischen Sensibilisierung und der Manifestation allergischer Erkrankungen vorbeugen könnten (Strachan, 1989).

Die Hygiene-Hypothese wird durch Ergebnisse aus zahlreichen epidemiologischen Beobachtungsstudien gestützt. So konnte in Ostdeutschland gezeigt werden, dass der Besuch einer Kindertagesstätte vor dem ersten Lebensjahr der Entwicklung von Asthma und Allergien vorbeugte (Krämer et al., 1999). Es wurde postuliert, dass der protektive Effekt wahrscheinlich durch die Übertragung häufiger viraler Infektionen durch andere Kinder zustande kommt, was auch in der MAS-Studie (Multizentrische Allergiestudie) bestätigt wurde: Bei Kindern mit häufigen Episoden einer „laufenden Nase“ im ersten Lebensjahr wurde im Alter von 7 Jahren seltener Asthma diagnostiziert (Illi et al., 2001). Auch andere Arten von Infektionen wie Masern (Shaheen et al., 1996) und orofäkale Infektionen wie Hepatitis A (Matricardi et al., 2000) wurden mit der Vorbeugung atopischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht.

In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass eine bäuerliche Umgebung vor der Entstehung von Asthma, Heuschnupfen und atopischen Sensibilisierungen schützt (Braun-Fahrlander et al., 1999; Ernst und Cormier, 2000; Kilpelainen et al., 2000; Riedler et al., 2000). Insbesondere der regelmäßige Kontakt mit Vieh scheint dabei zu dem protektiven Effekt beizutragen. In der ALEX (Allergie und Endotoxine)-Studie, einer Querschnittsstudie an 812 Schulkindern aus ländlichen Gebieten Bayerns, Österreichs und der Schweiz, fand man heraus, dass die Exposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen bereits im frühen Kindesalter erfolgen muss, um das Risiko für allergische Erkrankungen zu reduzieren: So waren Stallaufenthalte und der Konsum nicht-abgekochter Milch im Kindesalter von unter einem Jahr – im Vergleich mit einer Exposition im Alter von 1-5 Jahren – mit geringeren Häufigkeiten an Asthma, Heuschnupfen und atopischen Sensibilisierungen assoziiert.

Stallaufenthalte und der Konsum nicht-abgekochter Milch schienen dabei einen additiven Effekt zu haben (Riedler et al., 2001). Das erste Lebensjahr scheint demnach eine besonders sensible Phase für die Allergieentstehung zu sein.

### **2.3 Die PASTURE-Studie**

Die PASTURE (Protection against Allergy: Study in Rural Environment)-Studie, die in den deutschsprachigen Ländern auch LUKAS-Studie (Ländliche Umgebung und Kinder - Allergie Studie) genannt wird, ist eine multizentrische, europaweite Geburtskohortenstudie (5. Forschungsprogramm der EU; Vertragsnummer QLK 4-2001-00250) mit dem Ziel, festzustellen, ob eine erhöhte Exposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen einen Effekt auf die Entwicklung kindlicher Allergien zeigt. Sie untersucht, wie immunologische und genetische Mechanismen die individuellen Reaktionen auf diese Umwelteinflüsse bestimmen (von Mutius und Schmid, 2006).

Im Gegensatz zu vielen früher an Bauernkindern durchgeführten Querschnittsstudien, bei denen die Exposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen retrospektiv untersucht wurde, handelt es sich bei PASTURE um eine Longitudinalstudie. Die Kinder werden vom Zeitpunkt der Geburt über mehrere Jahre hinweg verfolgt. Dadurch ist eine Beobachtung der natürlichen Entwicklung der Krankheitsbilder möglich. Außerdem entfällt das häufig bei Querschnittsstudien auftretende Problem, dass Eltern zu einem lange zurückliegenden Zeitraum befragt werden, an den sie sich nicht mehr genau erinnern können („recall bias“).

### **2.4 Immunologische Grundlagen**

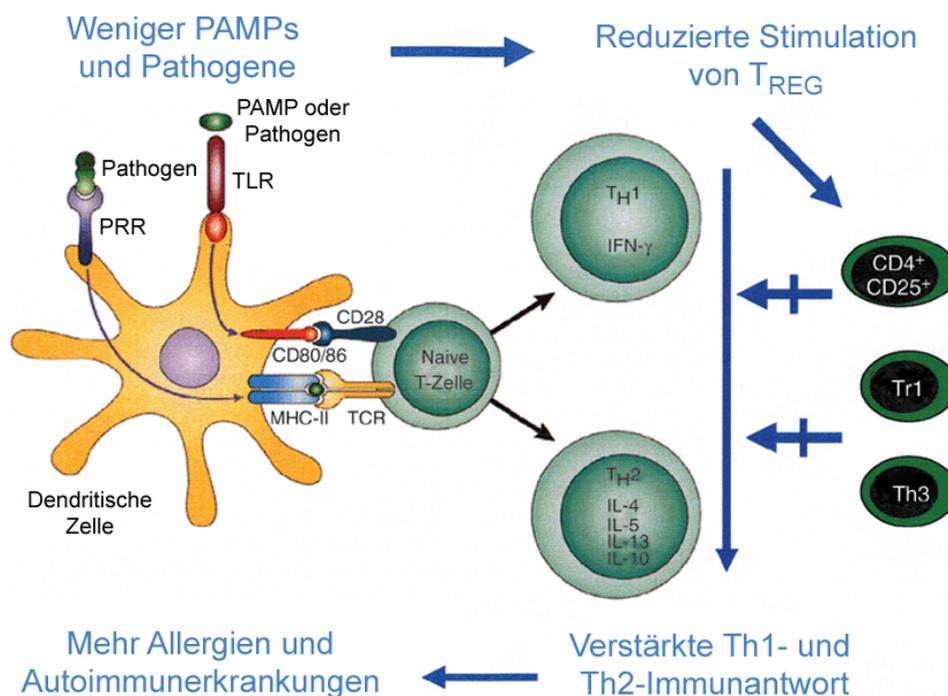
#### **2.4.1 Th1/Th2-Modell**

Die Hygiene-Hypothese wird derzeit aus immunologischer Sicht folgendermaßen erklärt: Im Verlauf gewöhnlicher viraler Infektionen wird u.a.  $IFN\gamma$  gebildet und damit eine starke Th1-Immunantwort induziert. Diese Th1-Antwort kann Viren effektiver eliminieren als die Th2-Immunantwort, die durch die Produktion von IL-4, -5 und -13 charakterisiert ist und die IgE-Produktion, Eosinophilie und Atopie fördert. Kinder werden zunächst mit einer vorherrschenden Th2-Immunität geboren, jedoch reift während des ersten Lebensjahres unter dem Einfluss von Umwelteinflüssen, vor allem gewöhnlichen Kindesinfektionen, die Th1-Antwort heran. Bei Kindern mit späterer Atopie scheint dieser „Shift“ langsamer vorstatten zu gehen als bei Kindern von nicht-atopischen Eltern (Prescott et al., 1999).

Gegen dieses vereinfachte Modell des mangelnden Shifts von der Th1- zur Th2-Immunantwort sprechen jedoch folgende epidemiologische Beobachtungen: Nicht nur die Prävalenz allergischer Erkrankungen (Th2-assoziierte Erkrankungen), sondern parallel auch

von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose und Typ-1 Diabetes (Th1-assoziierten Erkrankungen) stieg in den letzten Jahrzehnten an (Bach, 2002). Darüber hinaus gibt es in Ländern mit chronischen Helminthen-Infektionen, die eine starke Th2-Immunantwort induzieren, eine geringe Prävalenz an allergischen Erkrankungen (Yazdanbakhsh et al., 2002). Außerdem wird die Th1/Th2-Dichotomie dadurch in Frage gestellt, dass in verschiedenen Studien eine generell abgeschwächte Th1- und Th2-Cytokinproduktion im Nabelschnurblut gefunden wurde (Neaville et al., 2003; Prescott et al., 2003).

Heute weiß man, dass die Th1-/Th2-Balance durch ein Netzwerk an regulatorischen Immunzellen, vor allem regulatorischen T-Zellen, kontrolliert wird. Man vermutet, dass die mangelnde Exposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen zu einer reduzierten Aktivität regulatorischer T-Zellen führt (Romagnani, 2004). Die daraus resultierende generell stärkere Immunantwort auf Allergene könnte die steigende Prävalenz sowohl von atopischen Erkrankungen als auch von Autoimmunerkrankungen erklären (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1. Hypothese der mangelnden Immunsuppression als Erklärung für die gestiegene Prävalenz von allergischen Erkrankungen**

Pathogene bzw. Bestandteile von Pathogenen, sogenannte PAMPs („pathogen associated molecular patterns“) binden an PRRs („pattern recognition receptors“) auf dendritischen Zellen. Ein Beispiel für PRRs sind Toll like Rezeptoren (TLR). Daraufhin werden Signale in den Zellkern vermittelt, wodurch MHC-II-Moleküle und kostimulatorische Moleküle wie CD80/86 auf DCs verstärkt exprimiert werden. Über die Bindung an den T-Zellrezeptor wird die naive T-Zelle aktiviert und differenziert in Th1- und Th2-Zellen mit entsprechender Zytokinproduktion. Das Th1-/Th2-Gleichgewicht wird durch verschiedene Populationen regulatorischer T-Zellen kontrolliert. Sind weniger Pathogene vorhanden, so werden auch T<sub>reg</sub> in geringerem Maße stimuliert und das Th1-/Th2-Gleichgewicht kann sich zugunsten einer der beiden Immunantworten mit pathologischen Auswirkungen verschieben (Romagnani, 2004).

## 2.4.2 Mechanismen der Toleranz

T-Zellen erkennen Antigene über einen T-Zell Rezeptor, der spezifisch antigene Peptide in Assoziation mit einem MHC-Molekül erkennt. Peptide, die an Klasse I bzw. Klasse II MHC Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) gebunden sind, stellen die Liganden für den T-Zell Rezeptor von  $CD8^+$  bzw.  $CD4^+$  Zellen dar.

Die T-Zell Aktivierung durch Selbst-Antigene im Thymus und in der Peripherie sowie die Aktivierung von peripheren T-Zellen durch fremde Antigene werden streng kontrolliert. Die Kontrolle findet im Wesentlichen durch 3 Mechanismen statt:

1. Deletion von antigenspezifischen T-Zellen
2. Anergie, d.h. Nicht-Reaktivität
3. Suppression, d.h. Inhibierung der T-Zellfunktion durch andere Zellen

Eine Homöostase zwischen aktivierenden Effektor-T-Zellen und regulatorischen Immunzellen sorgt für ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Toleranz gegenüber eigenem Gewebe und Immunität gegenüber Pathogenen.

## 2.5 Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ )

### 2.5.1 Populationen von regulatorischen T-Zellen

Vor ca. 10 Jahren machten Sakaguchi und Mitarbeiter die Beobachtung, dass die Depletion von  $CD25^+$ -Zellen in Mäusen Autoimmunerkrankungen wie Thyroiditis, Gastritis und Polyarthritits verursachte (Sakaguchi et al., 1995).

Diese natürlich auftretenden  $CD4^+CD25^+$ -Zellen werden im Thymus produziert und stellen ca. 5-10% der  $CD4^+$  T-Zellen in der Peripherie dar. Sie exprimieren die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors ( $CD25^+$ ), das kostimulatorische Molekül CTLA-4 (intrazelluläres zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4), GITR („glucocorticoid-inducible TNF-receptor like molecule“) sowie den Transkriptionsfaktor FOXP3 (Sakaguchi, 2005). Diese Zellen expandieren nach antigener Stimulation nicht und unterdrücken die Aktivierung und Proliferation von  $CD4^+CD25^-$  oder  $CD8^+$  T-Zellen Antigen-unabhängig durch T-Zell-T-Zellkontakt. Darüber hinaus produzieren sie offenbar kein IL-2, IL-4 oder TGF- $\beta$ , sondern lediglich IL-10.

Während die natürlichen  $T_{reg}$  im Thymus nach der Begegnung mit Selbst-Antigenen positiv selektiert werden, scheinen die allergenspezifischen adaptiven  $T_{reg}$ -Zellen sich nach Begegnung mit exogenen Allergenen in der Peripherie zu entwickeln.

Tr1-Zellen entstehen nach chronischer Aktivierung von humanen und murinen  $CD4^+$  Zellen in der Anwesenheit von IL-10 (Groux et al., 1997). Sie produzieren hohe Mengen an IL-10,

geringe Mengen an IL-2 und kein IL-4 und zeigen ein geringes Maß an Proliferation. Diese antigenspezifischen T-Zellen unterdrücken die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und können die Entwicklung von experimentell induzierter Colitis in SCID (severe combined immunodeficiency)-Mäusen verhindern (Groux et al., 1997).

Th3-Zellen stellen eine weitere Untergruppe regulatorischer T-Zellen dar. Chen et al. beschrieben Th3-Zellen als CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die durch orale Antigene in den Mesenterial-Lymphknoten induziert werden können (Chen et al., 1994). Sie produzieren TGF- $\beta$  und variable Mengen von IL-4 und IL-10.

Darüber hinaus existieren verschiedene andere Populationen von regulatorischen T-Zellen, z.B. die T Suppressor Zellen (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Zellen) sowie andere regulatorische Immunzellen wie natürliche Killer T-Zellen und regulatorische dendritische Zellen.

### 2.5.2 Regulatorische T-Zellen und allergische Erkrankungen

Dass regulatorische T-Zellpopulationen bei der Entwicklung von allergischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, konnte hinreichend belegt werden.

Bellinghausen und Mitarbeiter fanden heraus, dass die meisten atopischen Patienten normal funktionierende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> besitzen und dass diese sowohl Th1- als auch Th2-Immunantworten inhibieren können, während bei einigen Patienten nur die IFN- $\gamma$  Produktion supprimiert war (Bellinghausen et al., 2003).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen von Allergikern im Vergleich zu Nicht-Allergikern während der Birkenpollen-Saison die von Birkenpollen induzierte IL-13 und IL-5 Produktion nicht unterdrücken konnten, während die Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu unterdrücken, erhalten blieb. Außerhalb der Pollensaison jedoch konnten sowohl die regulatorischen Zellen von Allergikern als auch von Nicht-Allergikern die Produktion von Th2-Zytokinen inhibieren (Grindebacke et al., 2004).

In ähnlicher Weise beobachteten Ling und Mitarbeiter, dass bei Atopikern die Eigenschaft der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, die Proliferation und IL-5-Produktion ihrer eigenen Allergen-stimulierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen zu unterdrücken, deutlich reduziert war im Vergleich zu Nicht-Atopikern. Der Verlust dieser inhibitorischen Aktivität war besonders ausgeprägt während der Pollensaison (Ling et al., 2004).

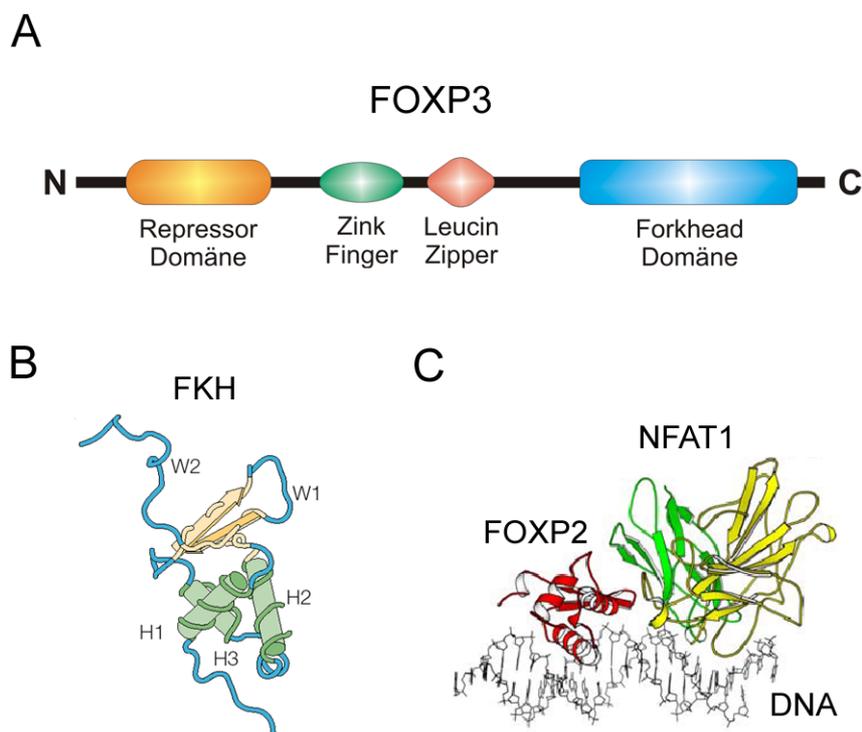
Desweiteren zeigten Gesunde nach Depletion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus dem peripheren Blut erhöhte proliferative Antworten auf verschiedene Allergene wie Milch, Nickel und Gras und eine erhöhte Produktion von Th2-assoziierten Zytokinen (Taams et al., 2002; Cavani et al., 2003; Ling et al., 2004).

Kinder, die ihre Kuhmilch-Allergie „ausgewachsen“ hatten, d.h. gegenüber Kuhmilch tolerant geworden waren, besaßen einen höheren Anteil an zirkulierenden  $CD4^+CD25^+$ -Zellen und erniedrigte proliferative Antworten auf bovines  $\beta$ -Lactoglobulin in ihren PBMCs verglichen mit Kindern mit klinisch aktiver Allergie (Karlsson et al., 2004).

Im Folgenden werden Gene beschrieben, die mit regulatorischen T-Zellen assoziiert sind und eine Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz haben.

### 2.5.3 Forkhead Box P3 (FOXP3)

Forkhead Box P3 (FOXP3) ist einer von mehr als 100 Transkriptionsfaktoren der forkhead/winged-helix (FOX) Familie. Die FOX Proteine besitzen eine „winged-helix“ DNA-Bindungsdomäne, die auch als Forkhead-Domäne bezeichnet wird (siehe Abbildung 2B). Sie haben eine wichtige Bedeutung in der Embryonalentwicklung, dem Metabolismus, der Tumorenstehung sowie dem Alterungsprozess (Carlsson und Mahlapuu, 2002). Das X-chromosomale FOXP3-Gen gilt aus immunologischer Sicht derzeit als wichtigster Vertreter der FOX-Familie.



**Abbildung 2 Struktur des Forkhead Box Proteins FOXP3.**

(A) Graphische Darstellung der wichtigsten Proteindomänen, modifiziert nach (Coffer and Burgering, 2004). (B) Kristallstruktur der Forkhead (FKH) DNA Bindungsdomäne, (van Dongen et al., 2000). (C) Kristallstruktur des FOXP2 : NFAT1 : DNA Komplexes, (Wu et al., 2006).

NFAT = nuclear factor of activated T cells

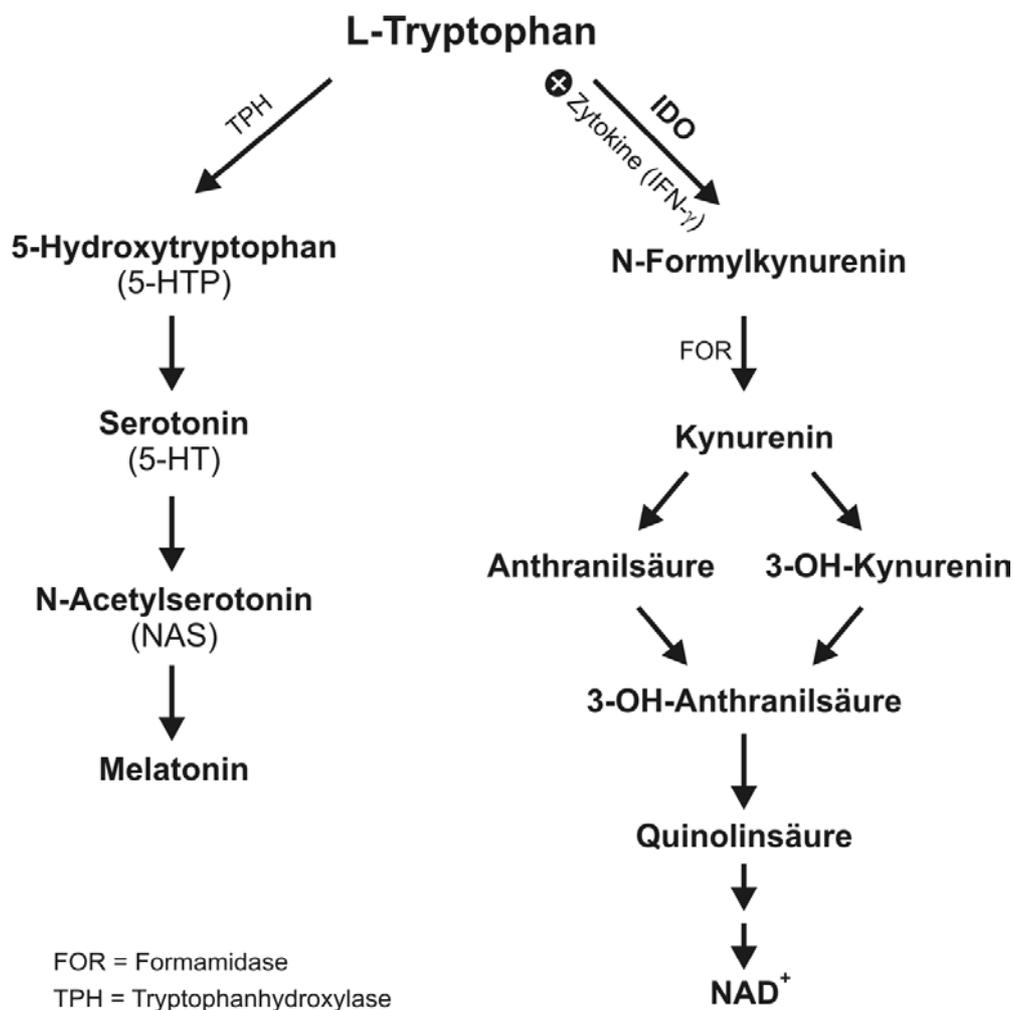
Bei der natürlich aufgetretenen Mausmutante „Scurfy“ führt eine Mutation im Foxp3 Gen zur Deletion der Forkhead-Domäne. Die Scurfy Maus stirbt 3 bis 4 Wochen nach der Geburt an Multiorganversagen, verursacht durch massive Autoimmureaktionen (Brunkow et al., 2001). Beim Menschen führen Mutationen im FOXP3 Gen zur Ausbildung eines seltenen Autoimmunsyndroms, das als IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) bezeichnet wird und charakterisiert ist durch Typ I Diabetes, Thyroiditis, lymphoproliferative Endokrinopathie und, in einigen Fällen, schwerer Atopie und Nahrungsmittelallergie (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Coffier und Burgering, 2004). Die ektope Expression von FOXP3 in nicht-regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert die Differenzierung dieser Zellen zu regulatorischen T-Zellen (Yagi et al., 2004). Seit kurzem weiß man, dass dies über eine Interaktion von FOXP3 mit dem Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Transkriptionsfaktor NFAT geschieht (Abbildung 1C) (Wu et al., 2006). Letztlich führt dies zu einer Unterdrückung der IL-2-Expression und einer Aktivierung der CTLA-4- und CD25-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die durch die Interaktion von FOXP3 mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, AML1 (acute myeloid leukaemia 1, auch Runx1 genannt) gesteuert wird. AML bindet an die Promotoren von IL-2 and IFN- $\gamma$  und aktiviert so deren Genexpression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Durch die Bindung an AML1 verhindert FOXP3 die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$ , induziert die Expression T<sub>reg</sub>-assoziierte Gene und führt letztlich zur Suppression der Immunantwort (Ono et al., 2007).

FOXP3 wird in natürlich auftretenden T<sub>reg</sub> sowie in adaptiven T<sub>reg</sub> und weiteren T-Zell-Populationen mit regulatorischer Funktion exprimiert und ist essenziell für deren Funktion (Ziegler, 2006). Die Expression von FOXP3 ist daher ein wichtiger intrazellulärer Marker für T<sub>reg</sub>. Kürzlich wurde die Beobachtung gemacht, dass Zellen, die FOXP3 exprimieren, stets mit einer abgeschwächten Proliferation und Zytokinproduktion reagieren, aber nicht notwendigerweise suppressiv wirken. FOXP3 wird auch in aktivierten T-Zellen ohne supprimierende Funktionen exprimiert, wenn auch nur vorübergehend (Wang et al., 2007). Daher stellt FOXP3 keinen, wie man bisher vermutete, spezifischen Marker für T<sub>reg</sub> dar.

#### 2.5.4 Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO)

T-Zellen reagieren sensibel auf Schwankungen in der Konzentration der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Eine Erniedrigung der Tryptophankonzentration führt zu einer Unterdrückung der T-Zellproliferation.

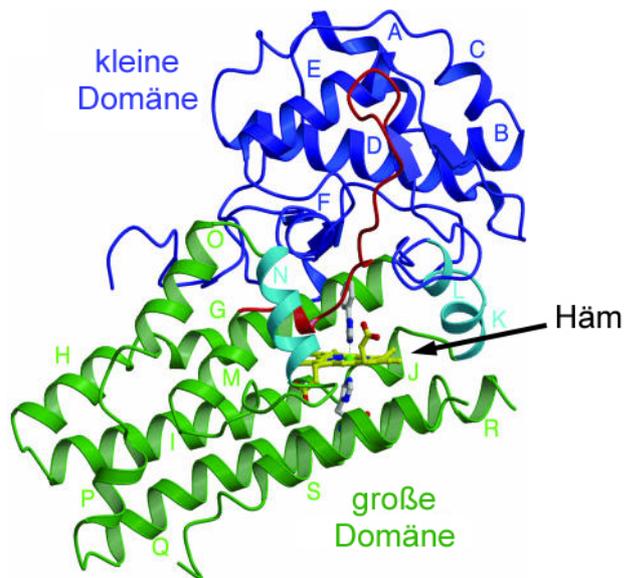
Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO), auch INDO genannt, ist ein Enzym, das in den Katabolismus von Tryptophan involviert ist (von Bubnoff et al., 2002). Es vermittelt die oxidative Spaltung des Pyrrolringes von Tryptophan (Daley-Yates et al., 1988) und stellt außerhalb der Leber das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des sogenannten Kynureninweges dar (Moffett und Namboodiri, 2003). Daneben ist Tryptophan die Ausgangssubstanz für die Serotonin- und Melatonin-Synthese (Abbildung 3).



**Abbildung 3 L-Tryptophan als Ausgangsstoff für die Serotonin- und Melatoninsynthese bzw. für die Synthese von Kynureninen über das Enzym IDO**

Obwohl INF- $\gamma$  der stärkste Induktor von IDO ist, können wahrscheinlich auch andere Zytokine, entweder alleine oder in Kombination mit IFN- $\gamma$  die Expression des Enzyms fördern (z.B. IFN- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  oder TNF- $\alpha$ ) (Grohmann et al., 2003).

IDO wurde erstmals 1967 von Hayaishi und Mitarbeitern aus Kaninchendarm isoliert (Higuchi und Hayaishi, 1967; Yamamoto und Hayaishi, 1967); das humane Enzym wurde mehr als 20 Jahre später kloniert (Dai und Gupta, 1990). Es handelt sich um ein Hämtragendes Enzym mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Abbildung 4).



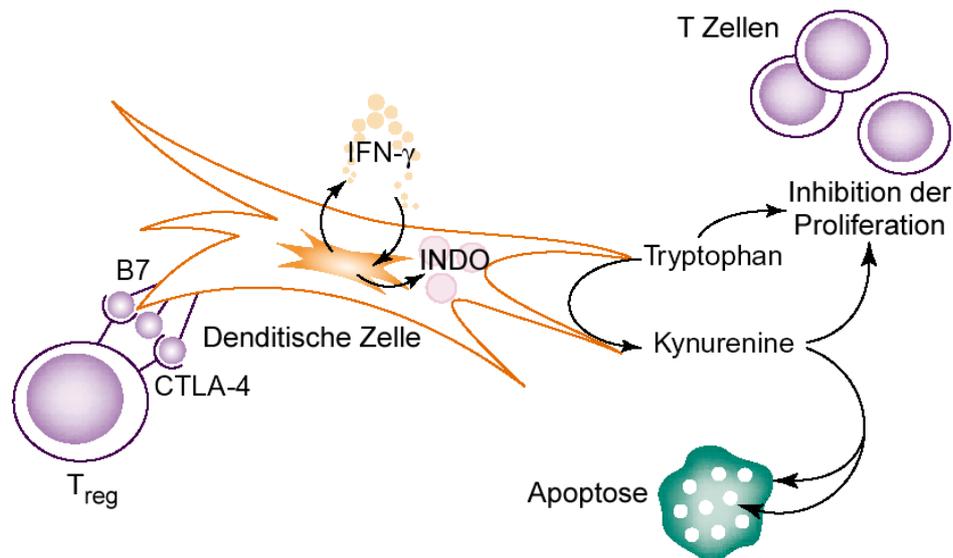
**Abbildung 4 Kristallstruktur von IDO.** Es besteht aus einer Häm-Gruppe (gelb dargestellt) sowie zwei Proteindomänen (blau und grün) mit einer langen die beiden Domänen verbindenden Schleife („Loop“) (rot) (Sugimoto et al., 2006).

IDO wird in verschiedenen Zelltypen und Geweben exprimiert, vor allem in den antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie der Plazenta (Babcock und Carlin, 2000; Mellor und Munn, 2001).

Durch Modulation der maternalen T-Zellimmunität spielt IDO eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Der Fötus wird vermutlich durch die Inhibition alloreaktiver T-Zellen vor Abstoßung geschützt. Munn und Mitarbeiter zeigten, dass die Inhibition von IDO in trächtigen Mäusen zu einer T-Zell vermittelten Abstoßung allogener, nicht aber syngener Feten führt (Munn et al., 1998). Daraus kann man schließen, dass IDO essenziell für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz ist.

Seine regulatorische Funktion kommt sowohl durch die Erniedrigung der Tryptophan Konzentration als auch durch die Anhäufung von Tryptophanmetaboliten zustande (Terness et al., 2002; Grohmann et al., 2003).

Ein möglicher Mechanismus der IDO-vermittelten Toleranz ist in Abbildung 5 dargestellt: Das kostimulatorische Molekül CTLA-4, das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, agiert als Ligand für B7-Rezeptor Moleküle (CD80, CD86) auf der Oberfläche von dendritischen Zellen. Die dendritische Zelle produziert daraufhin verstärkt IFN- $\gamma$ , das die Expression von IDO induziert. IDO führt lokal zur Erniedrigung der Tryptophankonzentration und Erhöhung von proapoptotischen Kynureninen (Tryptophanmetaboliten), wodurch es zur Inhibition der klonalen Expansion und erhöhter Apoptose von T-Zellen kommt (Grohmann et al., 2003).



**Abbildung 5** Vermuteter Mechanismus derIDO-vermittelten Toleranz; modifiziert nach Grohmann et al. (2003).

Dendritische Zellen können somit durchIDO wirksam T-Zell Antworten unterdrücken und systemische Toleranz fördern. Mellor und Munn postulieren darüber hinaus, dass in einer Population von regulatorischen T-Zellen die Expression vonIDO induziert werden kann. Die Induktion vonIDO in T<sub>reg</sub> könnte ein Mechanismus sein, über den regulatorische T-Zellen ihre inhibitorischen Effekte vermitteln (Mellor und Munn, 2004).

Interessanterweise besaßen asymptotische Atopiker während der Pollensaison eine erhöhte Aktivität vonIDO sowie eine erhöhte IL-10 Produktion im Vergleich zu den symptomatischen Atopikern wie auch zu Nicht-Atopikern (von Bubnoff et al., 2004).

Vor kurzem wurde auch beschrieben, dass die Aktivität vonIDO bei Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern erniedrigt ist (Raitala et al., 2006). Die Aktivität vonIDO wurde dabei indirekt über das Verhältnis von Tryptophan zu Kynurenin gemessen. Die Tryptophan-Kynurenin-Ratio ist indirekt proportional zur Aktivität vonIDO.

IDO kann, wie in Abbildung 5 gezeigt, durch IFN-γ in antigenpräsentierenden Zellen induziert werden, wobei eine zusätzliche Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder TNF-α die Enzymexpression synergistisch steigert (Carlin et al., 1989; Robinson et al., 2003).

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gehören zu den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die die Erkennung von Pathogenen vermitteln und deshalb als „pathogen recognition receptors“ (PRRs) bezeichnet werden (Medzhitov, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002). Sie erkennen molekulare Muster oder Moleküle von Mikroorganismen („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs). PAMPs sind vielen Bakterienarten gemeinsame Strukturen wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane oder bakterielle DNA, wie auch virale RNA. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass bestimmte Toll-like Rezeptor Liganden wie

bakterielle DNA (TLR9 Ligand) und LPS (TLR4 Ligand) die Expression vonIDO *in vivo* und *in vitro* induzieren können (Hissong et al., 1995; Hayashi et al., 2001)

Untersuchungen von Hayashi et al. deuten außerdem auf eine wichtige Rolle vonIDO im respiratorischen Epithel hin. Die Induktion vonIDO durch bakterielle DNA (synthetische immunstimulatorische Oligonukleotide) in Epithelzellen der Mauslunge konnte die Th2-vermittelte Entzündung und experimentelles Asthma verhindern (Hayashi et al., 2004).

### 2.5.5 Immunoglobulin-ähnliche Transkripte (ILT)

Immunoglobulin-ähnliche Transkripte (ILT), auch Leukozyten Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren (LILR) genannt, sind eine Familie von stimulierenden und inhibitorischen Zelloberflächenrezeptoren (Cosman et al., 1997; Brown et al., 2004). Sie werden von einem Multigenkomplex kodiert, dem „Leukocyte Receptor Complex“ (LRC), der bei Primaten und Mäusen identifiziert werden konnte (Wende et al., 1999). ILTs sind strukturell und funktionell mit den ebenfalls im LRC kodierten Killerzell-inhibierenden Rezeptoren (KIR) verwandt. Wie die KIRs gehören sie zur Immunoglobulin-Superfamilie. Sie werden vor allem von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert; einige werden auch von Subpopulationen von B-, T- und NK-Zellen exprimiert (Colonna et al., 2000).

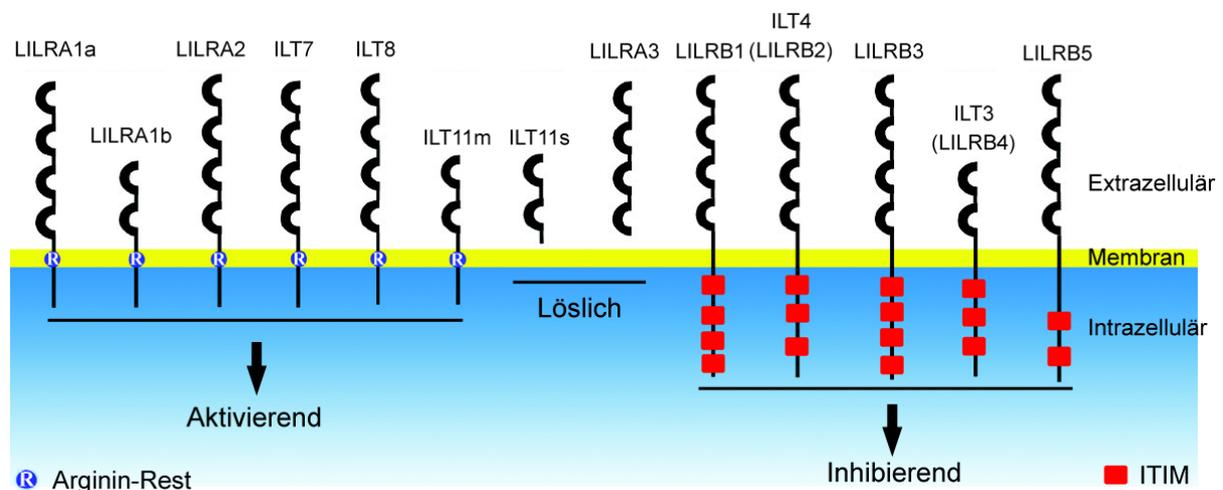


Abbildung 6 ILT Rezeptor Familie

Die Rezeptoren werden aufgrund verschiedener transmembranärer und zytoplasmatischer Domänen in drei Gruppen eingeteilt: Inhibitorische Rezeptoren (mit zytoplasmatischen ITIMs); aktivierende Rezeptoren; lösliche Rezeptoren ohne transmembranäre und zytoplasmatische Domänen (modifiziert nach Brown et al., 2004).

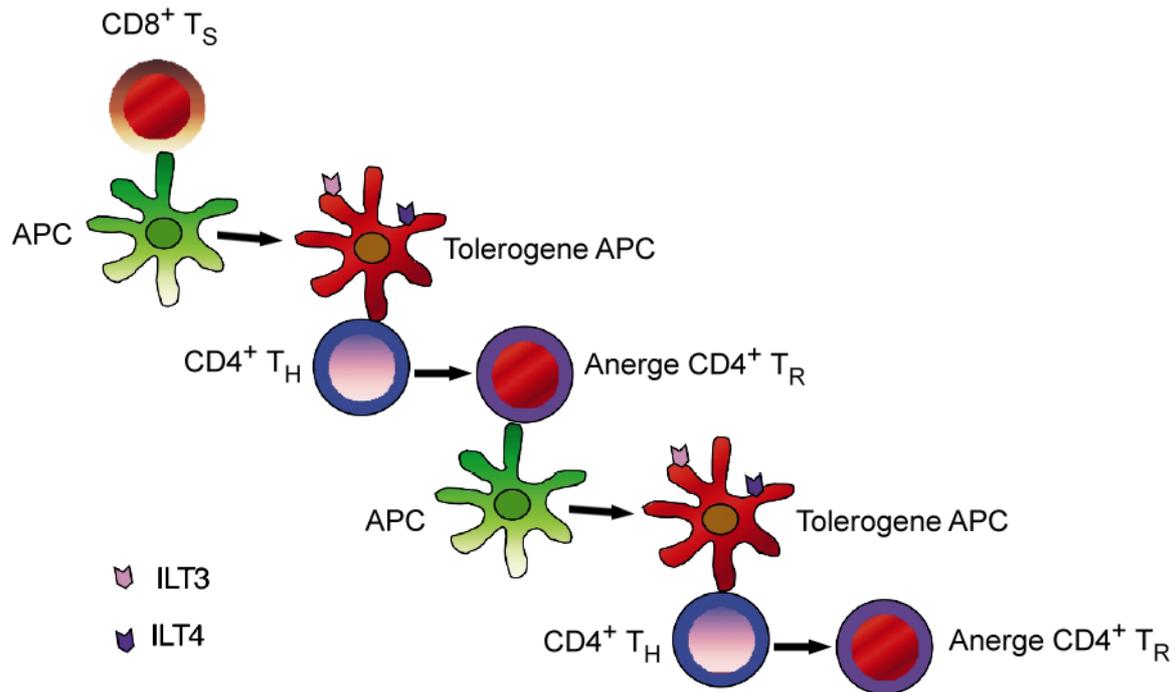
Für die Signaltransduktion der inhibitorischen Rezeptoren, zu denen ILT3 und ILT4 gehören (siehe Abbildung 6), sind „Immunrezeptor Tyrosin-basierende Inhibitorische Motive“ (ITIMs) im zytoplasmatischen Teil ihrer Polypeptidkette verantwortlich. Wenn der

zugehörige Ligand vorhanden ist, werden die ITIMs phosphoryliert und die SH2-Domänen enthaltende Tyrosin-Phosphatase SHP-1 wird gebunden. Die Phosphatase vermittelt dann ein inhibierendes Signal (Burshtyn et al., 1996; Fry et al., 1996). SH2-Domänen sind Proteindomänen, die spezifische Proteininteraktionen vermitteln; die Abkürzung SH2 steht für *Src-homology 2*.

Bei den meisten der erst 1997 entdeckten Rezeptoren ist der Ligand unbekannt, beispielsweise bei ILT3. ILT2 und ILT4 binden an die stark konservierte  $\alpha 3$  Domäne des MHC I Moleküls und können somit verschiedene HLA Subklassen, wie HLA-A, -B und -G binden (Martin et al., 2002).

Suciu-Foca und Mitarbeiter beschrieben eine neue Gruppe von regulatorischen T-Zellen, die *in vitro* und *in vivo* durch chronische antigene Stimulation erzeugt werden können (Liu et al., 1998). Diese T Suppressor Zellen ( $CD8^+CD28^-$  Zellen, Ts-Zellen) exprimieren wie die oben beschriebenen  $CD4^+CD25^+$ -Zellen FOXP3; sie sind jedoch im Gegensatz zu diesen antigenspezifisch und MHC-Klasse-I-restringiert. Sie unterdrücken antigen-spezifische  $CD4^+$  T Helfer (Th) Zell-Antworten und hemmen die Fähigkeit der Th Zellen, IL-2 zu produzieren. Ihre inhibitorische Funktion üben sie dadurch aus, dass antigenpräsentierende Zellen, die mit Ts Zellen in Kontakt kommen, keine T-Zell Alloreaktivität mehr stimulieren können, sondern stattdessen in Th-Zellen den Zustand der Anergie hervorrufen. Alloreaktivität ist ein Begriff aus der Transplantationsimmunologie und beschreibt die Stimulierung von T-Zellen durch Nicht-Selbst-MHC Moleküle. Die Untersuchungen von Suciu-Foca et al. wurden an einem Transplantationsmodell durchgeführt. Unter Anergie versteht man die fehlende Reaktivität der T-Zelle auf ihr spezifisches Antigen (Macian et al., 2004). Suciu-Foca und Mitarbeiter fanden heraus, dass Ts Zellen in APCs die Hochregulierung der inhibitorischen Rezeptoren ILT3 und ILT4 induzieren und die antigenpräsentierende Zellen dadurch „tolerogen“ machen (siehe Abbildung 7) Diese „tolerogenen“ antigenpräsentierenden Zellen fördern die Entstehung von regulatorischen  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen aus allospezifischen  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen, die wiederum neue antigenpräsentierende Zellen anergisieren. Es wird eine immunregulatorische Kaskade in Gang gesetzt, in der die antigenpräsentierenden Zellen eine zentrale Rolle einnehmen.

In einer weiteren Untersuchung wurden unreife dendritische Zellen mit IL-10, IFN- $\alpha$  und/oder Vitamin D3 inkubiert und es zeigte sich, dass die Expression von ILT3 und ILT4 induziert wurde. Die Hochregulierung von ILT3 und ILT4 in dendritischen Zellen wird also nicht nur durch Ts-Zellen induziert, sondern scheint eine allgemeine Eigenschaft von tolerogenen dendritischen Zellen zu sein (Manavalan et al., 2003; Suciu-Foca et al., 2003).



**Abbildung 7 Die T Suppressor Zellkaskade (modifiziert nach Suci-Foca et al., 2003)**

Es stellt sich die Frage, wodurch dendritische Zellen „tolerogen“ werden. Zur vollständigen Aktivierung benötigen T-Zellen drei Signale: Antigene Peptide, die von MHC-Molekülen präsentiert werden, Signale durch Zytokine sowie kostimulatorische Signale, die z.B. durch CD40 auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen vermittelt werden. Die Interaktion zwischen CD40 und CD40L auf der T-Zelle stimuliert die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen. Fehlen kostimulatorische Signale, so teilt sich die T-Zelle nicht und wird anerg. Es wurde gezeigt, dass antigenpräsentierende Zellen, die ILT3 und ILT4 hoch exprimieren, nur geringe Mengen an kostimulatorischen Molekülen besitzen (Chang et al., 2002).

Die Bedeutung von ILT3 und ILT4 bei der Entstehung allergischer Erkrankungen ist noch ungeklärt. Heinzmann und Mitarbeiter beschrieben, dass häufige Polymorphismen und Spleißvarianten im ILT3 Gen nicht mit einem atopischen Phänotyp assoziiert waren (Heinzmann et al., 2000).

### 2.5.6 Regulator of G-protein signalling 1 (RGS1)

G-Protein vermittelte Signalwege werden u.a. durch Moleküle reguliert, die man als Regulator of G-protein signalling (RGS) bezeichnet. Die mehr als 25 Vertreter dieser Proteinfamilie verfügen über eine etwa 120 Aminosäuren umfassende RGS-Domäne, die die intrinsische GTPase Aktivität von G-Proteinen stimulieren kann (Jean-Baptiste et al., 2006).

RGS Proteine sind somit in der Lage, G-Protein-vermittelte Signalwege zu inhibieren. Das erste RGS-Protein in Säugetieren wurde 1995 identifiziert und ist heute als RGS19 bekannt (De Vries et al., 1995).

Eine der wichtigsten Klasse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Lymphozyten ist die der Chemokinrezeptoren. Chemokine werden einerseits konstitutiv exprimiert und kontrollieren die homöostatische Zellmigration zwischen und innerhalb der lymphatischen Gewebe. Andererseits werden sie bei entzündlichen Reaktionen synthetisiert und kontrollieren die Migration verschiedener Leukozytenpopulationen über das Endothel in den Entzündungsherd.

Regulatorische T-Zellen exprimieren höhere Konzentrationen von RGS1, RGS9 und RGS16 als naive Zellen. Hochregulierung von RGS Molekülen in  $T_{reg}$  desensibilisiert ihre Chemokinrezeptoren und limitiert ihre Migrationsfähigkeit. Es wurde beschrieben, dass sowohl bei naiven als auch bei regulatorischen T-Zellen eine inverse Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Migration und den Konzentrationen an RGS1, RGS9 and RGS16 besteht (Agenes et al., 2005).

RGS1 spielt eine wichtige Rolle bei der negativen Regulation der Chemotaxis von B-Zellen (Moratz et al., 2000; Reif und Cyster, 2000). So ergaben Untersuchungen an RGS1-defizienten Mäusen, dass deren B-Zellen auf die Chemokine CXCL12 und CXCL13 mit einer exzessiven Migration antworteten (Moratz et al., 2004).

Auch in dendritischen Zellen modulieren RGS-Moleküle die Antwort auf Chemokine. Signale durch die Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 verursachten eine stark erhöhte Expression von RGS1, RGS16 und RGS20 in DCs (Shi et al., 2004). RGS-Moleküle stellen also einen Mechanismus dar, mit dem Toll-like Rezeptoren die Signale durch Chemokin Rezeptoren und andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren regulieren können.

### 3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mögliche Expressionsunterschiede von Molekülen, die charakteristisch sind für verschiedene Subpopulationen regulatorischer Immunzellen, zwischen einer Population mit niedrigem Risiko für allergische Erkrankungen (Bauern) und einer Population mit durchschnittlichem Risiko für allergische Erkrankungen (Nicht-Bauern) zu ermitteln. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Moleküle in der „low risk“ Population höher exprimiert sind als in der Kontrollgruppe. Hierfür sollte eine Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels Real time RT-PCR im Nabelschnurblut durchgeführt werden. Die Blutproben wurden im Rahmen der PASTURE-Studie gewonnen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

- Sind die gewählten Moleküle IDO, ILT3, ILT4, FOXP3 sowie RGS1 im Nabelschnurblut mittels Real time RT-PCR nachweisbar?
- Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Bauern und Nicht-Bauern im Hinblick auf die Genexpression dieser Moleküle in Nabelschnurblut? Falls ja, welche Faktoren erklären den „Bauerneffekt“?
- Gibt es in den fünf verschiedenen Ländern Unterschiede in der Genexpression?
- Welche Störfaktoren gibt es, die den Einfluss des Bauernstatus auf die Expression der Gene im Nabelschnurblut signifikant modifizieren? Wie groß ist deren Einfluss?
- Wie sehr unterscheiden sich die für die Störfaktoren korrigierten („adjustierten“) Ergebnisse von den nicht-adjustierten Ergebnissen?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Studiendesign und Studienpopulation

Die PASTURE Studie ist eine multizentrische, prospektive Geburtskohortenstudie, die in ländlichen Gegenden fünf europäischer Länder durchgeführt wurde: Deutschland (Oberbayern), Österreich (Salzburger Land), Schweiz (Kanton St. Gallen), Finnland (Zentralfinnland, Umgebung von Kuopio) und Frankreich (Umgebung von Besançon).

In jedem der teilnehmenden Länder sollten etwa 100 Bäuerinnen und 100 Nicht-Bäuerinnen während des dritten Trimenons der Schwangerschaft rekrutiert werden.

Vor Studienbeginn wurde eine Fallzahlschätzung durchgeführt, wobei man von folgenden Annahmen ausging: Es werden in jedem der beiden Arme (Bauern- bzw. Nicht-Bauernkinder) etwa 340 Studienteilnehmer benötigt, um einen Unterschied in der atopischen Sensibilisierung im Alter von einem Jahr von 12% in der Kontrollgruppe gegenüber 6% bei den Bauernkindern feststellen zu können. Die Schätzung einer Prävalenz von 12% stammt aus der „non-risk“ Population einer großen europäischen, multizentrischen Geburtskohortenstudie (AMICS, Asthma Multicenter Infant Cohort Study). Unter der Annahme, dass etwa 20% der Teilnehmer die Studie vorzeitig abbrechen, müssen in jedem Arm ca. 400 Kinder rekrutiert werden.

Die Rekrutierung begann im August 2002 und dauerte bis März 2005.

Dabei wurden „Bäuerinnen“ definiert als Frauen, die auf einem Bauernhof, auf dem Tiere gehalten werden, leben. Es wurde nicht zwischen Voll- und Teilzeitbauern unterschieden. „Nicht-Bäuerinnen“ waren definitionsgemäß Frauen, die in der gleichen ländlichen Gegend leben und im gleichen Krankenhaus entbinden wie die Bäuerinnen, jedoch nicht auf einem Bauernhof leben. Frauen aus Städten mit mehr als 30.000 Einwohnern oder aus Industriestandorten wurden ausgeschlossen.

Als allgemeine Ausschlusskriterien wurden festgelegt: Frauen unter 18 Jahren, Zwillingsschwangerschaften, Kinder mit Geschwistern, die bereits an der Studie teilnahmen, geplanter Umzug vor Studienende, Familien ohne Telefon oder mit mangelnden Kenntnissen der deutschen Sprache sowie Familien, in denen mindestens ein Elternteil täglich in die Stadt pendelt. Ausschlusskriterien nach der Geburt stellten Frühgeburten vor der 37. Schwangerschaftswoche und schwerwiegende genetische Erkrankungen des Kindes dar.

Die Rekrutierung fand in Schwangerschaftskursen und durch Hebammen bei der Vorstellung der Schwangeren in den Kliniken statt. Jede Schwangere wurde über die Studie informiert und gebeten, einen kurzen demographischen Fragebogen auszufüllen. Nach Überprüfung der

Ein- und Ausschlusskriterien wurde von jeder teilnehmenden Familie eine Einverständniserklärung unterschrieben.

Vor Studienbeginn wurde das Projekt von der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer begutachtet und positiv beurteilt. In allen anderen Ländern wurde vor Studienbeginn das Votum der jeweils zuständigen Ethikkommission eingeholt.

## **4.2 Fragebögen**

Die PASTURE-Fragebögen und Interviews wurden innerhalb des Studienteams auf Grundlage von Fragen aus den Fragebögen der ISAAC (International Study on Asthma and Atopy in Childhood), der ALEX (Allergy and Endotoxin Study) sowie der PARSIFAL (Prevention of Allergy – Risk factors for Sensitization in Children Related to Farming and Anthroposophic Life Style)-Studie entwickelt (Asher et al., 1995). Fragen zu den elterlichen Atemwegserkrankungen stammen außerdem aus dem Fragebogen der American Thoracic Society (ATS) (Ferris, 1978).

Bis zum Ende des ersten Lebensjahres des Kindes wurden Daten in drei standardisierten Fragebögen sowie wöchentlichen Tagebüchern erhoben: Während der letzten vier Wochen der Schwangerschaft wurde vom Studienpersonal ein Hausbesuch durchgeführt. In einem ausführlichen Interview sollte insbesondere der Kontakt zu Ställen und Vieh während der Schwangerschaft, atopische Erkrankungen der Mutter sowie allgemeine Lebensumstände, z.B. Familiengröße, Haustiere und Rauchgewohnheiten dokumentiert werden. Als das Kind zwei Monate alt war, wurde ein zweites standardisiertes Interview im Haus der Familie durchgeführt. Dabei wurden Fragen zu den ersten Lebenswochen des Kindes, zu den Stillgewohnheiten usw. gestellt. Zusätzlich wurde dem Vater während der ersten beiden Lebensmonate des Kindes ein selbst-auszufüllender Fragebogen zugeschickt, den das Studienpersonal beim Hausbesuch einsammelte. Während des gesamten ersten Lebensjahres füllte die Mutter wöchentlich ein Tagebuch aus, in dem Gesundheitszustand und Ernährung des Kindes sowie der Kontakt zum Stall und zu Tieren dokumentiert wurde.

Im Alter von einem Jahr erfolgte während eines Klinikbesuchs eine ärztliche Untersuchung, bei der besonderes Augenmerk auf mögliche Anzeichen einer atopischen Dermatitis gelegt wurde. Außerdem fand während des Besuchs ein drittes standardisiertes Interview statt, das einen Überblick über das erste Lebensjahr des Kindes geben sollte.

## **4.3 Sammlung von Staub-, Milch- und Stuhlproben**

Während des Zweimonatsinterviews wurden Staubproben vom Fußboden und von der Matratze des Kindes und der Mutter standardisiert gesammelt. Darüber hinaus wurden

Kuhmilchproben sowie eine Muttermilchprobe und eine Stuhlprobe des Kindes gesammelt. Zum Klinikbesuch brachten die Eltern eine weitere kindliche Stuhlprobe mit. Zuvor waren wieder Staubproben von Fußboden und Matratze des Kindes standardisiert gesammelt worden.

#### 4.4 Blutabnahme und Lagerung

Falls die Mutter ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gegeben hatte, wurde bei der Geburt von einer Hebamme ca. 24 ml Nabelschnurblut abgenommen. Das Blut wurde der Reihe nach in folgende Röhrchen gefüllt: 2,5 ml Lithium-Heparinblut für die Analyse von Zytokinen, 2,5 ml EDTA-Blut für ein Differential-Blutbild und DNA-Analysen, ca. 4 ml Serum zur Bestimmung von IgE, zweimal 2,5 ml in ein PAXgene Röhrchen (siehe unten) für Genexpressionsuntersuchungen sowie ca. 10 ml EDTA-Blut für die Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs). Die Blutabnahme erfolgte nach festgelegter Rangfolge, wobei die Analyse der Zytokine die höchste Priorität besaß. Diese Regelung war nötig, da nicht immer ausreichend Blut gewonnen werden konnte, um alle Bestimmungen durchzuführen.

Das Lithium-Heparinblut für die Zytokinmessung wurde innerhalb von 24 Stunden nach Blutabnahme weiterverarbeitet. Das abzentrifugierte Serum wurde aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die PAXgene Röhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Überschüssiges Lithium-Heparinblut bzw. EDTA-Blut wurde im Verhältnis von 1:4 mit Trizol gemischt, gevortext und ebenfalls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei der Geburt wurde außerdem venöses Blut der Mutter abgenommen.

Als das Kind ein Jahr alt war, wurde während des Klinikbesuchs Blut von Kind und Vater abgenommen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Art und Zeitpunkt der Analysen im kindlichen Blut und Blut der Eltern.

| Art der Analyse              | Art der Blutprobe   | Zeitpunkt der Analyse                    |
|------------------------------|---------------------|------------------------------------------|
| Zytokinmessung               | Lithium-Heparinblut | Geburt, 1 Jahr (Kind)                    |
| Extraktion von DNA           | EDTA-Blut           | Geburt (Kind, Mutter);<br>1 Jahr (Vater) |
| Extraktion von RNA           | PAXgene Röhrchen    | Geburt, 1 Jahr (Kind, Eltern)            |
| Gesamt IgE, spezifisches IgE | Serum               | Geburt, 1 Jahr (Kind, Eltern)            |
| Isolierung von PBMC          | EDTA-Blut           | Geburt (Kind)                            |

**Tabelle 1 Überblick über Blutproben und Analysen**

## 4.5 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation aus Nabelschnurblut wurden jeweils 2,5 ml direkt in PAXgene Blood RNA Tubes (Fa. PreAnalytix / Qiagen, Hilden) abgenommen. Nach kurzem Mischen der Röhrchen erfolgen die Lyse der Zellen und die Stabilisierung der intrazellulären RNA. In abgenommenem Blut ohne Zusätze wäre die RNA begrenzt stabil und würde sehr schnell durch RNasen abgebaut werden. Im immunologischen Labor der Kinderklinik in Zürich wurden die PAXgene Röhrchen aufgetaut und vor der RNA Isolierung mind. 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Isolierung wurde der kommerzielle PAXgene 96 Blood RNA Kit (Fa. PreAnalytix / Qiagen, Hilden) verwendet, mit dem aus 96 PAXgene Röhrchen gleichzeitig RNA isoliert werden konnte.

Durchführung:

Zu Beginn stand ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 4000 g), der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde mit RNase-freiem Wasser gewaschen, resuspendiert und erneut durch Zentrifugieren (10 min bei 4000 g) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in Puffer BR1 resuspendiert und anschließend mit Proteinase K und Puffer BR2 für 30 Minuten bei 65°C inkubiert, um Proteine zu verdauen. Um übrigen Zelldebris zu entfernen, wurden die Lysate auf eine 96er PAXgene Filterplatte appliziert und zentrifugiert (10 min bei 5600 g). Die RNA wurde mit absolutem Ethanol präzipitiert und an ein Paxgene-Säulchen gebunden. Danach wurde der Waschpuffer BR3 auf die Säule pipettiert und die Flüssigkeit mit einer Vakuum-Pumpe abgesaugt.

Um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde eine DNaseI-Behandlung durchgeführt. Der DNaseI Inkubations-Mix wurde direkt auf die Membran pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Waschen der gebundenen RNA wurde Puffer BR3 auf die Säule pipettiert und mit der Vakuum-Pumpe abgesaugt. Es folgten zwei Waschschrte mit ethanolhaltigem Puffer BR4, um noch vorhandene Salze und Proteine zu entfernen. Die RNA wurde mit Puffer BR5 eluiert. Eine abschließende Denaturierung bei 80°C für 10 Minuten entfernt Tertiärstrukturen der RNA. Nach dem Abkühlen wurde die gereinigte RNA bei -20°C gelagert.

## 4.6 Quantifizierung der RNA

RNA-Moleküle können UV-Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren. Diese Eigenschaft kann zur spektralphotometrischen Bestimmung der Nukleinsäuremenge genutzt werden. Bei

Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm und einer Optischen Dichte (OD) von 1 beträgt die Konzentration an einzelsträngiger RNA 40 µg/ml.

Zur Bestimmung der Reinheit der präparierten RNA wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient  $A_{260} / A_{280}$  gebildet. Dieser liegt bei reiner RNA, d.h. bei geringer Proteinkontamination, bei einem Wert von etwa 2,0.

Die Messung wurde mit dem NanoDrop ND-1000 UV/VIS-Spektralphotometer (Fa. PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Dieses UV/Vis-Spektralphotometer verfügt über ein Probehaltensystem, das im Gegensatz zu dem herkömmlichen auf Küvetten basierenden Messverfahren, nur minimale Probenvolumina (ca. 1 µl) benötigt. Die Probe wird dabei auf das Ende eines Glasfaserkabels aufgebracht und mit einem zweiten Glasfaserkabel verbunden. Der Flüssigkeitstropfen wird dabei allein durch die Oberflächenspannung fixiert.

Durchführung:

Zunächst wurde ein Leerwert mit dem RNA Elutionspuffer BR5 gemessen. Anschließend wurden jeweils 1,25 µl Probe auf die Messoberfläche aufgetragen. Nach jeder Messung wurde die Messoberfläche mit einem Papiertuch gereinigt. Proben, die eine RNA-Konzentration von weniger als 10 ng/µl enthielten, wurden von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen. Lag die Konzentration bei größer als 200 ng/µl, wurde ein Verdünnungsschritt (auf ca. 100 ng/µl) mit Puffer BR5 durchgeführt.

#### **4.7 Reverse Transkription (RT)**

Als nächster Schritt folgte die Umschreibung der mRNA in cDNA. Für diese Reaktion wird die Reverse Transkriptase verwendet, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges benützt. Um mit der Strangsynthese zu beginnen, benötigt die Reverse Transkriptase (RT) kurze doppelsträngige Nukleinsäurebereiche (Primer-RNA Hybride) an deren 3'-Ende die RT zum RNA-Strang komplementäre Nukleotide anbauen kann. Als Primer dienen willkürlich zusammengesetzte Hexanukleotid-Gemische (Random Hexamer Primer), die an zufälligen Positionen der RNA binden. Alternativ können Oligo-dT-Primer verwendet werden, die an das Poly-A-Ende der mRNAs binden und vom 3'-Ende beginnend die Strangsynthese ermöglichen.

Für die cDNA Synthese wurden im Rahmen dieser Arbeit die „TaqMan Reverse Transcription Reagents“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Ein Kit enthält MultiScribe Reverse Transkriptase, RNase Inhibitor, deoxyNTP Mix, Random Hexamer Primer, 10x RT Puffer und MgCl<sub>2</sub> Lösung. Bei der MultiScribe Reverse Transkriptase handelt es sich um eine rekombinante Reverse Transkriptase aus dem „Moloney Murine Leukemia Virus“, die RNase H-Aktivität besitzt. Das bedeutet, dass die RT den abbeschriebenen

mRNA-Strang gleichzeitig verdaut, wodurch ein 1:1 Verhältnis zwischen mRNA (Matrize) und cDNA (Produkt) besteht.

Durchführung:

Der gesamte Ansatz wurde auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde ein gemeinsamer Mastermix für 8 Proben angesetzt. Dieser Bestand je Probe aus

12 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
6 µl 10x PCR Puffer II  
6 µl dNTP jeweils 10mM  
3 µl Random Hexanukleotide  
1,5 µl Rnase Inhibitor  
2 µl MuLV

Als Template wurden 300 ng RNA eingesetzt. Das Volumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf 29,5 µl eingestellt und in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von 30,5 µl Mastermix wurde die Reaktion in einem Thermocycler Primus (MWG-Biotech AG, Ebersberg) in drei Schritten durchgeführt: 10 min 25°C (Hexanukleotid-mRNA-Hybridisierung), 40 min 42°C (Strangsynthese) und 5 min 95°C (Denaturierung).

#### **4.8 Das Prinzip der Real-time TaqMan PCR**

Bei der Real time RT-PCR haben sich verschiedene Quantifizierungsmethoden etabliert, die alle auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals beruhen, das sich proportional zur Zunahme des PCR-Produkts verhält (Heid et al., 1996).

Die Real Time RT-PCR ist die geeignetste Methode für die Quantifizierung von mRNA, vor allem wegen ihrer hohen Sensitivität, der guten Reproduzierbarkeit und dem großen Quantifizierungsbereich (Bustin, 2000).

Das älteste Quantifizierungsprinzip basiert auf interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen. Der Hauptnachteil dieser Methode ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff nicht zwischen spezifischem und unspezifischem PCR-Produkt unterscheidet. Dies setzt einen großen Aufwand für die Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen (Primerspezifität, Reaktionstemperaturen etc.) voraus.

Holland et al. lösten das Problem der mangelnden Spezifität durch die Einführung von genspezifischen, radioaktiv-markierten Sonden, die die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase ausnützen (Holland et al., 1991). Die Sonde wird dabei so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern hybridisiert.

Diese Methode wurde unter Verwendung des Prinzips des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (fluorescence resonance energy transfer, FRET (Cardullo et al., 1988), weiterentwickelt. Ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in räumlicher Nähe eines zweiten Fluoreszenzfarbstoffs befindet, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des ersten Farbstoffs entspricht, absorbiert („quencht“) einen Teil der emittierten Energie und führt zu einem schwächeren Fluoreszenzsignal. Man unterscheidet dabei drei verschiedene Nachweismethoden, das sog. „TaqMan“-Prinzip (Livak et al., 1995), „molecular beacons“ und „hybridisation probes“. Im Folgenden soll nur auf die TaqMan Sonden eingegangen werden.

Die TaqMan-Sonde ist ein Oligonukleotid mit einer Sequenz komplementär zum amplifizierenden Fragment und ist an den Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter (R) und einem Quencher (Q), konjugiert (siehe Abbildung 8). Der fluoreszierende Reporterfarbstoff (ein Fluoreszein-Derivat) ist kovalent an das 5'-Ende und der Quencherfarbstoff (ein Rhodamin-Derivat) an das 3'-Ende der Sonde gebunden.

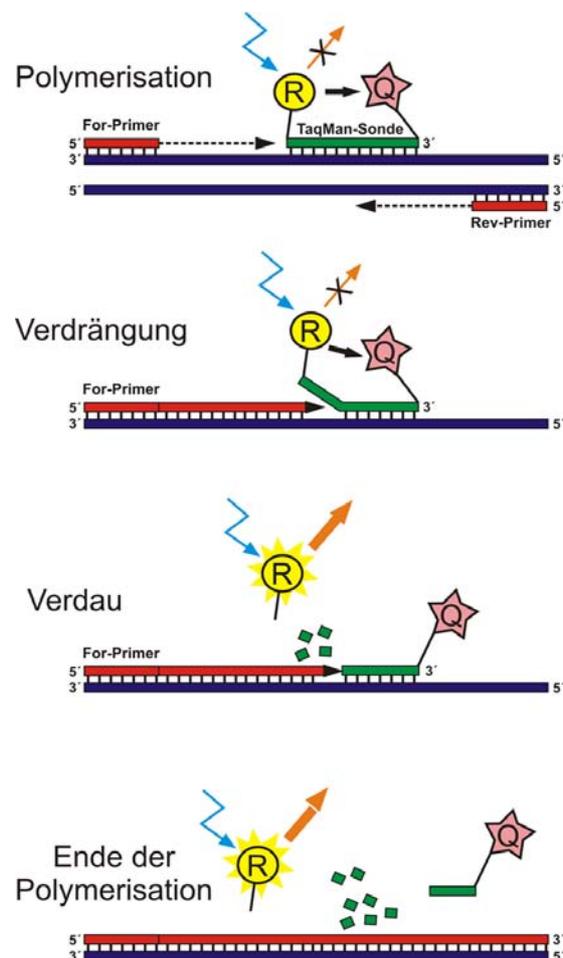
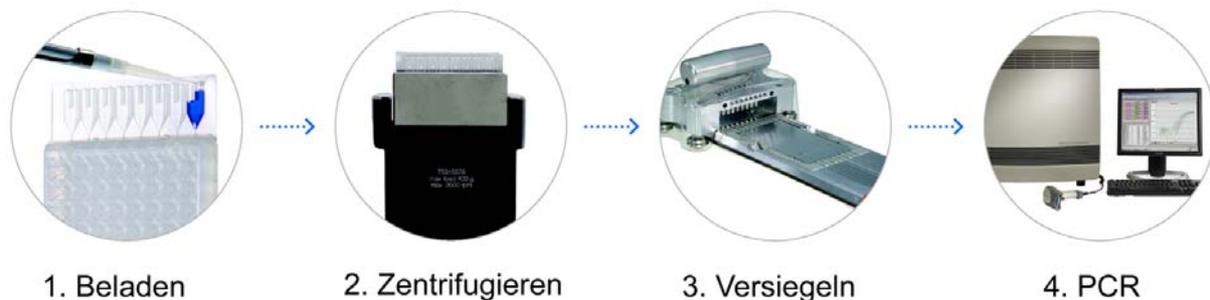


Abbildung 8 Das Prinzip der TaqMan PCR

Wenn die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt wird, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und setzt sie frei. Reporter und Quencher werden räumlich getrennt und der Reporter kann nun in vollem Maße fluoreszieren. Da in jedem Zyklus neue Reporter-Moleküle freigesetzt werden, steigt die Fluoreszenz proportional zur Anzahl der synthetisierten PCR-Produkte an. Diese ansteigende Fluoreszenzemission wird durch einen Sequenzdetektor „real time“, d.h. während des PCR-Laufs gemessen.

#### 4.9 TaqMan Low Density Array

Der TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems, Weiterstadt) (Abbildung 9) ermöglicht, bis zu 384 Gene für eine Probe in einer „microfluidic card“ zu messen. Primer und Sonde sind in getrockneter Form in einer Plastikkarte mit 384 Vertiefungen fixiert. Die Reaktionskammern nehmen PCR Reaktionsvolumina von 1 µl auf und sind durch feine Kanäle miteinander verbunden.



**Abbildung 9 Arbeitsschritte beim TaqMan Low Density Array (LDA)**

Das Gemisch aus cDNA und PCR Mastermix wird manuell in die Einfüllkammern pipettiert; anschließend werden die Karten in aufrechter Position zentrifugiert. Die Flüssigkeit wandert entlang feiner Kanäle in die Reaktionskammern.

Der TaqMan Low Density Array stellt ein „high-throughput“ System für die real-time PCR zur Anwendung mit dem AB 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Weiterstadt) dar. Es werden nur geringe RNA-Mengen benötigt und die Zahl an Pipettierschritten wird reduziert.

Primer und Sonden wurden aus der großen Anzahl an TaqMan Gene Expression Assays ausgewählt, die optimierte Sets aus Primer und Sonde enthalten. Eine Liste der Assays ist in Tabelle 2 aufgeführt.

| Assay ID      | Genname                                                                                                 | Genbank-bezeichnung | Amplikon       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------|
| Hs99999901_s1 | 18S ribosomale RNA (18S)                                                                                | X03205              | nt 609 - 795   |
| Hs99999907_m1 | Beta-2-Microglobulin (B2M)                                                                              | NM_004048           | nt 410 - 484   |
| Hs99999908_m1 | Beta-Glucuronidase (GUSB)                                                                               | NM_000181           | nt 1816 - 1896 |
| Hs01085831_g1 | Forkhead box P3 (FOXP3)                                                                                 | NM_014009           | nt 647 - 762   |
| Hs00158027_m1 | Indoleamin-Pyrrol-2,3-Dioxygenase (IDO)                                                                 | NM_002164           | nt 207 - 306   |
| Hs00275975_m1 | Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2 (LILRB2; ILT4) | NM_005874           | nt 1448 - 1557 |
| Hs00429000_m1 | Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4 (LILRB4; ILT3) | NM_006847           | nt 789 - 864   |
| Hs00175260_m1 | Regulator of G-protein signalling 1 (RGS1)                                                              | NM_002922           | nt 347 - 461   |

**Tabelle 2** Verwendete TaqMan Gene Expression Assays  
nt = Nukleotid

#### 4.10 Vorbereitung und Durchführung der Real time RT-PCR

Für den TaqMan PCR-Ansatz wurde der vorgefertigte „2x TaqMan Universal PCR-Mastermix“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Der Mastermix beinhaltet die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, AmpErase UNG (Uracil-N-Glykosylase), dNTPs mit dUTP, eine passive Referenz und einen Reaktionspuffer mit Magnesiumchlorid.

Die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase ist eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq-DNA-Polymerase. Sie zeigt bei Raumtemperatur keine Aktivität und muss zu ihrer Aktivierung anfänglich für 10 Min. auf 95°C erhitzt werden. So wird die Bildung von Primer-Dimeren verhindert. Dem Mastermix wurde außerdem das Enzym UNG (Uracil-N-Glykosylase) hinzugefügt, das vor „carryover“-Kontaminationen beim Pipettieren der Ansätze schützt (Longo et al., 1990). Bei Verwendung von dUTPs in den PCR-Reaktionen wird in die DNA von Kontaminationen eingebautes UTP durch die Glykosylase in einem anfänglichen Schritt bei 50°C gespalten. Während der darauffolgenden 10 Min. bei 95°C wird das Enzym inaktiviert, um die anschließende PCR-Amplifikation nicht zu stören. Als passive Referenz wurde der Farbstoff 6-Carboxy-X-rhodamin (Rox) hinzugegeben, der keinen

Einfluss auf die PCR hat. Das Rox Fluoreszenzsignal wird zur Normalisierung der Fluoreszenzsignale herangezogen, um Fluoreszenzfluktuationen auszugleichen.

Pipettierschema pro Probe:

20 µl cDNA

30 µl RNase freies Wasser

50 µl TaqMan Universal PCR Master Mix

Der gesamte Ansatz wurde auf Eis pipettiert. Der Master Mix wurde vor Verwendung kurz gevortext.

Die TaqMan Low Density Arrays sind in verschiedenen Formaten erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Format verwendet, mit dem man 8 Proben á 48 PCR-Reaktionen messen kann. Jede der 8 Einfüllkammern ist mit 48 Reaktionskammern verbunden (Abbildung 10). Aufgrund der sehr großen Anzahl an Proben und der hohen Kosten der Low Density Arrays wurde jeweils nur ein Replikat gemessen. In jede Einfüllkammer wurde möglichst ohne Luftblasen 100 µl des Ansatzes pipettiert (Abbildung 9). Dies entspricht 100 ng totaler RNA, umgeschrieben zu cDNA. Anschließend wurde die Platte mit Folie versiegelt, mit einem Spezialsachtel gut verschlossen und die Einfüllkammern abgeschnitten. Die Platte wurde kurz bei Raumtemperatur zentrifugiert (1500 rpm), in das AB 7900HT Gerät gestellt und gemäß folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubiert:

| <b>Schritt</b>                           | <b>Dauer/Temperatur</b> |             |
|------------------------------------------|-------------------------|-------------|
| Glykosylase-Verdau                       | 2 Min./50°C             |             |
| Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase | 10 Min./95°C            |             |
| Denaturierung                            | 30 Sek./95°C            | } 45 Zyklen |
| Primer Annealing und Extension           | 1 Min./60°C             |             |

Die Daten wurden mit der Software SDS (Sequence Detection Software) 2.1 (Applied Biosystems) ausgewertet.

| Proben ID |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Port |
|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| 1         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | A    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 2         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | C    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 3         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | E    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 4         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | G    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 5         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | I    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 6         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | K    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 7         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | M    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |
| 8         | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | CTL | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | O    |
|           | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34  | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |      |

Abbildung 10 Verwendetes TaqMan Low Density Array Format (Port = Einfüllkammer)

### 4.11 Relative Quantifizierung

Jede PCR besitzt eine exponentielle Phase, eine lineare Phase und eine Plateauphase (Abbildung 11). In der exponentiellen Phase wird die Menge des Startmaterials mit jedem Zyklus verdoppelt. In der zweiten Phase verlangsamt sich der Prozess zu einem linearen Wachstum, da Primer und aktives Enzym weniger werden und die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnukleotide) ansteigt, welche die PCR hemmen. Später geht die Reaktion in eine Plateauphase über und kommt zum Stillstand.

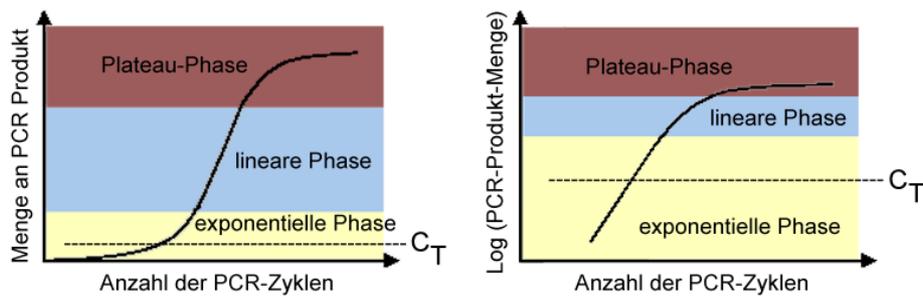


Abbildung 11 Verlauf der PCR und Ermittlung des C<sub>T</sub>-wertes

In der Real time RT-PCR nützt man die Tatsache aus, dass die Menge des PCR-Produkts in der exponentiellen Phase proportional zur Ausgangstemplatemenge ist (Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996).

Um zu Beginn der exponentiellen Phase messen zu können, wird meist der Ct-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") verwendet, der den Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die relative Quantifizierung bestimmt die Veränderungen in der mRNA-Menge bezogen auf die Menge eines internen Standards, meist ein sogenanntes *Housekeeping* Gen (Haushaltsgen). Es werden *Housekeeping* Gene ausgewählt, die in den untersuchten Ansätzen möglichst in einer konstanten Menge exprimiert werden. Hier wurden die *Housekeeping* Gene 18S rRNA,  $\beta$ -2-Microglobulin und  $\beta$ -Glucuronidase (GUSB) verwendet.

Die am häufigsten verwendeten Berechnungsmethoden für die relative Quantifizierung sind die Standardkurven-Methode und die komparative Ct-Methode.

Folgende mathematische Gleichung gilt, um die relative Quantifizierung eines Zielmoleküls im Vergleich zu einem *Housekeeping* Gen zu bestimmen (Pfaffl, 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{(\text{Effizienz}_{\text{Zielmolekül}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Zielmolekül}}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}{(\text{Effizienz}_{\text{Housekeeping Gen}})^{\Delta\text{Ct}_{\text{Housekeeping Gen}}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}$$

Unter Annahme optimaler und identischer Amplifizierung von *Housekeeping* Gen und spezifischem Gen sowie einer Verdoppelung der eingesetzten Menge cDNA pro Zyklus kann die obenstehende Gleichung gekürzt werden ( $\text{Effizienz}_{\text{Zielmolekül}} = \text{Effizienz}_{\text{Housekeeping Gen}} = 2$ ) und die Ergebnisse können durch die Ratio  $2^{-(\Delta\text{Ct}_{\text{Zielmolekül}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Housekeeping Gen}})}$  ausgedrückt werden (Livak und Schmittgen, 2001).

Die von Applied Biosystems entwickelten und optimierten TaqMan Gene Expression Assays beinhalten Amplikons, die meist kleiner als 150 Basenpaare sind, und besitzen Amplifikations-Effizienzen zwischen 90 und 110% (Applied Biosystems, User Bulletin No. 2, 2001). Daher kann die komparative Ct-Methode angewendet werden. Eine Effizienzkorrektur ist nicht notwendig.

Im ersten Schritt der Auswertung wurde der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet, indem der Referenzwert (*Housekeeping* Gen, z.B. 18S rRNA) vom zu untersuchenden Parameter subtrahiert wurde. Dies wurde für sämtliche Werte durchgeführt. Anschließend wurde der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert berechnet, indem die errechneten  $\Delta\text{Ct}$ -Werte auf einen Kalibrator bezogen wurden. Als Kalibrator wurde eine willkürlich gewählte Probe eines „Nicht-Bauernkindes“ verwendet, dessen  $\Delta\text{Ct}$ -Wert von allen anderen  $\Delta\text{Ct}$ -Werten abgezogen wurde. Im letzten Schritt, wurde die relative mRNA-Menge errechnet, indem alle Werte mit einem negativen Vorzeichen versehen und potenziert wurden.

## 4.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistical Package for Social Sciences (SPSS) für Windows, Version 14.0 (SPSS GmbH, München).

Zunächst wurde die Studienpopulation charakterisiert: Die Häufigkeiten von demographischen (z.B. Geschlecht, Familienanamnese für atopische Erkrankungen, Schulbildung der Mutter) und anderen Eigenschaften von Bauernkinder und Kontrollkindern wurden mittels  $\chi^2$ -Test verglichen, da es sich hierbei um nominale bzw. ordinale Daten handelt. Zum Vergleich stetiger Variablen (z.B. Alter, Body-Mass-Index der Mutter) diente der Mann-Whitney-*U*-Test (Wilcoxon-Rangsummentest).

Korrelationen zwischen der Expression der verschiedenen *Housekeeping* Gene wurden mit dem nicht-parametrischen Spearman-Rho-Test ermittelt.

Bei den Real time RT-PCR-Daten lag auch nach Logarithmieren der Daten keine Normalverteilung vor. Zur Deskription der stetigen Daten wurde daher der Median mit erstem und vierten Quartil herangezogen. Zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben (Bauern und Nicht-Bauernkinder) hinsichtlich einer stetigen Zielvariablen (Expression der verschiedenen Gene) wurde der Mann-Whitney-*U*-Test verwendet.

Um später eine logistische Regressionsanalyse durchführen zu können, wurden die Daten dichotomisiert, und zwar in das untere Quartil und die übrigen drei Quartile. Zum Vergleich der Häufigkeiten der beiden Kategorien wurde ebenfalls der  $\chi^2$ -Test angewandt. Die Ergebnisse wurden als Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall ausgedrückt.

Bei den stratifizierten Analysen wurde zum Vergleich der Homogenität der Odds Ratios der jeweiligen Subgruppen der Breslow-Day Test verwendet. Zum Vergleich der Häufigkeiten der beiden Kategorien diente der  $\chi^2$ -Test, der bei Vierfeldertafeln mit geringen Stichprobenzahlen durch den exakten Test nach Fisher ersetzt wurde.

Anschließend wurden logistische Regressionsanalysen durchgeführt, die den Bauernstatus als unabhängige Variable verwendeten. Es wurde für alle Confounder adjustiert, die einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hatten. Bei der Adjustierung für Länder diente Deutschland als Referenzland. Zuletzt wurden stratifizierte, multivariate Analysen durchgeführt, bei denen nach der mütterliche Anamnese von atopischen Erkrankungen (Asthma, allergische Rhinitis oder Neurodermitis) oder dem mütterlichen Rauchverhalten stratifiziert wurde. Die Regressionen wurden mit der Methode „Einschluss“ und „vorwärts schrittweise (Likelihood-Quotient)“ durchgeführt. Bei der Methode „Einschluss“ werden alle Variablen simultan ins Regressionsmodell aufgenommen. Bei der Methode „vorwärts schrittweise (Likelihood-Quotient)“ werden die Variablen bei jedem Schritt auf Aufnahme

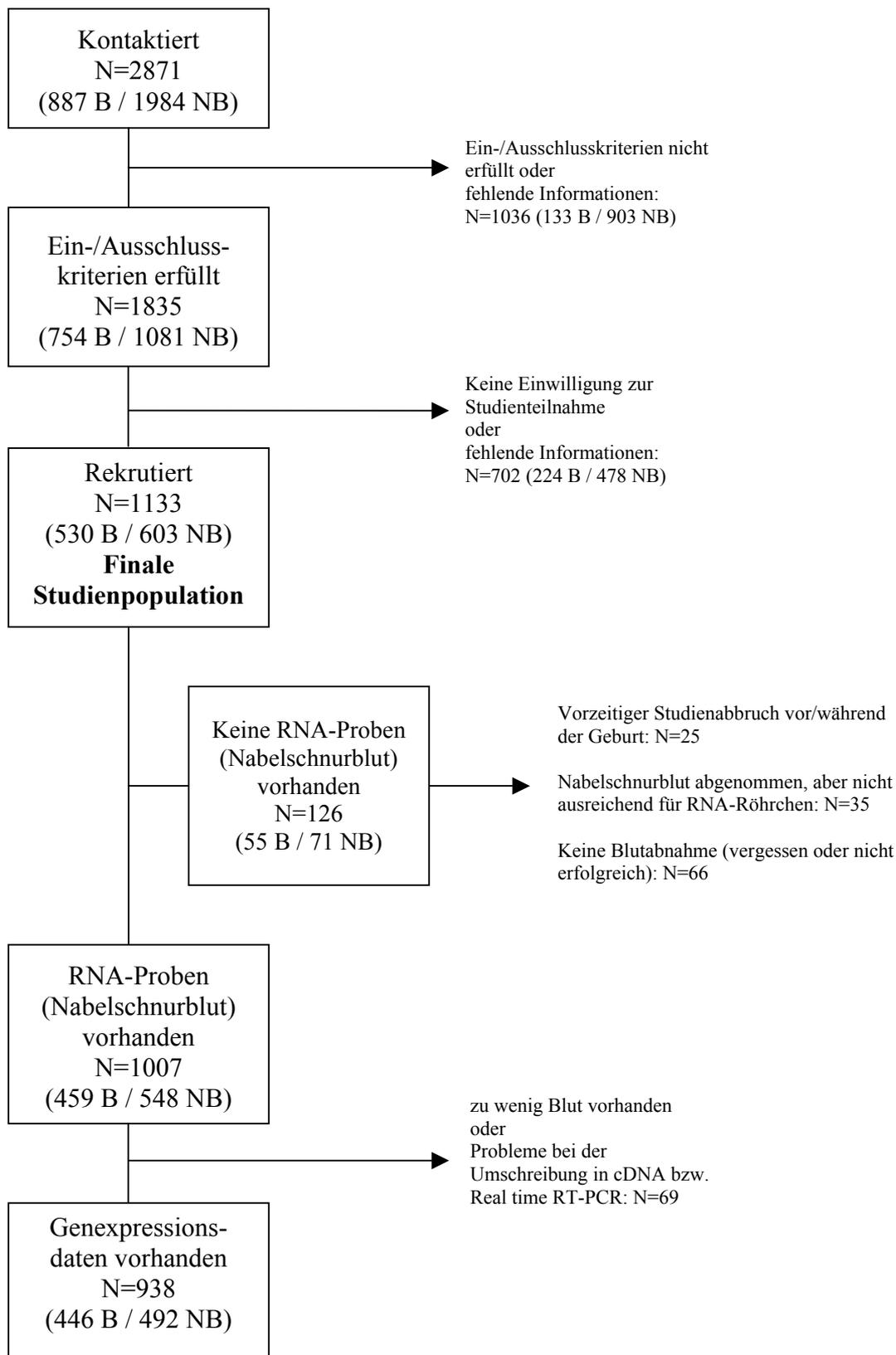
und Ausschluss geprüft, wobei als Wahrscheinlichkeit für die Aufnahme ins Modell bei der schrittweisen Methode 0,05 und als Wahrscheinlichkeit für den Ausschluss aus dem Modell 0,10 eingestellt wurde.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Studienteilnahme

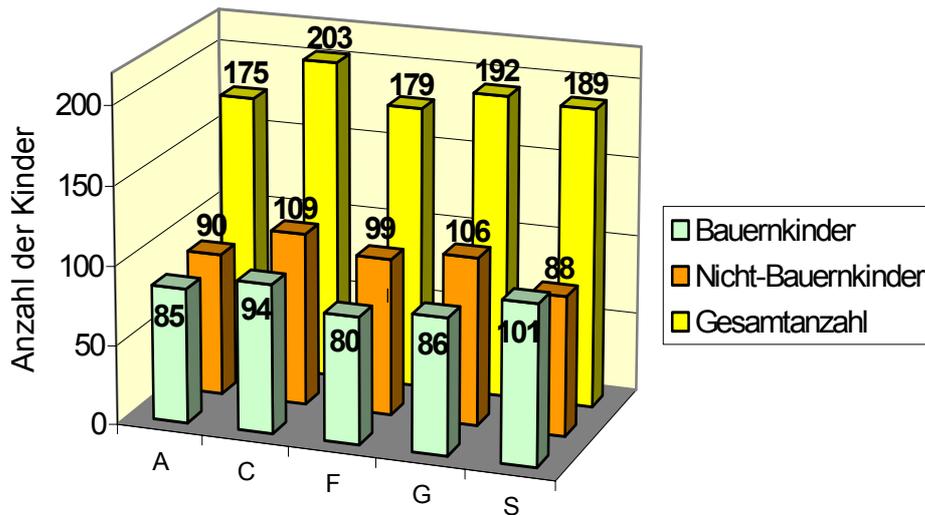
Insgesamt wurden 2871 Frauen in den fünf Studienzentren (Finnland, Frankreich, Deutschland, Österreich, Schweiz) angesprochen, über die Studie informiert und gebeten, einen kurzen Fragebogen auszufüllen (siehe Abbildung 12). Von diesen Frauen erfüllten 1036 nicht alle Ein- und Ausschlusskriterien oder gaben unzureichende Informationen ab. 1835 Frauen wurden um ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gebeten. Die finale Studienpopulation setzte sich letztlich aus 1133 Frauen zusammen, davon waren 530 Bäuerinnen und 603 Nicht-Bäuerinnen. Die Nicht-Bauernfamilien stammen jeweils aus derselben ländlichen Gegend wie die Bauernfamilien, leben aber nicht auf dem Bauernhof. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde das abgenommene Nabelschnurblut für verschiedene Analysen verwendet. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden nur die RNA-Proben analysiert. Von 126 Kindern war aus verschiedenen Gründen keine RNA-Probe vorhanden: Einige Mütter zogen vor der Geburt ihre Einwilligung zur Studienteilnahme zurück (n=25). Die Abnahme des Nabelschnurbluts gelang nicht oder wurde vergessen (n=66). In 35 Fällen reichte das abgenommene Blut nicht aus, um auch das RNA-Röhrchen zu füllen.

Von den 1007 vorhandenen Nabelschnurblut RNA-Proben mussten 69 Proben ausgeschlossen werden, da entweder die Blutmenge im RNA-Röhrchen nicht ausreichte oder Probleme bei der Umschreibung in cDNA oder bei der Real time RT-PCR auftraten. Insgesamt liegen von 938 Proben Genexpressionsdaten zur statistischen Auswertung vor, von denen 446 von Bauern- und 492 von Nicht-Bauernkindern sind. Einen Überblick über die Verteilung von Bauern- und Nicht-Bauernkindern in den einzelnen Ländern gibt Abbildung 13. Die Anzahl der analysierten Nabelschnurproben liegt zwischen 175 (Österreich) und 203 (Schweiz). Der prozentuale Anteil der Bauernkinder ist in Frankreich und Deutschland mit jeweils 45% am niedrigsten, in Finnland mit 53% am höchsten. In Abbildung 12 wird die Rekrutierung der Mütter und das Zustandekommen der endgültigen Anzahl an RNA-Proben grafisch dargestellt.



**Abbildung 12 Rekrutierung der Studienteilnehmer und Zustandekommen der endgültigen Probenanzahl**

B = Anzahl der Bauern, NB = Anzahl der Nicht-Bauern



**Abbildung 13** Verteilung der analysierten Nabelschnurblutproben von Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern in den einzelnen Ländern (n=938)

A = Österreich, C = Schweiz, F = Frankreich, G = Deutschland, S = Finnland

## 5.2 Charakterisierung der Studienpopulation

Zur Charakterisierung der Studienpopulation, stratifiziert nach Farmerstatus, wurden folgende Fragebögen ausgewertet (siehe Material und Methoden, 4.2): Für die Daten der Mutter wurde der Schwangerschaftsfragebogen herangezogen. Die Befragung der Mutter fand im letzten Trimenon der Schwangerschaft während eines Hausbesuchs der Feldarbeiterin statt. Für die väterlichen Daten wurde ein selbst-auszufüllender Fragebogen ausgewertet, der dem Vater während der ersten Lebensmonate des Kindes zugeschickt wurde. Die Daten des Kindes stammen aus dem Fragebogen, den die Feldarbeiterin während des 2-Monatsbesuchs ausgefüllt hatte.

Die Tabellen 3 bis 5 geben einen Überblick über die Studienpopulation, getrennt nach Mutter, Vater und Kind. Für die Anamnese atopischer Erkrankungen wurden folgende Fragen aus den Fragebögen ausgewertet: „Hatten Sie jemals Asthma / allergischen Schnupfen, z.B. Heuschnupfen / Neurodermitis, auch endogenes oder atopisches Ekzem genannt?“ sowie „Wurde die Erkrankung von einem Arzt diagnostiziert?“.

Bei vielen Charakteristika bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Bauernkindern und Kontrollkindern, wie z.B. bei der Anzahl der Geschwister des Neugeborenen, den Haustieren und dem Konsum von Frischmilch während der Schwangerschaft. Diese Faktoren sind potentielle Störgrößen (Confounder), die den Einfluss des Farmerstatus auf die Expression der

untersuchten Gene modifizieren können und die später in den multivariaten Analysen untersucht wurden.

Wie Tabelle 3 veranschaulicht, gibt es 70 Familien, die als „Bauern“ gelten, jedoch nicht auf einem Bauernhof leben. Vor allem in Frankreich trifft es öfters zu, dass Familien einen Bauernhof bewirtschaften, aber nicht auf dem Hof leben (N=59).

Die Population der Kinder, von denen Real time RT-PCR-Daten vorliegen, ist aus den oben genannten Gründen kleiner als die finale Studienpopulation (siehe Abbildung 12). Deshalb wurde überprüft, ob sich diese Subpopulation von der Gesamtpopulation in Bezug auf die untersuchten Charakteristika unterscheidet. Wie den Tabellen 19 bis 21 im Anhang zu entnehmen ist, ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede.

Tabelle 3 Charakterisierung der Studienpopulation: Mutter

|                                  | Nicht-Bauern |               | Bauern |               | p-Wert*          |
|----------------------------------|--------------|---------------|--------|---------------|------------------|
|                                  | n/N          | %             | n/N    | %             |                  |
| <b>Alter der Mutter</b>          |              |               |        |               |                  |
| n=1133                           | 603          |               | 530    |               | <b>0,013</b>     |
| 18-25                            | 101          | 16,8          | 73     | 13,8          |                  |
| 26-35                            | 438          | 72,6          | 368    | 69,4          |                  |
| 35-45                            | 64           | 10,6          | 88     | 16,6          |                  |
| über 45                          | 0            | 0,0           | 1      | 0,2           |                  |
| <b>BMI der Mutter</b>            |              |               |        |               |                  |
| Median (Min .- Max.)             | 22,5         | (16,1 - 43,5) | 23,4   | (16,1 - 48,3) | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Gestationsalter (SSW)</b>     |              |               |        |               |                  |
| Median (Min .- Max.)             | 40,0         | (37 - 43)     | 40,0   | (37 - 43)     | 0,729            |
| <b>Schulabschluss</b>            |              |               |        |               |                  |
| n=1133                           | 603          |               | 530    |               | <b>0,001</b>     |
| kein                             | 6            | 1,0           | 11     | 2,1           |                  |
| Hauptschule                      | 80           | 13,3          | 105    | 19,8          |                  |
| Realschule                       | 253          | 42,0          | 234    | 44,2          |                  |
| (Fach-)Abitur/Hochschule         | 264          | 43,8          | 180    | 34,0          |                  |
| <b>Asthma</b>                    |              |               |        |               |                  |
| n=1133                           | 603          |               | 530    |               | 0,080            |
|                                  | 61           | 10,1          | 38     | 7,2           |                  |
| <b>Diagnose Asthma</b>           |              |               |        |               |                  |
| n=1131                           | 602          |               | 529    |               | 0,091            |
| fehlend: 2                       | 55           | 9,1           | 31     | 5,9           |                  |
| <b>Allerg Rhinitis</b>           |              |               |        |               |                  |
| n=1132                           | 603          |               | 529    |               | <b>&lt;0,001</b> |
| fehlend: 1                       | 196          | 32,5          | 108    | 20,4          |                  |
| <b>Diagnose allerg. Rhinitis</b> |              |               |        |               |                  |
| n=1132                           | 603          |               | 529    |               | <b>&lt;0,001</b> |
|                                  | 131          | 21,7          | 71     | 13,4          |                  |
| <b>Neurodermitis</b>             |              |               |        |               |                  |
| n=1133                           | 603          |               | 530    |               | 0,305            |
|                                  | 57           | 9,5           | 41     | 7,7           |                  |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>    |              |               |        |               |                  |
| n=1132                           | 602          |               | 530    |               | 0,367            |
| fehlend: 1                       | 52           | 8,6           | 38     | 7,2           |                  |

Fortsetzung von Tabelle 3

|                                                  | <b>Nicht-Bauern</b> |          | <b>Bauern</b> |          | <b>p-Wert*</b>   |
|--------------------------------------------------|---------------------|----------|---------------|----------|------------------|
|                                                  | <b>n/N</b>          | <b>%</b> | <b>n/N</b>    | <b>%</b> |                  |
| <b>Mutter aktiv an Bewirtschaftung beteiligt</b> |                     |          |               |          |                  |
| n=1132                                           | 603                 |          | 529           |          | <b>&lt;0,001</b> |
| fehlend: 1                                       | 1                   | 0,2      | 412           | 77,9     |                  |
| <b>Rauchen während der Schwangerschaft</b>       |                     |          |               |          |                  |
| n=1133                                           | 603                 |          | 530           |          | 0,624            |
|                                                  | 46                  | 7,6      | 28            | 5,3      |                  |
| <b>Frischmilch während der Schwangerschaft</b>   |                     |          |               |          |                  |
| n=1086                                           | 603                 |          | 530           |          | <b>&lt;0,001</b> |
|                                                  | 98                  | 16,3     | 406           | 76,6     |                  |
| <b>Wird die Milch abgekocht?</b>                 |                     |          |               |          |                  |
| n=1130                                           |                     |          |               |          |                  |
| fehlend: 3                                       | 602                 |          | 528           |          | <b>&lt;0,001</b> |
| ja, im Sommer                                    | 1                   | 0,2      | 9             | 1,7      |                  |
| ja, immer                                        | 27                  | 4,5      | 94            | 17,8     |                  |
| nein                                             | 69                  | 11,5     | 301           | 57,0     |                  |
| <b>Haustiere</b>                                 |                     |          |               |          |                  |
| n=1133                                           | 603                 |          | 530           |          | <b>&lt;0,001</b> |
|                                                  | 279                 | 46,3     | 437           | 82,5     |                  |
| <b>Katzen</b>                                    |                     |          |               |          |                  |
| n=1132                                           | 603                 |          | 529           |          | <b>&lt;0,001</b> |
| fehlend: 1                                       | 146                 | 24,2     | 366           | 69,2     |                  |
| <b>Hunde</b>                                     |                     |          |               |          |                  |
| n=1129                                           | 602                 |          | 527           |          | <b>0,005</b>     |
| fehlend: 4                                       | 115                 | 19,1     | 250           | 47,4     |                  |

\*Chi<sup>2</sup>-Test bei nominal- bzw. ordinalskalierten Daten, Mann-Whitney-U-Test bei metrischen Daten

Tabelle 4 Charakterisierung der Studienpopulation: Vater

|                                                 | Nicht-Bauern |      | Bauern |      | p-Wert*          |
|-------------------------------------------------|--------------|------|--------|------|------------------|
|                                                 | n/N          | %    | n/N    | %    |                  |
| <b>Alter des Vaters</b>                         |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | <b>0,006</b>     |
| bis 25                                          | 45           | 8,0  | 22     | 4,3  |                  |
| 26 - 35                                         | 342          | 60,4 | 290    | 56,2 |                  |
| über 35                                         | 169          | 31,6 | 204    | 39,5 |                  |
| <b>Asthma</b>                                   |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | 0,150            |
|                                                 | 43           | 7,6  | 28     | 5,4  |                  |
| <b>Diagnose Asthma</b>                          |              |      |        |      |                  |
| n=1078                                          | 563          |      | 515    |      | 0,235            |
| fehlend: 4                                      | 33           | 5,9  | 25     | 4,9  |                  |
| <b>Allergische Rhinitis</b>                     |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | <b>&lt;0,001</b> |
|                                                 | 188          | 33,2 | 83     | 16,1 |                  |
| <b>Diagnose allerg. Rhinitis</b>                |              |      |        |      |                  |
| n=1080                                          | 565          |      | 515    |      | <b>&lt;0,001</b> |
| fehlend: 2                                      | 120          | 21,2 | 30     | 5,8  |                  |
| <b>Neurodermitis</b>                            |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | 0,839            |
|                                                 | 48           | 8,5  | 42     | 8,1  |                  |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>                   |              |      |        |      |                  |
| n=1080                                          | 565          |      | 515    |      | 0,187            |
| fehlend: 2                                      | 32           | 5,7  | 33     | 6,4  |                  |
| <b>Leben auf Bauernhof mit Viehhaltung</b>      |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | <b>&lt;0,001</b> |
|                                                 | 5            | 0,9  | 494    | 95,7 |                  |
| <b>Vater aktiv an Bewirtschaftung beteiligt</b> |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | <b>&lt;0,001</b> |
|                                                 | 1            | 0,2  | 473    | 91,7 |                  |
| <b>Rauchen</b>                                  |              |      |        |      |                  |
| n=1079                                          | 564          |      | 515    |      | 0,569            |
| fehlend: 3                                      | 167          | 29,6 | 118    | 22,9 |                  |
| <b>Schulabschluss</b>                           |              |      |        |      |                  |
| n=1082                                          | 566          |      | 516    |      | <b>&lt;0,001</b> |
| kein                                            | 30           | 5,3  | 15     | 2,9  |                  |
| Hauptschule                                     | 113          | 20,0 | 169    | 32,8 |                  |
| Realschule                                      | 211          | 37,3 | 215    | 41,7 |                  |
| Abitur/Hochschule                               | 209          | 36,9 | 108    | 20,9 |                  |
| Sonstige                                        | 3            | 0,5  | 9      | 1,7  |                  |

\*Chi<sup>2</sup>-Test bei nominal- bzw. ordinalskalierten Daten, Mann-Whitney-U-Test bei metrischen Daten

Tabelle 5 Charakterisierung der Studienpopulation: Kind

|                                                     | Nicht-Bauern |      | Bauern |      | p-Wert* |
|-----------------------------------------------------|--------------|------|--------|------|---------|
|                                                     | n/N          | %    | n/N    | %    |         |
| <b>Geschlecht</b>                                   |              |      |        |      |         |
| n=1090                                              | 572          |      | 518    |      | 0,988   |
| Junge                                               | 294          | 51,4 | 266    | 51,4 |         |
| Mädchen                                             | 278          | 48,6 | 252    | 48,7 |         |
| <b>Anzahl der Geschwister</b>                       |              |      |        |      |         |
| n=1133                                              | 603          |      | 530    |      | <0,001  |
| keine                                               | 279          | 46,3 | 134    | 25,3 |         |
| 1                                                   | 200          | 33,2 | 141    | 26,6 |         |
| 2                                                   | 97           | 16,1 | 166    | 31,3 |         |
| 3 und mehr                                          | 27           | 4,5  | 89     | 16,8 |         |
| <b>Entbindung</b>                                   |              |      |        |      |         |
| n=1090                                              | 572          |      | 518    |      | 0,029   |
| stationär                                           | 551          | 96,3 | 510    | 98,5 |         |
| ambulant                                            | 21           | 3,7  | 8      | 1,5  |         |
| <b>Geburtsmodus</b>                                 |              |      |        |      |         |
| n=1082                                              |              |      |        |      |         |
| fehlend: 8                                          | 568          |      | 514    |      | 0,087   |
| spontan                                             | 428          | 74,8 | 409    | 79,0 |         |
| vaginale Operation                                  | 35           | 6,1  | 18     | 3,5  |         |
| Sectio                                              | 105          | 18,4 | 87     | 16,8 |         |
| <b>Wurde jemals gestillt?</b>                       |              |      |        |      |         |
| n=1090                                              | 572          |      | 518    |      | 0,415   |
| ja                                                  | 531          | 92,8 | 474    | 91,5 |         |
| nein                                                | 41           | 7,2  | 44     | 8,5  |         |
| <b>Wird zur Zeit gestillt? (Alter ca. 2 Monate)</b> |              |      |        |      |         |
| n=1089                                              | 571          |      | 518    |      | 0,082   |
| fehlend: 1                                          |              |      |        |      |         |
| ausschließlich                                      | 353          | 61,8 | 305    | 58,9 |         |
| nicht ausschließlich                                | 69           | 12,1 | 87     | 16,8 |         |
| nein                                                | 108          | 18,9 | 82     | 15,8 |         |

\*Chi<sup>2</sup>-Test bei nominal- bzw. ordinalskalierten Daten, Mann-Whitney-U-Test bei metrischen Daten

### 5.3 Korrelation der Haushaltshaltsgene

Zunächst sollte bestimmt werden, wie stark der Zusammenhang zwischen der Expression der drei *Housekeeping* Gene 18S rRNA, Beta-2-Microglobulin und Beta-Glucuronidase ist. Da die gemessenen Ct-Werte nicht normalverteilt waren, wurde die Rangkorrelation nach Spearman angewandt. Bei dieser Methode werden den einzelnen Werten Rangplätze zugeordnet. Die Korrelationskoeffizienten (siehe Tabelle 6) bewegen sich im Bereich von 0,799 bis 0,903, somit besteht eine relativ hohe Korrelation der Expression der drei *Housekeeping* Gene.

**Tabelle 6** Rangkorrelationskoeffizienten der *Housekeeping* Gene nach Spearman

|                      |                         | 18S rRNA | Beta-2-Microglobulin | Beta-Glucuronidase |
|----------------------|-------------------------|----------|----------------------|--------------------|
| 18S rRNA             | Korrelationskoeffizient | 1,000    | 0,856                | 0,799              |
|                      | Sign. (zweiseitig)      | -        | <0,001               | <0,001             |
| Beta-2-Microglobulin | Korrelationskoeffizient |          | 1,000                | 0,903              |
|                      | Sign. (zweiseitig)      |          | -                    | <0,001             |

Anzahl der analysierten Proben n=938

Alle folgenden Berechnungen wurden zunächst mit den drei *Housekeeping* Genen 18S, Beta-2-Microglobulin, Beta-Glucuronidase sowie mit deren geometrischem Mittelwert durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sind aus Gründen der Übersichtlichkeit die Ct-Werte auf 18S rRNA bezogen, da dieses *Housekeeping* Gen sehr häufig verwendet wird und stabile Expressionsraten zeigt (Thellin et al., 1999; Bas et al., 2004).

### 5.4 Berechnungen mit den nicht-adjustierten Genexpressionsdaten

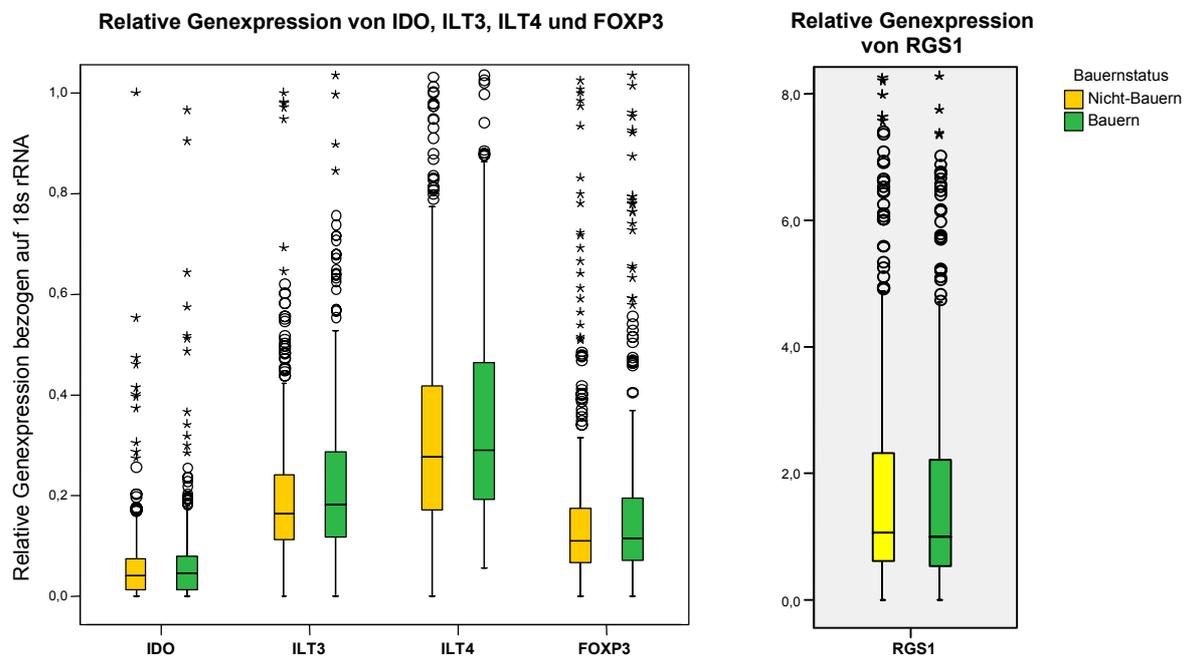
#### 5.4.1 Explorative Datenanalyse

Zunächst wurde, wie im Methodenteil in 4.11 beschrieben, aus den gemessenen Ct-Werten der delta delta Ct-Wert berechnet. Die anschließende explorative Datenanalyse wurde für die Gesamtpopulation und für jedes Land stratifiziert nach Bauern- und Nicht-Bauernkindern durchgeführt. Der Normalverteilungstest nach Kolmogorov-Smirnov ergab, dass die Daten nicht-normalverteilt sind. Auch eine Logarithmierung der Daten führte nicht zu einer Normalverteilung. Daher wurden zur Deskription der Daten der Median mit erstem und vierten Quartil herangezogen und nicht-parametrische Tests angewandt.

Abbildung 14 zeigt die relative Expression der untersuchten Gene in der Gesamtpopulation, getrennt nach Bauern- und Nicht-Bauernkindern. RGS1 ist höher exprimiert als die vier anderen Gene und deshalb auf der rechten Seite separat dargestellt. Zunächst erkennt man,

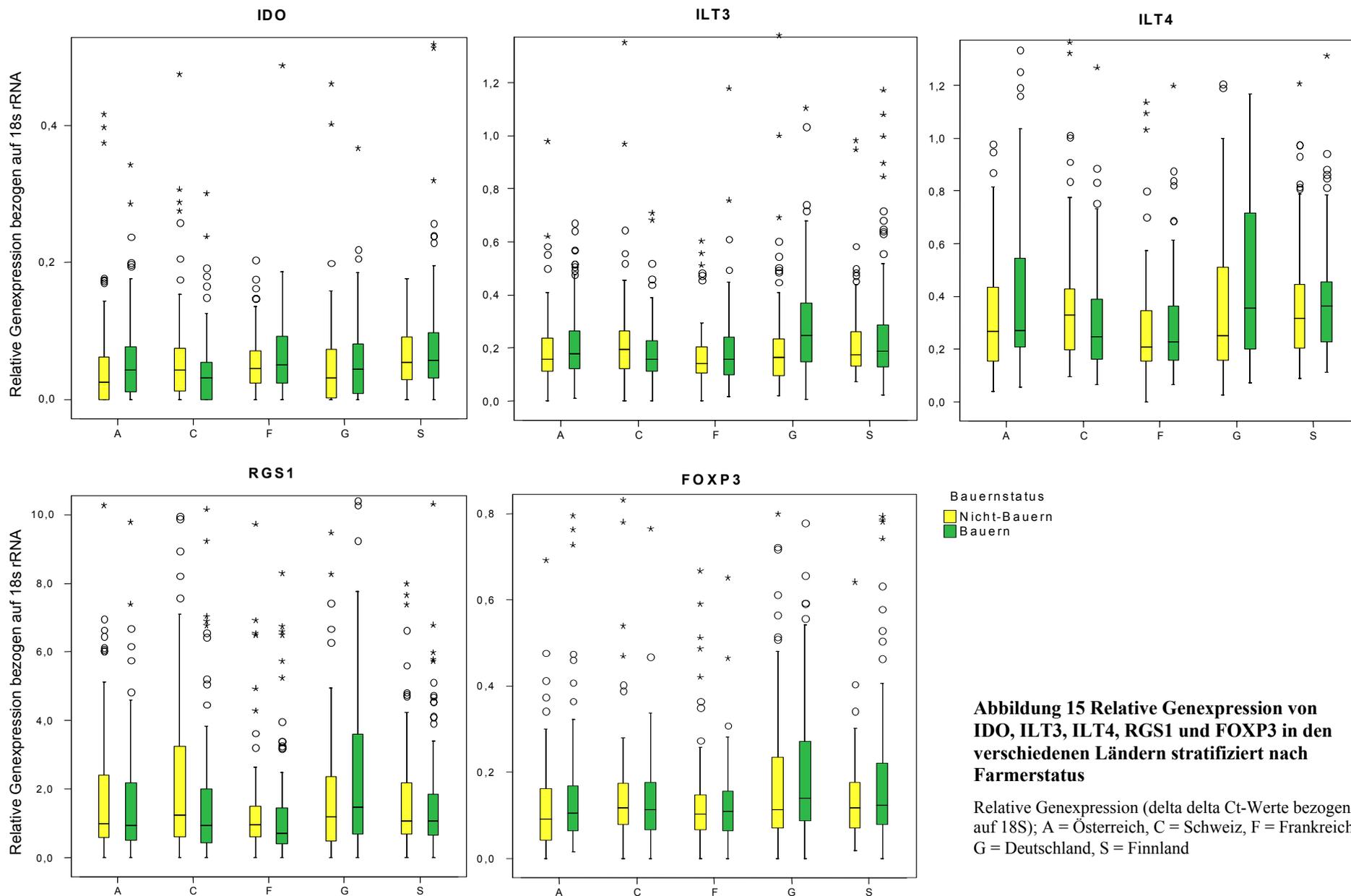
dass die Fehlerbalken, die den größten und kleinsten Wert (sofern keine Ausreißer) darstellen, relativ groß sind. Nach unten hin wird der Fehlerbalken durch die Null begrenzt, da es keine negativen Werte gibt. Aus Abbildung 14 geht ebenfalls hervor, dass für IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3 der Median in der Gesamtpopulation bei den Bauernkindern höher als bei den Nicht-Bauernkindern ist. RGS1 dagegen ist bei den Bauern niedriger exprimiert.

Die Boxplots in Abbildung 15 veranschaulichen die Expression der Gene in den einzelnen Ländern. In Österreich, Frankreich, Deutschland und Finnland ist der Median bei den Bauern für IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3 höher. Die Schweiz stellt eine Ausnahme dar, denn hier sind die vier genannten Gene bei den Bauern niedriger exprimiert als bei den Nicht-Bauern. Für RGS1 ist der Median bei den Bauern in allen Ländern außer in Deutschland und in Finnland niedriger als bei den Nicht-Bauern.



**Abbildung 14 Relative Genexpression von IDO, ILT3, ILT4, FOXP3 und RGS1 in der Gesamtpopulation der Kinder stratifiziert nach dem Bauernstatus**

Der Querbalken, der die Box (farbiger Bereich) teilt, stellt den Median dar. Insgesamt 50% der Fälle liegen in der Box: der obere Rand der Box entspricht dem 75. Perzentil, der untere Rand dem 25. Perzentil. Die kleinen Kreise zeigen Ausreißer an, d.h. Werte, die mehr als 1,5 Box-Längen vom 75. Perzentil entfernt liegen. Extremwerte werden als Sternchen dargestellt. Diese liegen mehr als drei Box-Längen vom 75. bzw. 25. Perzentil entfernt. Die Fehlerbalken zeigen die höchsten bzw. niedrigsten Werte, die keine Ausreißer sind.



**Abbildung 15 Relative Genexpression von IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 in den verschiedenen Ländern stratifiziert nach Farmerstatus**

Relative Genexpression (delta delta Ct-Werte bezogen auf 18S); A = Österreich, C = Schweiz, F = Frankreich, G = Deutschland, S = Finnland

#### 5.4.2 Analyse der nicht-adjustierten, stetigen Genexpressionsdaten

Im Anschluss an die explorative Datenanalyse wurden mittels Mann-Whitney-*U* potentielle Unterschiede in der Genexpression zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern getestet. Tabelle 7 zeigt, dass in der Gesamtpopulation bei ILT3 und ILT4 ein signifikanter Unterschied besteht. Auf der Ebene der einzelnen Länder ergeben sich weitere Unterschiede: So waren IDO, ILT3, ILT4 und RGS1 bei den Schweizer Bauernkinder signifikant niedriger exprimiert als bei den Nicht-Bauernkindern. Im Gegensatz dazu waren die drei Gene IDO, ILT3, ILT4 in allen anderen Ländern bei den Bauernkindern höher exprimiert. Aus diesem Grund wurden alle Länder nochmal gesondert unter Ausschluss der Schweiz untersucht. Interessanterweise ergaben sich nun für IDO und FOXP signifikante und für ILT3 und ILT4 hochsignifikante Unterschiede zwischen den Bauernkindern und den Kontrollen.

Zusätzlich zu den Medianen wurden auch die Rangsummen, die der Mann-Whitney-*U* Test berechnet, verglichen. Die Rangsummen verhielten sich wie die Mediane (nicht gezeigt).

Beim Mann-Whitney-*U* Test sollten „Ausreißer“ das Ergebnis nicht beeinflussen, da jedem Wert lediglich ein bestimmter Rang zugeteilt wird. Trotzdem wurde überprüft, ob sich die Ergebnisse verändern, wenn Proben mit delta delta Ct-Werten größer als 100 aus der Analyse ausgeschlossen werden und es zeigte sich, dass signifikante Unterschiede erhalten blieben (nicht gezeigt).

**Tabelle 7 Nicht-adjustierte, stetige Genexpressionsdaten von IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 in der Gesamtpopulation der Kinder und in den einzelnen Ländern**

|                           |           | <b>IDO</b>   | <b>ILT3</b>  | <b>ILT4</b>  | <b>RGS1</b>  | <b>FOXP3</b> |
|---------------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>alle Länder</b>        |           |              |              |              |              |              |
| NB=492/B=446              | p-Wert    | 0,241        | <b>0,037</b> | <b>0,050</b> | 0,198        | 0,055        |
|                           | Median NB | 0,041        | 0,166        | 0,277        | 1,070        | 0,112        |
|                           | Median B  | 0,046        | 0,182        | 0,291        | 1,001        | 0,117        |
| <b>alle Länder ohne C</b> |           |              |              |              |              |              |
| NB=383/B=352              | p-Wert    | <b>0,019</b> | <b>0,001</b> | <b>0,001</b> | 0,826        | <b>0,010</b> |
|                           | Median NB | 0,041        | 0,160        | 0,265        | 1,038        | 0,107        |
|                           | Median B  | 0,050        | 0,187        | 0,306        | 1,002        | 0,120        |
| <b>A</b>                  |           |              |              |              |              |              |
| NB=90/B=85                | p-Wert    | 0,096        | 0,246        | 0,124        | 0,539        | 0,061        |
|                           | Median NB | 0,025        | 0,160        | 0,268        | 1,003        | 0,091        |
|                           | Median B  | 0,043        | 0,180        | 0,272        | 0,949        | 0,106        |
| <b>C</b>                  |           |              |              |              |              |              |
| NB=109/B=94               | p-Wert    | <b>0,046</b> | <b>0,046</b> | <b>0,018</b> | <b>0,023</b> | 0,403        |
|                           | Median NB | 0,044        | 0,196        | 0,330        | 1,249        | 0,118        |
|                           | Median B  | 0,032        | 0,158        | 0,248        | 0,934        | 0,113        |
| <b>F</b>                  |           |              |              |              |              |              |
| NB=99/B=80                | p-Wert    | 0,298        | 0,230        | 0,413        | <b>0,046</b> | 0,728        |
|                           | Median NB | 0,046        | 0,141        | 0,209        | 0,966        | 0,103        |
|                           | Median B  | 0,051        | 0,160        | 0,229        | 0,717        | 0,111        |
| <b>G</b>                  |           |              |              |              |              |              |
| NB=106/B=86               | p-Wert    | 0,339        | <b>0,001</b> | <b>0,009</b> | 0,068        | 0,149        |
|                           | Median NB | 0,032        | 0,166        | 0,250        | 1,201        | 0,114        |
|                           | Median B  | 0,045        | 0,249        | 0,355        | 1,469        | 0,141        |
| <b>S</b>                  |           |              |              |              |              |              |
| NB=88/B=101               | p-Wert    | 0,432        | 0,601        | 0,333        | 0,810        | 0,101        |
|                           | Median NB | 0,055        | 0,176        | 0,318        | 1,077        | 0,118        |
|                           | Median B  | 0,057        | 0,190        | 0,363        | 1,078        | 0,124        |

Relative Genexpression, delta delta Ct-Werte bezogen auf 18S; Mann-Whitney-U Test

NB = Anzahl der Nicht-Bauern; B = Anzahl der Bauern; A = Österreich, C = Schweiz, F = Frankreich, G = Deutschland,

S = Finnland

### 5.4.3 Analyse der nicht-adjustierten, kategorisierten Daten

Da die vorliegenden Genexpressionsdaten keine Normalverteilung aufwiesen, waren sie nicht für lineare Regressionsanalysen geeignet. Man kann dieses Problem umgehen, indem man die Daten dichotomisiert, da Daten mit binärem Endpunkt eine logistische Regression ermöglichen. Es wurden verschiedene Arten der Dichotomisierung getestet: die Einteilung in Werte oberhalb bzw. unterhalb des Medians, in Werte des unteren (ersten) Quartils und der anderen Quartile sowie in Werte des oberen (vierten) Quartils und der anderen Quartile.

Abbildung 16 stellt den Anteil der Kinder dar, deren Genexpression für das jeweilige Gen im ersten bzw. den anderen Quartilen liegt. Dies ist getrennt nach Bauern- und Nicht-Bauernkindern für die Gesamtpopulation ohne die Schweiz sowie die einzelnen Länder dargestellt.

Im linken Teil der Abbildung erkennt man, dass bei IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3 mehr Bauernkinder als Nicht-Bauernkinder eine Genexpression im zweiten bis vierten Quartil haben. Wenn man die einzelnen Länder betrachtet, fällt bei ILT4 auf, dass der Anteil der Kinder mit einer Genexpression in den höheren Quartilen bei allen Ländern größer ist mit Ausnahme der Schweiz. Gleiches gilt für FOXP3, außer, dass die Expression von FOXP3 in Frankreich bei Bauern- und Kontrollkindern etwa gleich ist. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der explorativen Datenanalyse (Tabelle 7) überein. IDO bzw. ILT3 weichen etwas davon ab, da hier nicht nur in der Schweiz, sondern auch in Frankreich bzw. in Finnland der Anteil der Genexpression im ersten Quartil bei den Bauernkindern größer ist.

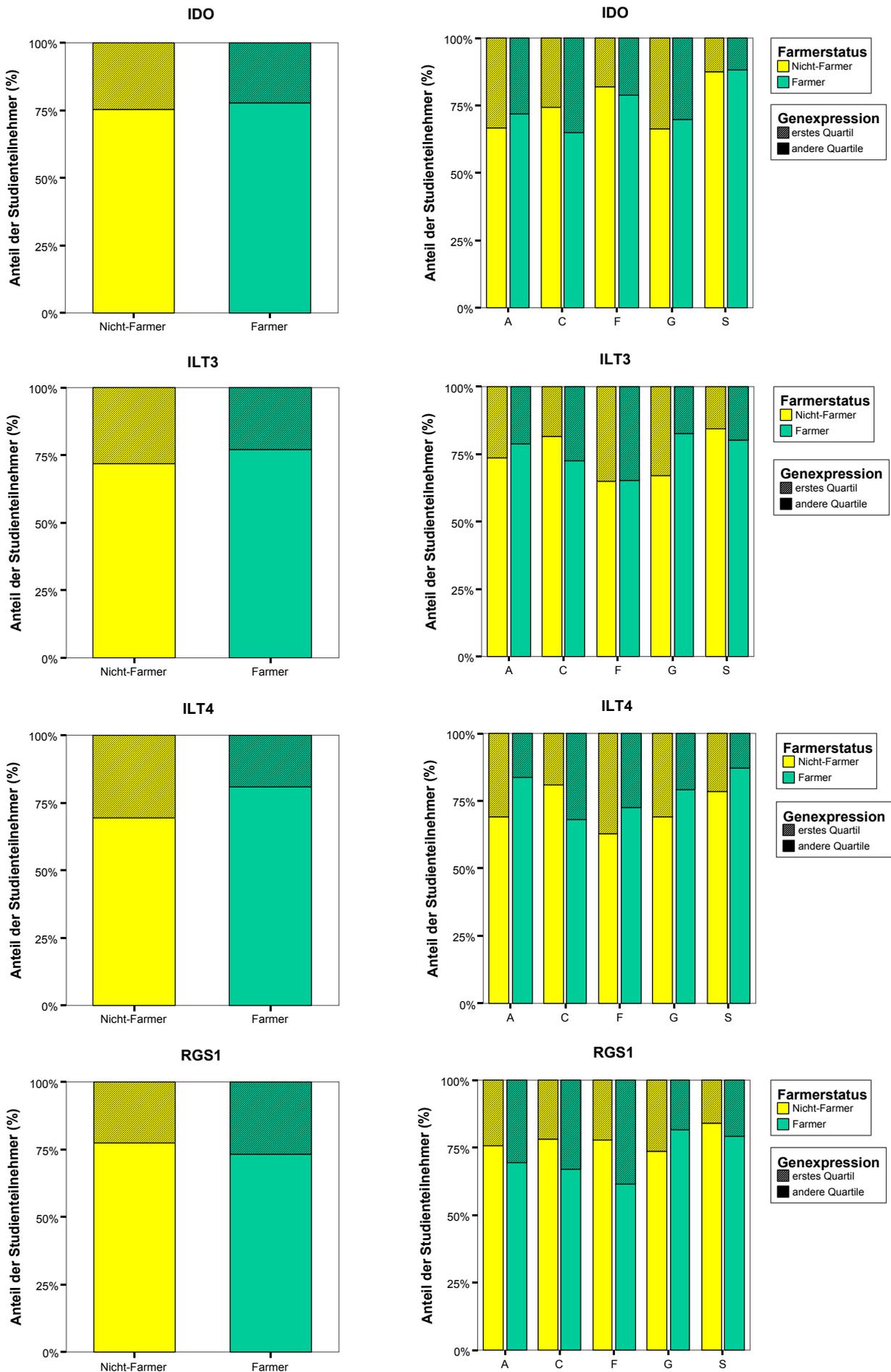
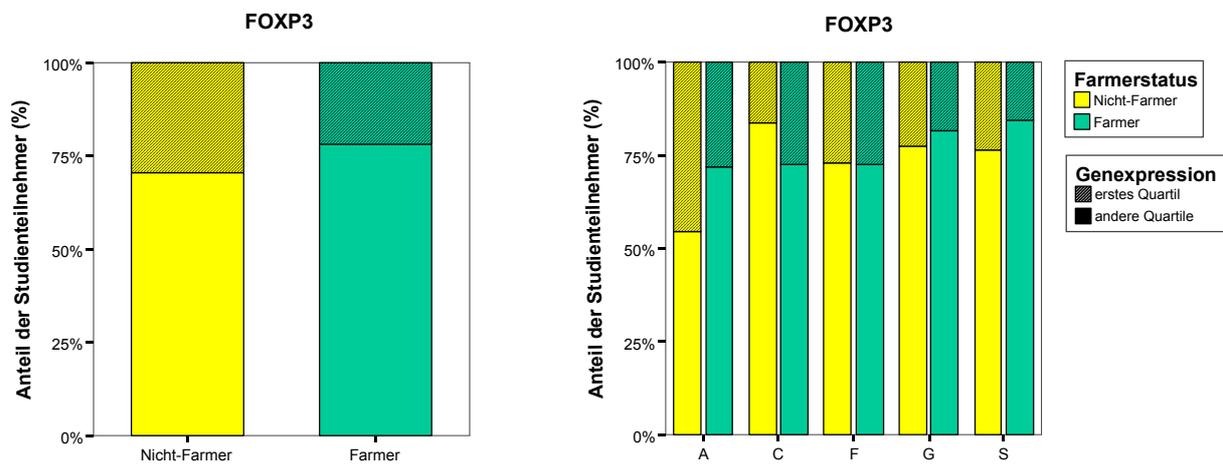


Abbildung 16 Fortsetzung auf der nächsten Seite



**Abbildung 16 Anteil der Studienteilnehmer in beiden Kategorien (relative Genexpression im ersten Quartil und den anderen Quartilen)**

Linke Seite: Gesamtpopulation ohne Schweiz, rechte Seite: nach Ländern getrennt;  
 A = Österreich, C = Schweiz, F = Frankreich, G = Deutschland, S = Finnland

Das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit  $p$ , dass ein Ereignis (hier die Genexpression im unteren oder den anderen Quartilen) eintritt, zur Wahrscheinlichkeit  $1-p$ , dass das Ereignis nicht eintritt, nennt man "Odds" (Chance). Das Odds Ratio ist das Verhältnis der Chancen zweier Gruppen, dass ein Ereignis eintritt. Das Odds Ratio wird häufig im Rahmen von epidemiologischen Studien berechnet und ist dort ein wichtiges Maß für die Assoziation zwischen Exposition und Erkrankung.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Odds Ratios mit 95%-Konfidenzintervall sowie dem jeweiligen p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests. Im Vergleich zu den stetigen Daten (Tabelle 7) fällt auf, dass einige signifikante Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern nicht erhalten bleiben, vor allem in der Schweiz und allen Ländern ohne Schweiz.

In der Gesamtpopulation ist das Odds Ratio bei ILT3, ILT4 und FOXP3 größer als Eins, d.h. das Bauernkind besitzt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Genexpression in den oberen drei Quartilen. Bei ILT3 beträgt das OR 1,40 (95%-Konfidenzintervall 1,04-1,89), der Chi<sup>2</sup>-Test ist signifikant; ebenso bei RGS1 (OR=0,74, KI 0,55-0,99, p=0,045).

Bei Betrachtung der einzelnen Länder ist das Ergebnis für ILT4 und FOXP3 in Österreich signifikant (OR=2,29, KI 1,11-4,74, p=0,023 bzw. OR=2,13, KI 1,13-3,99, p=0,018) sowie für ILT4 in der Schweiz (OR=0,51, KI 0,27-0,97, p=0,038). Die RGS1-Expression ist in Frankreich zwischen Bauern und Nicht-Bauern signifikant unterschiedlich (OR=0,452, KI 0,24-0,87, p=0,016) und die ILT3-Expression in Deutschland (OR=2,33, KI 1,17-4,65, p=0,014).

In der Gesamtpopulation ohne die Schweiz ist der Bauernstatus positiv und signifikant mit der ILT4- und FOXP3-Expression assoziiert.

**Tabelle 8 Nicht-adjustierte dichotomisierte Genexpressionsdaten von IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 in der Gesamtpopulation und nach Ländern getrennt**

|                           |               | <b>IDO</b>          | <b>ILT3</b>         | <b>ILT4</b>         | <b>RGS1</b>         | <b>FOXP3</b>         |
|---------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>alle Länder</b>        |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=492/B=446              | p-Werte       | 0,968               | 0,475               | <b>0,026</b>        | <b>0,045</b>        | 0,243                |
|                           | OR mit 95%-KI | 0,99<br>(0,74-1,34) | 1,11<br>(0,83-1,50) | 1,40<br>(1,04-1,89) | 0,74<br>(0,55-0,99) | 1,19<br>(0,89-1,61)  |
| <b>alle Länder ohne C</b> |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=383/B=352              | p-Werte       | 0,452               | 0,108               | <b>0,000</b>        | 0,181               | <b>0,023</b>         |
|                           | OR mit 95%-KI | 1,14<br>(0,81-1,60) | 1,31<br>(0,94-1,83) | 1,87<br>(1,33-2,64) | 0,80<br>(0,57-1,11) | 1,47<br>(1,05-2,05)  |
| <b>A</b>                  |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=90/B=85                | p-Werte       | 0,466               | 0,395               | <b>0,023</b>        | 0,363               | <b>0,018</b>         |
|                           | OR mit 95%-KI | 1,27<br>(0,67-2,42) | 1,35<br>(0,67-2,72) | 2,29<br>(1,11-4,74) | 0,73<br>(0,38-1,43) | 2,13<br>(1,13-3,98)  |
| <b>C</b>                  |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=109/B=94               | p-Werte       | 0,144               | 0,114               | <b>0,038</b>        | 0,080               | 0,055                |
|                           | OR mit 95%-KI | 0,64<br>(0,35-1,17) | 0,59<br>(0,30-1,14) | 0,51<br>(0,27-0,97) | 0,57<br>(0,31-1,07) | 0,52<br>(0,26-1,02)  |
| <b>F</b>                  |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=99/B=80                | p-Werte       | 0,607               | 0,961               | 0,162               | <b>0,016</b>        | 0,973                |
|                           | OR mit 95%-KI | 0,82<br>(0,39-1,73) | 1,02<br>(0,55-1,88) | 1,57<br>(0,83-2,98) | 0,45<br>(0,24-0,87) | 0,989<br>(0,51-1,91) |
| <b>G</b>                  |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=106/B=86               | p-Werte       | 0,583               | <b>0,014</b>        | 0,111               | 0,200               | 0,493                |
|                           | OR mit 95%-KI | 1,19<br>(0,64-2,19) | 2,33<br>(1,17-4,65) | 1,71<br>(0,88-3,31) | 1,57<br>(0,79-3,14) | 1,28<br>(0,63-2,60)  |
| <b>S</b>                  |               |                     |                     |                     |                     |                      |
| NB=88/B=101               | p-Werte       | 0,897               | 0,487               | 0,111               | 0,389               | 0,166                |
|                           | OR mit 95%-KI | 1,06<br>(0,44-2,54) | 0,77<br>(0,36-1,63) | 1,86<br>(0,86-4,04) | 0,72<br>(0,34-1,52) | 1,67<br>(0,81-3,44)  |

Einteilung in Werte des unteren und der anderen Quartile; Vergleich mittels Chi<sup>2</sup>-Test

NB = Anzahl Nicht-Bauern, B = Anz. Bauern; A = Österreich, C = Schweiz, F = Frankreich, G = Deutschland, S = Finnland;  
OR = Odds Ratio, 95%-KI = 95%-Konfidenzintervall

#### 5.4.4 Assoziation potentieller Störfaktoren mit der Genexpression

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die möglichen Störfaktoren mit der Zielvariablen, also der Genexpression assoziiert waren. Ein Confounder ist sowohl mit der zu untersuchenden Exposition als auch mit dem „Outcome“, der Zielvariable assoziiert. Hierzu wurde mittels Chi<sup>2</sup>-Test überprüft, ob beispielsweise zwischen Kindern, deren Mütter eine atopische Erkrankung haben, und Kindern nicht-atopischer Mütter ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Genexpression (Genexpression im unteren oder den anderen Quartilen) besteht. Es wurden verschiedene Einflussfaktoren auf ein potentielles Confounding getestet. Alle Einflussfaktoren, die signifikant mit der jeweiligen Zielvariable assoziiert waren, wurden in den multivariaten Analysen berücksichtigt. Einen Überblick über die Ergebnisse geben die Tabellen 9 und 10. Es wurden erneut alle Länder ohne Schweiz (Tabelle 9) und die Schweiz (Tabelle 10) getrennt voneinander betrachtet.

In den Ländern ohne die Schweiz zeigten sich folgende signifikante Zusammenhänge: Das weibliche Geschlecht des Kindes war positiv mit IDO, ILT4 und FOXP3 assoziiert. Eine mütterliche Diagnose für Asthma bzw. für allergische Rhinitis hatte einen negativen Einfluss auf die Expression von ILT3. Die Expression von IDO, ILT4 und FOXP3 wurde durch den Faktor „ältere Geschwister“ positiv beeinflusst, die von RGS1 negativ durch „mindestens zwei Geschwister“. Das Halten von Haustieren war positiv mit ILT4, das Halten von Katzen positiv mit ILT3 und ILT4 assoziiert. Das Alter der Mutter war signifikant mit der Expression von RGS1 assoziiert, die Schulbildung der Mutter mit der von IDO. Wenn man die Exposition auf dem Bauernhof genauer untersuchte, wurde deutlich, dass ein häufiger Kontakt zu Kühen während der Schwangerschaft einen positiven Einfluss auf die Expression von ILT4 hat, dagegen einen negativen Einfluss auf RGS1. „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“ war mit ILT3 und ILT4 positiv assoziiert.

Für die Schweiz ergab sich folgendes Bild: Die mütterliche Diagnose für Neurodermitis war signifikant und invers mit FOXP3 assoziiert. Der Einflussfaktor „ältere Geschwister“ war invers mit ILT4 assoziiert sowie „mindestens zwei Geschwister“ mit ILT3, ILT4 und RGS1. Das Halten von Haustieren allgemein hatte einen negativen Einfluss auf FOXP3 sowie Katzen auf IDO und ILT4. Außerdem war das Alter der Mutter signifikant mit der Genexpression von IDO sowie die Schulbildung der Mutter mit der Genexpression von ILT3 assoziiert. Rauchen während der Schwangerschaft war negativ mit RGS1 assoziiert.

Der Konsum von Frischmilch während der Schwangerschaft war invers mit der Expression von IDO, ILT3 und ILT4 assoziiert. Trinken von nicht abgekochter, roher Milch war lediglich

mit ILT3 invers assoziiert. Bei Ersterem wurde gefragt, ob die Frau während der Schwangerschaft Frischmilch direkt vom Bauernhof getrunken hat, bei der zweiten Frage hingegen wurde spezifiziert, ob die Milch vor dem Trinken abgekocht wurde.

Darüber hinaus besaß die Variable „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“ einen negativen Einfluss auf die Genexpression von ILT4; ebenfalls hatte der häufige Kontakt zu Kühen während der Schwangerschaft einen negativen Einfluss auf ILT4.

**Tabelle 9 Assoziation verschiedener Confounder mit der Genexpression von IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 (alle Länder ohne Schweiz)**

|                                    | <b>IDO</b>          | <b>ILT3</b>         | <b>ILT4</b>         | <b>RGS1</b>         | <b>FOXP3</b>        |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Weibliches Geschlecht</b>       |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | <b>0,038</b>        | 0,067               | <b>0,035</b>        | 0,481               | <b>0,006</b>        |
| OR mit 95%-KI                      | 1,44<br>(1,02-2,02) | 1,37<br>(0,98-1,91) | 1,44<br>(1,03-2,01) | 0,89<br>(0,63-1,24) | 1,60<br>(1,14-2,23) |
| <b>Diagnose Asthma</b>             |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,370               | <b>0,002</b>        | 0,517               | 0,817               | 0,887               |
| OR mit 95%-KI                      | 0,76<br>(0,41-1,39) | 0,43<br>(0,25-0,75) | 1,24<br>(0,64-2,41) | 1,08<br>(0,57-2,06) | 0,96<br>(0,52-1,77) |
| <b>Diagnose allerg. Rhinitis</b>   |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,575               | <b>0,018</b>        | 0,088               | 0,214               | 0,594               |
| OR mit 95%-KI                      | 1,14<br>(0,72-1,79) | 0,62<br>(0,41-0,92) | 0,70<br>(0,46-1,06) | 1,34<br>(0,84-2,12) | 0,90<br>(0,59-1,36) |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>      |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,906               | 0,116               | 0,827               | 0,237               | 0,357               |
| OR mit 95%-KI                      | 1,04<br>(0,57-1,90) | 0,65<br>(0,38-1,12) | 0,94<br>(0,53-1,68) | 1,48<br>(0,77-2,83) | 0,77<br>(0,44-1,34) |
| <b>Ältere Geschwister</b>          |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | <b>0,011</b>        | 0,325               | <b>0,028</b>        | 0,202               | <b>0,001</b>        |
| OR mit 95%-KI                      | 1,56<br>(1,11-2,21) | 1,19<br>(0,84-1,67) | 1,47<br>(1,04-2,06) | 0,79<br>(0,56-1,13) | 1,81<br>(1,29-2,53) |
| <b>Mindestens zwei Geschwister</b> |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,106               | 0,894               | 0,460               | <b>0,009</b>        | 0,063               |
| OR mit 95%-KI                      | 1,36<br>(0,94-1,97) | 1,02<br>(0,72-1,46) | 1,15<br>(0,80-1,64) | 0,63<br>(0,45-0,90) | 1,41<br>(0,98-2,02) |
| <b>Haustiere</b>                   |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,516               | 0,060               | <b>0,010</b>        | 0,995               | 0,081               |
| OR mit 95%-KI                      | 1,12<br>(0,79-1,60) | 1,38<br>(0,99-1,94) | 1,56<br>(1,11-2,19) | 1,00<br>(0,71-1,42) | 1,35<br>(0,96-1,89) |
| <b>Katzen</b>                      |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,623               | <b>0,024</b>        | <b>0,015</b>        | 0,916               | 0,596               |
| OR mit 95%-KI                      | 1,09<br>(0,77-1,54) | 1,48<br>(1,05-2,08) | 1,53<br>(1,08-2,16) | 0,98<br>(0,70-1,38) | 1,09<br>(0,78-1,53) |
| <b>Alter der Mutter*</b>           |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (3 Kategorien)             | 0,403               | 0,096               | 0,168               | <b>0,013</b>        | 0,121               |

Fortsetzung von Tabelle 9

|                                                        | <b>IDO</b>          | <b>ILT3</b>         | <b>ILT4</b>         | <b>RGS1</b>         | <b>FOXP3</b>        |
|--------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Schulabschluss der Mutter*</b>                      |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (3 Kategorien)                                 | <b>0,026</b>        | 0,695               | 0,993               | 0,701               | 0,583               |
| <b>Rauchen während der Schwangerschaft</b>             |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,823               | 0,112               | 0,170               | 0,666               | 0,858               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,93<br>(0,47-1,82) | 0,61<br>(0,33-1,13) | 0,65<br>(0,35-1,21) | 0,87<br>(0,45-1,67) | 0,94<br>(0,49-1,82) |
| <b>Jemals mehr als 5 Schachteln geraucht</b>           |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,349               | 0,168               | 0,114               | 0,467               | 0,081               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,85<br>(0,60-1,20) | 0,79<br>(0,57-1,10) | 0,76<br>(0,55-1,07) | 1,14<br>(0,81-1,60) | 0,75<br>(0,53-1,04) |
| <b>Exposition auf dem Bauernhof:</b>                   |                     |                     |                     |                     |                     |
| <b>Frischmilch während der Schwangerschaft</b>         |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,582               | 0,470               | 0,163               | 0,136               | 0,122               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,91<br>(0,64-1,28) | 1,13<br>(0,81-1,59) | 1,28<br>(0,91-1,80) | 0,77<br>(0,55-1,09) | 1,31<br>(0,93-1,83) |
| <b>Rohe Milch</b>                                      |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,792               | 0,326               | 0,074               | 0,317               | 0,359               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,95<br>(0,66-1,37) | 1,20<br>(0,84-1,72) | 1,40<br>(0,97-2,02) | 0,84<br>(0,59-1,19) | 1,18<br>(0,83-1,69) |
| <b>Abgekochte Milch</b>                                |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,620               | 0,716               | 0,614               | 0,228               | 0,398               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,87<br>(0,49-1,53) | 0,90<br>(0,52-1,57) | 0,87<br>(0,50-1,51) | 0,72<br>(0,42-1,23) | 1,29<br>(0,71-2,35) |
| <b>Mutter arbeitet auf dem Bauernhof</b>               |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,592               | <b>0,045</b>        | <b>0,000</b>        | 0,221               | 0,284               |
| OR mit 95%-KI                                          | 1,10<br>(0,77-1,58) | 1,44<br>(1,01-2,05) | 1,99<br>(1,37-2,90) | 0,87<br>(0,57-1,14) | 1,21<br>(0,85-1,71) |
| <b>Zeit im Stall (Std. pro Monat)</b>                  |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (stetig)                                       | 0,707               | 0,393               | <b>0,001</b>        | 0,057               | 0,113               |
| p-Werte (3 Kategorien)*                                | 0,700               | 0,511               | <b>0,006</b>        | 0,141               | 0,097               |
| <b>Zeit in der Scheune (Std. pro Monat)</b>            |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (stetig)                                       | 0,978               | 0,743               | 0,057               | 0,074               | 0,188               |
| p-Werte (3 Kategorien)*                                | 0,575               | 0,974               | 0,354               | 0,091               | 0,529               |
| <b>Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft</b> |                     |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,660               | 0,995               | <b>0,038</b>        | <b>0,043</b>        | 0,454               |
| OR mit 95%-KI                                          | 1,08<br>(0,77-1,52) | 1,00<br>(0,72-1,40) | 1,43<br>(1,02-2,02) | 0,71<br>(0,50-0,99) | 1,14<br>(0,81-1,59) |

n=735 (Länder ohne Schweiz); kategorisierte Genexpressionsdaten (unteres Quartil und andere Quartile), Vergleich mittels  $\chi^2$ -Test (bzw. Mann Whitney  $U$  bei stetigen Daten), Angabe der Odds Ratios mit 95%-Konfidenzintervall;

\* Schulabschluss, Alter und Zeit in Stall/Scheune wurden in mehr als zwei Kategorien eingeteilt. Da das Odds Ratio ein Zusammenhangsmaß für 2x2-Tabellen ist, wird in SPSS kein Wert angegeben. Es wird lediglich der p-Wert des  $\chi^2$ -Tests aufgeführt.

**Tabelle 10 Assoziation verschiedener Confounder mit der Genexpression von IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 (nur Schweiz)**

|                                    | <b>IDO</b>          | <b>ILT3</b>          | <b>ILT4</b>         | <b>RGS1</b>         | <b>FOXP3</b>        |
|------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Weibliches Geschlecht</b>       |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,557               | 0,536                | 0,935               | 0,461               | 0,254               |
| OR mit 95%-KI                      | 0,83<br>(0,46-1,53) | 1,23<br>(0,63-2,40)  | 1,03<br>(0,54-1,95) | 0,79<br>(0,43-1,47) | 1,48<br>(0,75-2,92) |
| <b>Diagnose Asthma</b>             |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,622               | 0,262                | 0,458               | 0,730               | 0,300               |
| OR mit 95%-KI                      | 0,77<br>(0,27-2,19) | 2,32<br>(0,51-10,56) | 1,62<br>(0,45-5,89) | 1,23<br>(0,38-3,94) | 2,19<br>(0,48-9,95) |
| <b>Diagnose allerg. Rhinitis</b>   |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,235               | 0,218                | 0,290               | 0,197               | 0,266               |
| OR mit 95%-KI                      | 1,77<br>(0,68-4,60) | 2,00<br>(0,66-6,04)  | 1,73<br>(0,62-4,79) | 1,94<br>(0,70-5,36) | 1,87<br>(0,61-5,68) |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>      |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,477               | 0,179                | 0,266               | 0,095               | <b>0,026</b>        |
| OR mit 95%-KI                      | 1,76<br>(0,36-8,55) | 0,42<br>(0,11-1,55)  | 0,48<br>(0,13-1,79) | 0,35<br>(0,10-1,26) | 0,25<br>(0,07-0,92) |
| <b>Ältere Geschwister</b>          |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,382               | 0,066                | <b>0,008</b>        | 0,193               | 0,367               |
| OR mit 95%-KI                      | 0,74<br>(0,38-1,45) | 0,48<br>(0,22-1,06)  | 0,34<br>(0,15-0,77) | 0,63<br>(0,31-1,27) | 0,71<br>(0,33-1,51) |
| <b>Mindestens zwei Geschwister</b> |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,125               | <b>0,009</b>         | <b>0,011</b>        | <b>0,020</b>        | 0,062               |
| OR mit 95%-KI                      | 0,62<br>(0,34-1,14) | 0,42<br>(0,21-0,81)  | 0,44<br>(0,23-0,83) | 0,48<br>(0,25-0,90) | 0,53<br>(0,27-1,04) |
| <b>Haustiere</b>                   |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | 0,115               | 0,113                | 0,143               | 0,558               | <b>0,015</b>        |
| OR mit 95%-KI                      | 0,59<br>(0,31-1,14) | 0,56<br>(0,27-1,16)  | 0,60<br>(0,30-1,20) | 0,82<br>(0,43-1,58) | 0,38<br>(0,17-0,85) |
| <b>Katzen</b>                      |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte                            | <b>0,013</b>        | 0,317                | <b>0,039</b>        | 0,686               | 0,170               |
| OR mit 95%-KI                      | 0,46<br>(0,25-0,85) | 0,71<br>(0,37-1,39)  | 0,50<br>(0,26-0,97) | 0,88<br>(0,47-1,64) | 0,62<br>(0,31-1,23) |
| <b>Alter der Mutter*</b>           |                     |                      |                     |                     |                     |
| p-Werte (3 Kategorien)             | <b>0,041</b>        | 0,558                | 0,392               | 0,859               | 0,110               |

Fortsetzung von Tabelle 10

|                                                        | <b>IDO</b>           | <b>ILT3</b>         | <b>ILT4</b>         | <b>RGS1</b>         | <b>FOXP3</b>        |
|--------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Schulabschluss der Mutter*</b>                      |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (3 Kategorien)                                 | 0,384                | <b>0,012</b>        | 0,137               | 0,988               | 0,484               |
| <b>Rauchen während der Schwangerschaft</b>             |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,156                | 0,570               | 0,702               | <b>0,048</b>        | 0,512               |
| OR mit 95%-KI                                          | 4,06<br>(0,50-32,77) | 0,67<br>(0,17-2,70) | 1,36<br>(0,28-6,63) | 0,72<br>(0,65-0,78) | 0,63<br>(0,16-2,54) |
| <b>Jemals mehr als 5 Schachteln geraucht</b>           |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,730                | 0,760               | 0,267               | 0,892               | 0,582               |
| OR mit 95%-KI                                          | 1,14<br>(0,54-2,41)  | 1,14<br>(0,50-2,58) | 1,61<br>(0,69-3,74) | 0,95<br>(0,45-2,02) | 1,27<br>(0,54-2,99) |
| <b>Exposition auf dem Bauernhof:</b>                   |                      |                     |                     |                     |                     |
| <b>Frischmilch während der Schwangerschaft</b>         |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | <b>0,026</b>         | <b>0,034</b>        | <b>0,032</b>        | 0,083               | 0,249               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,50<br>(0,27-0,93)  | 0,48<br>(0,24-0,95) | 0,49<br>(0,25-0,95) | 0,57<br>(0,30-1,08) | 0,67<br>(0,34-1,33) |
| <b>Rohe Milch</b>                                      |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,907                | <b>0,007</b>        | 0,325               | 0,622               | 0,055               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,96<br>(0,52-1,80)  | 0,40<br>(0,21-0,79) | 0,72<br>(0,38-1,38) | 0,85<br>(0,45-1,62) | 0,52<br>(0,26-1,02) |
| <b>Abgekochte Milch</b>                                |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | <b>0,032</b>         | 0,706               | 0,114               | 0,698               | 0,471               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,43<br>(0,19-0,94)  | 1,20<br>(0,46-3,15) | 0,52<br>(0,23-1,18) | 0,85<br>(0,36-1,98) | 1,46<br>(0,52-4,05) |
| <b>Mutter arbeitet auf dem Bauernhof</b>               |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,253                | 0,053               | <b>0,028</b>        | 0,103               | 0,395               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,70<br>(0,38-1,29)  | 0,52<br>(0,27-1,02) | 0,49<br>(0,26-0,93) | 0,60<br>(0,32-1,11) | 0,75<br>(0,38-1,47) |
| <b>Zeit im Stall (Std. pro Monat)</b>                  |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (stetig)                                       | <b>0,046</b>         | <b>0,027</b>        | 0,073               | 0,075               | 0,278               |
| p-Werte (3 Kategorien)                                 | <b>0,013</b>         | 0,070               | 0,080               | 0,078               | 0,720               |
| <b>Zeit in der Scheune (Std. pro Monat)</b>            |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte (stetig)                                       | 0,067                | 0,081               | 0,059               | <b>0,019</b>        | 0,255               |
| p-Werte (3 Kategorien)*                                | 0,209                | 0,196               | 0,058               | <b>0,042</b>        | 0,217               |
| <b>Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft</b> |                      |                     |                     |                     |                     |
| p-Werte                                                | 0,173                | 0,158               | <b>0,014</b>        | 0,079               | 0,148               |
| OR mit 95%-KI                                          | 0,66<br>(0,36-1,21)  | 0,62<br>(0,32-1,21) | 0,44<br>(0,23-0,85) | 0,57<br>(0,30-1,07) | 0,61<br>(0,31-1,20) |

N=203 (nur Schweiz); kategorisierte Genexpressionsdaten (unteres Quartil und andere Quartile); Vergleich mittels  $\chi^2$ -Test (bzw. Mann Whitney  $U$  bei stetigen Daten), Angabe der Odds Ratios mit 95%-Konfidenzintervall

\* Schulabschluss, Alter und Zeit in Stall/Scheune wurden in mehr als zwei Kategorien eingeteilt. Da das Odds Ratio ein Zusammenhangsmaß für 2x2-Tabellen ist, wird in SPSS kein Wert angegeben. Es wird lediglich der p-Wert des  $\chi^2$ -Tests aufgeführt.

## 5.5 Ergebnisse der multivariaten Analysen

### 5.5.1 Logistische Regressionsanalysen

Da bei bivariaten Analysen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die gefundenen Zusammenhänge abhängig sind von anderen Faktoren (Confounding), wurde im letzten Schritt multivariat analysiert. Hierzu wurde das Verfahren der logistischen Regression angewandt. Die Regressionsanalysen wurden nur für die Gene gerechnet, bei denen in den bivariaten Analysen signifikante Unterschiede in den jeweiligen Ländern zu erkennen waren (siehe Tabelle 8). Es wurde für alle Confounder adjustiert, die einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hatten. Bei den Berechnungen für alle Länder (ohne Schweiz) wurde zusätzlich für Länder adjustiert, wobei Deutschland als Referenzland diente.

### Multivariate Analysen für ILT4

Bei ILT4 hatten sich zuvor in der Gesamtpopulation ohne die Schweiz das Geschlecht des Kindes, das Vorhandensein älterer Geschwister sowie Haustiere als Confounder herausgestellt. Nach Adjustierung für diese Variablen war der Farmerstatus weiterhin signifikant und positiv mit der Expression von ILT4 assoziiert. Eine fast gleich starke positive Assoziation mit der Genexpression wie der Bauernstatus besaß das Kriterium „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“. Dabei zeigte sich, dass die Methode der schrittweisen Vorwärtsselektion von Confoundern jeweils stärkere Effekte ergab.

Das Trinken von Rohmilch bzw. abgekochter Milch schien keinen Einfluss auf die Genexpression von ILT4 zu haben. Positiv mit ILT4 assoziiert war außerdem der häufige Kontakt zu verschiedenen Bauernhoftieren, d.h. Kühe, Pferde, Schweine, Schafe oder Geflügel während der Schwangerschaft. Signifikant war dieser Einfluss jedoch nur bei der Methode der Vorwärtsselektion. Eine weniger starke Assoziation als der Kontakt zu Bauernhoftieren hatte der alleinige Kontakt zu Kühen. Außerdem war die während der Schwangerschaft im Stall verbrachte Zeit mit der ILT4-Expression assoziiert.

Bei den multivariaten Analysen der Schweizer Blutproben wurde für das Vorhandensein älterer Geschwister und Katzen adjustiert. Zunächst fiel die negative Assoziation aller Variablen mit der Genexpression auf. Der inverse Trend in der Schweiz wurde bereits bei den bivariaten Analysen beobachtet. Nach Adjustierung für die genannten Confounder hatten weder der Farmerstatus, „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“ noch der Konsum von Frischmilch während der Schwangerschaft einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von ILT4. Lediglich der häufige Kontakt zu Kühen während der Schwangerschaft war unter Verwendung der Methode „Vorwärtsselektion“ signifikant und invers mit ILT4 assoziiert.

Da bei den bivariaten Analysen auch in Österreich der Farmerstatus signifikant mit der ILT4-Expression assoziiert war, wurden auch für die österreichischen Kinder Regressionsmodelle gerechnet. Da sich hier nach Adjustierung für die entsprechenden Confounder keine signifikanten Assoziationen mit der Exposition auf dem Bauernhof ergaben, wird auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Tabelle 11 fasst die Beobachtungen für ILT4 für die Länder ohne die Schweiz und die Schweiz zusammen.

Wie oben beschrieben haben in den Ländern ohne die Schweiz der Kontakt der Schwangeren zu Bauernhoftieren sowie die im Stall verbrachte Zeit einen starken Einfluss auf die Expression von ILT4 im Nabelschnurblut. Es hatte sich auch herausgestellt, dass der Kontakt zu verschiedenen Tieren mehr Einfluss auf die ILT4-Expression hatte als der Kontakt nur zu Kühen. Daher wurde für ILT4 zusätzlich untersucht, wie sich das Odds Ratio bei jeder zusätzlichen Tierspezies verändert, zu der die Mutter während der Schwangerschaft Kontakt hatte. Hierfür wurde eine Summenvariable aus dem Kontakt zu drei verschiedenen Tierarten (Kühe, Pferde und Schafe) gebildet (siehe Tabelle 12). Für jede zusätzliche Tierspezies ergab sich ein signifikantes Odds Ratio von 1,34 (95%-KI 1,04-1,71). Nach Adjustierung für die entsprechenden Confounder veränderte sich das Odds Ratio nur geringfügig. Ein ähnliches Ergebnis erhielt man, wenn man eine Summenvariable aus vier verschiedenen Bauernhoftieren (Kühe, Pferde, Schafe und Schweine) bildete.

**Tabelle 11 Adjustierte Odds Ratios der Genexpressionsdaten von ILT4****ILT4: alle Länder ohne Schweiz** (n=733, 2 fehlende Fälle)

|                                                            | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|------------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                                               |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,62        | 1,11-2,34     | <b>0,011</b>  |
| Methode Vorwärtsselektion:                                 | 1,81        | 1,28-2,57     | <b>0,001</b>  |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                          |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,64        | 1,09-2,47     | <b>0,019</b>  |
| Methode Vorwärtsselektion:                                 | 1,86        | 1,27-2,73     | <b>0,002</b>  |
| Trinken von Rohmilch w. d. Schwangerschaft                 |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,08        | 0,72-1,61     | 0,718         |
| Trinken von abgekochter Milch w. d. Schwangerschaft        |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,10        | 0,61-1,97     | 0,758         |
| Häufiger Kontakt zu Bauernhoftieren w. d. Schwangerschaft  |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,34        | 0,94-1,93     | 0,110         |
| Methode Vorwärtsselektion:                                 | 1,52        | 1,08-2,14     | <b>0,018</b>  |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft            |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,26        | 0,88-1,81     | 0,210         |
| Zeit im Stall w. d. Schwangerschaft<br>(Stunden pro Monat) |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,00        | 1,00-1,01     | 0,062         |
| Methode Vorwärtsselektion:                                 | 1,01        | 1,00-1,01     | <b>0,009</b>  |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister, Haustiere

**ILT4: nur Schweiz** (n=203)

|                                                 | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|-------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                                    |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                             | 0,74        | 0,34-1,62     | 0,447         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof               |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                             | 0,69        | 0,32-1,49     | 0,349         |
| Trinken von Frischmilch w. d. Schwangerschaft   |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                             | 0,74        | 0,34-1,60     | 0,445         |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                             | 0,59        | 0,29-1,20     | 0,141         |
| Methode Vorwärtsselektion:                      | 0,50        | 0,25-0,99     | <b>0,045</b>  |

\* adjustiert für ältere Geschwister, Katzen

aOR = adjustiertes Odds Ratio, 95% KI = 95% Konfidenzintervall; häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft = Kontakt zu Kühen mehrmals pro Monat oder häufiger während der Schwangerschaft (1., 2. und 3. Trimenon); Häufiger Kontakt zu Bauernhoftieren w. d. Schwangerschaft = Kontakt mehrmals pro Monat oder häufiger während der Schwangerschaft (1., 2. und 3. Trimenon) zu Tieren auf dem Bauernhof (Kühe, Pferde, Schweine, Schafe oder Geflügel).

**Tabelle 12 Analyse des Kontakts zu verschiedenen Bauernhoftieren als Summenvariable („sum-score“ variable)****ILT4: Länder ohne Schweiz**

Summenvariable, die drei verschiedene Tierspezies (Kühe, Pferde, Schafe) einschließt:

| <b>Nicht adjustiert:</b>                                 | <b>OR pro Tierspezies</b>   | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|
| Kontakt zu Bauernhoftieren<br>(n=699, 36 fehlende Fälle) | 1,34                        | 1,04-1,71     | <b>0,021</b>  |
| <b>Adjustiert (Methode Vorwärtsselektion):</b>           | <b>aOR* pro Tierspezies</b> |               |               |
| Kontakt zu Bauernhoftieren<br>(n=696, 39 fehlende Fälle) | 1,36                        | 1,06-1,74     | <b>0,016</b>  |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister, Haustiere

Summenvariable, die vier verschiedene Tierspezies (Kühe, Pferde, Schweine, Schafe) einschließt:

| <b>Nicht adjustiert:</b>                                 | <b>OR pro Tierspezies</b>   | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|
| Kontakt zu Bauernhoftieren<br>(n=702, 33 fehlende Fälle) | 1,28                        | 1,03-1,61     | <b>0,030</b>  |
| <b>Adjustiert (Methode Vorwärtsselektion):</b>           | <b>aOR* pro Tierspezies</b> |               |               |
| Kontakt zu Bauernhoftieren<br>(n=699, 36 fehlende Fälle) | 1,30                        | 1,04-1,64     | <b>0,023</b>  |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister, Haustiere

### Multivariate Analysen für FOXP3

Wie in Tabelle 8 dargestellt ergab sich bei den bivariaten Analysen für die Länder ohne Schweiz sowie für die Schweiz allein ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Farmerstatus und der Genexpression von FOXP3. Sobald man jedoch für die zuvor bestimmten Confounder Geschlecht und ältere Geschwister sowie für Länder adjustierte, war der Farmerstatus nicht mehr signifikant mit der Genexpression von FOXP3 assoziiert (aOR=1,36, KI 0,96-1,92, p=0,088; siehe Tabelle 13). Bei genauerer Betrachtung der Faktoren, die für die Exposition auf dem Bauernhof charakteristisch sind, wie z.B. der Konsum von Frischmilch, der häufige Kontakt zu Kühen und die im Stall verbrachte Zeit während der Schwangerschaft, so bestand auch bei diesen nach Adjustierung kein signifikanter Zusammenhang mehr mit der Genexpression von FOXP3.

Bei der Auswertung für die Schweiz war der Farmerstatus bei den bivariaten Analysen signifikant, jedoch negativ mit FOXP3 assoziiert. Nach Adjustierung für eine mütterliche Neurodermitis-Diagnose und für Haustiere war dieser Zusammenhang nicht mehr signifikant.

**Tabelle 13 Adjustierte Odds Ratios der Genexpressionsdaten von FOXP3**

**FOXP3: Länder ohne Schweiz (n=733)**

|                                                            | aOR* | 95% KI      | p-Wert |
|------------------------------------------------------------|------|-------------|--------|
| Farmerstatus                                               |      |             |        |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,36 | 0,96-1,92   | 0,088  |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                          |      |             |        |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,14 | 0,78-1,64   | 0,503  |
| Frischmilch während der Schwangersch.                      |      |             |        |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,25 | 0,87-1,79   | 0,222  |
| Häufiger Kontakt zu Kühen                                  |      |             |        |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,04 | 0,73-1,48   | 0,833  |
| Zeit im Stall w. d. Schwangerschaft<br>(Stunden pro Monat) |      |             |        |
| Einschluss-Methode:                                        | 1,00 | 0,997-1,004 | 0,761  |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister

**Fortsetzung von Tabelle 13****FOXP3: nur Schweiz (n=203)**

|                                       | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                          |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                   | 0,77        | 0,35-1,70     | 0,521         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof     |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                   | 1,26        | 0,59-2,71     | 0,553         |
| Frischmilch während der Schwangersch. |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                   | 0,89        | 0,41-1,93     | 0,770         |
| Häufiger Kontakt zu Kühen             |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                   | 0,84        | 0,40-1,74     | 0,631         |

\* adjustiert für mütterliche Diagnose für Neurodermitis, Haustiere

aOR = adjustiertes Odds Ratio, 95% KI = 95% Konfidenzintervall; häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft = Kontakt zu Kühen mehrmals pro Monat oder häufiger während der Schwangerschaft (1., 2. und 3. Trimenon).

**Multivariate Analysen für IDO, ILT3 und RGS1**

Wie man der Tabelle 8 entnehmen kann, war bei den bivariaten Analysen der Bauernstatus in einzelnen Ländern signifikant mit der Expression der übrigen Gene IDO, ILT3 und RGS1 assoziiert. So ergab sich in Deutschland ein signifikanter Zusammenhang des Farmerstatus mit der ILT3-Expression, in Frankreich mit der RGS1-Expression und in Österreich mit der FOXP3-Expression. Nach Adjustierung für die jeweiligen, zuvor ermittelten Confounder waren die Ergebnisse in den einzelnen Ländern für die genannten Gene jedoch nicht mehr signifikant (Ergebnisse nicht gezeigt).

## 5.6 Subgruppenanalysen

Subgruppenanalysen können einen Hinweis auf Gruppen geben, bei denen die Exposition möglicherweise besonders stark mit der Zielvariablen assoziiert ist. Da die Subgruppen definitionsgemäß kleiner sind als die gesamte Studienpopulation, fehlt häufig die Power, um Gruppenunterschiede aufzudecken.

Es wurden stratifizierte Analysen für mögliche Confounder durchgeführt wie z.B. Geschlecht des Kindes, Anzahl der Geschwister, atopische Erkrankungen der Mutter, Rauchen während der Schwangerschaft, Haustiere, Konsum von Frischmilch während der Schwangerschaft, Arbeiten auf dem Bauernhof, häufiger Kontakt zu Kühen oder Pferden während der Schwangerschaft.

Die Homogenität der Untergruppen wurde nach der Methode von Breslow-Day geprüft. Der Test vergleicht die Odds Ratios zweier Gruppen. Fällt er signifikant aus, so liegt wahrscheinlich kein Störfaktor (Confounder) vor, sondern ein echter Effekt (Interaktion) und man muss bei der weiteren Analyse stratifiziert vorgehen. Da zuvor gezeigt wurde, dass sich die Genexpression in der Schweiz anders verhält als in den anderen Ländern, wurden die Länder für die Subgruppenanalysen nicht „gepoolt“, sondern die Berechnungen getrennt für die Schweiz und die anderen Länder durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 und 15 dargestellt.

Der Breslow-Day Test für alle Länder ohne die Schweiz ergab folgende signifikante Unterschiede: Die Odds-Ratios der beiden Subgruppen „Heuschnupfen der Mutter ja/nein“ für die Genexpression von IDO waren nicht homogen. In der Subgruppe derjenigen Mütter, bei denen eine ärztliche Diagnose für allergische Rhinitis vorliegt, verhielt es sich ebenso. Für IDO unterschieden sich auch die Odds-Ratios bei „Neurodermitis ja/nein“ und „Diagnose Neurodermitis ja/nein“ signifikant. Stratifizierte man nach dem Kriterium „Jemals mehr als fünf Schachteln geraucht“, so war der Breslow-Day Test für ILT3, ILT4 sowie FOXP3 signifikant. Die Odds Ratios der beiden Subgruppen „Einnahme von Antibiotika während der Schwangerschaft ja/nein“ waren für die ILT3-Expression signifikant unterschiedlich.

Bei Subgruppenanalysen der Schweiz reduziert sich die Fallzahl sehr stark, daher wurde in einigen Untergruppen anstelle des Chi<sup>2</sup>-Tests der exakte Test nach Fisher angewandt. Die Odds Ratios der beiden Subgruppen „Asthma der Mutter ja/nein“ und „Diagnose Asthma ja/nein“ für die Genexpression von RGS1 waren signifikant unterschiedlich. Außerdem ergab der Breslow-Day Test für IDO bei den Subgruppen „ältere Geschwister ja/nein“ einen signifikanten Unterschied.

Bei IDO waren auch die Subgruppen „Konsum roher Milch während der Schwangerschaft ja/nein“ nicht homogen. Stratifiziert man nach dem Halten von Haustieren, so ergab sich für ILT4 ein signifikanter Breslow-Day Test. Bei ILT3 waren die Odds Ratios der Untergruppen „Katzen ja/nein“ nicht homogen.

Bei den multivariaten Analysen wurden diese Ergebnisse berücksichtigt und für das jeweilige Gen auch stratifiziert betrachtet (Tabelle 16 und 17). Stratifizierte man nach der atopischen Erkrankung der Mutter (ärztliche Diagnose für Asthma oder Neurodermitis oder Heuschnupfen), so zeigte sich deutlich, dass der positive, signifikante Zusammenhang der Exposition auf dem Bauernhof mit der Genexpression von ILT4 nur im Nabelschnurblut der nicht vorbelasteten Kinder bestand. Lag bei der Mutter eine Diagnose für mindestens eine der atopischen Erkrankungen vor, so ergaben sich keine signifikanten Assoziationen zwischen der Exposition und der ILT4-Expression.

Ähnliche Ergebnisse erhielt man, wenn nach dem Rauchverhalten der Mutter stratifiziert wurde. Nur bei den Nichtraucherinnen war die Exposition auf dem Bauernhof (Farmerstatus bzw. Mutter arbeitet auf dem Bauernhof) signifikant und positiv mit der Genexpression von ILT4 assoziiert. Hatte die Mutter jemals mehr als fünf Schachteln bzw. während der Schwangerschaft geraucht, gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen verschiedenen Expositionen auf dem Bauernhof und der ILT4-Expression.

Führte man stratifizierte multivariate Analysen für die Genexpression von FOXP3 durch, so waren die Ergebnisse tendenziell ähnlich, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei ILT4. Auch hier war nur bei den nicht vorbelasteten Kindern der Farmerstatus signifikant und positiv mit der Genexpression von FOXP3 assoziiert. Der Konsum von Frischmilch während der Schwangerschaft erreichte das Signifikanzniveau von  $p=0,05$  bei Verwendung der Methode „Vorwärtsselektion“. Die anderen mit der Exposition auf dem Bauernhof zusammenhängenden Variablen, wie z.B. der häufige Kontakt zu Kühen, waren im Nabelschnurblut der nicht-vorbelasteten Kinder nicht signifikant.

Bei der getrennten Betrachtung von Müttern, die jemals mehr als fünf Schachtel geraucht hatten oder nicht, war der Farmerstatus nur bei den Nicht-Raucherinnen signifikant mit der FOXP3-Expression assoziiert. Bei Stratifizierung nach Rauchen in der Schwangerschaft gab es in keiner der beiden Gruppen eine signifikante Assoziation mit der Genexpression.

**Tabelle 14 Assoziation des Farmerstatus mit der Genexpression innerhalb verschiedener Subgruppen in allen Ländern ohne Schweiz (n=735); Test auf Homogenität der Odds Ratios**

|                                                             | Anzahl der Kinder  | p-Wert | OR   | 95%-KI     | Breslow-Day  |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|--------|------|------------|--------------|
| <b>Heuschnupfen der Mutter</b>                              |                    |        |      |            |              |
| <b>IDO</b>                                                  |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 189 (117 NB/72 B)  | 0,099  | 0,56 | 0,28-1,12  | <b>0,019</b> |
| nein                                                        | 546 (266 NB/280 B) | 0,066  | 1,45 | 0,98-2,15  |              |
| <b>Diagnose Heuschnupfen</b>                                |                    |        |      |            |              |
| <b>IDO</b>                                                  |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 133 (84 NB/49 B)   | 0,060  | 0,45 | 0,20-1,05  | <b>0,015</b> |
| nein                                                        | 602 (299 NB/303 B) | 0,087  | 1,39 | 0,95-2,02  |              |
| <b>Neurodermitis der Mutter</b>                             |                    |        |      |            |              |
| <b>IDO</b>                                                  |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 68 (408 NB/28 B)   | 0,008  | 7,00 | 1,44-33,92 | <b>0,010</b> |
| nein                                                        | 667 (343 NB/324 B) | 0,946  | 0,99 | 0,69-1,42  |              |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>                               |                    |        |      |            |              |
| <b>IDO</b>                                                  |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 65 (39 NB/26 B)    | 0,016  | 6,00 | 1,23-29,39 | <b>0,021</b> |
| nein                                                        | 670 (344 NB/326 B) | 0,947  | 1,01 | 0,71-1,45  |              |
| <b>Jemals mehr als 5 Schachteln geraucht</b>                |                    |        |      |            |              |
| <b>ILT3</b>                                                 |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 307 (189 NB/118 B) | 0,354  | 0,79 | 0,48-1,31  | <b>0,014</b> |
| nein                                                        | 428 (194 NB/234 B) | 0,007  | 1,84 | 1,18-2,89  |              |
| <b>ILT4</b>                                                 |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 307 (189 NB/118 B) | 0,783  | 1,08 | 0,64-1,80  | <b>0,008</b> |
| nein                                                        | 428 (194 NB/234 B) | 0,000  | 2,73 | 1,71-4,37  |              |
| <b>FOXP3</b>                                                |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 307 (189 NB/118 B) | 0,717  | 0,91 | 0,55-1,51  | <b>0,023</b> |
| nein                                                        | 428 (194 NB/234 B) | 0,003  | 2,00 | 1,27-3,14  |              |
| <b>Einnahme von Antibiotika während der Schwangerschaft</b> |                    |        |      |            |              |
| <b>ILT3</b>                                                 |                    |        |      |            |              |
| ja                                                          | 185 (97 NB/88 B)   | 0,009  | 2,40 | 1,24-4,64  | <b>0,035</b> |
| nein                                                        | 538 (282 NB/256 B) | 0,797  | 1,05 | 0,71-1,56  |              |

Dichotomisierte, nicht-adjustierte Genexpressionsdaten (unteres Quartil und andere Quartile), p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests und Angabe der Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervall, Test auf Homogenität der Odds Ratios mit Breslow-Day. Es werden nur Ergebnisse der Subgruppen aufgeführt, für die der Breslow-Day Test signifikant ausfiel.

**Tabelle 15** Assoziation des Farmerstatus mit der Genexpression innerhalb verschiedener Subgruppen in der Schweiz (n=203); Test auf Homogenität der Odds Ratios

|                                                        | Anzahl der Kinder | p-Wert | OR    | 95%-KI      | Breslow-Day  |
|--------------------------------------------------------|-------------------|--------|-------|-------------|--------------|
| <b>Asthma der Mutter</b>                               |                   |        |       |             |              |
| <b>RGS1</b>                                            |                   |        |       |             |              |
| ja                                                     | 21 (10 NB/11 B)   | 0,035* | 1,83  | 1,07-3,14   | <b>0,040</b> |
| nein                                                   | 182 (99 NB/83 B)  | 0,286  | 1,10  | 0,92-1,33   |              |
| <b>Diagnose Asthma</b>                                 |                   |        |       |             |              |
| <b>RGS1</b>                                            |                   |        |       |             |              |
| ja                                                     | 17 (9 NB/8 B)     | 0,029* | 2,00  | 1,00-4,00   | <b>0,042</b> |
| nein                                                   | 186 (100 NB/86 B) | 0,260  | 0,69  | 0,36-1,32   |              |
| <b>Ältere Geschwister</b>                              |                   |        |       |             |              |
| <b>IDO</b>                                             |                   |        |       |             |              |
| ja                                                     | 141 (69 NB/72 B)  | 0,030  | 0,45  | 0,22-0,93   | <b>0,047</b> |
| nein                                                   | 62 (40 NB/22 B)   | 0,375* | 1,93  | 0,54-6,92   |              |
| <b>Trinken roher Milch während der Schwangerschaft</b> |                   |        |       |             |              |
| <b>IDO</b>                                             |                   |        |       |             |              |
| ja                                                     | 72 (15 NB/57 B)   | 0,368* | 1,71  | 0,52-5,58   | <b>0,029</b> |
| nein                                                   | 131 (94 NB/37 B)  | 0,011  | 0,36  | 0,16-0,80   |              |
| <b>Haustiere</b>                                       |                   |        |       |             |              |
| <b>ILT4</b>                                            |                   |        |       |             |              |
| ja                                                     | 130 (44 NB/86 B)  | 0,023  | 1,291 | 1,056-1,579 | <b>0,032</b> |
| nein                                                   | 73 (65 NB/8 B)    | 0,340* | 0,785 | 0,691-0,891 |              |
| <b>Katzen</b>                                          |                   |        |       |             |              |
| <b>ILT3</b>                                            |                   |        |       |             |              |
| ja                                                     | 106 (30 NB/76 B)  | 0,022  | 0,24  | 0,07-0,87   | <b>0,026</b> |
| nein                                                   | 97 (79 NB/18 B)   | 0,512* | 2,19  | 0,46-10,49  |              |

Dichotomisierte, nicht-adjustierte Genexpressionsdaten (unteres Quartil und andere Quartile), p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher (\*) und Angabe der Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervall, Test auf Homogenität der Odds Ratios mit Breslow-Day. Es werden nur Ergebnisse der Subgruppen aufgeführt, für die der Breslow-Day Test signifikant ausfiel.

**Tabelle 16 Stratifizierte, multivariate Analysen für die Genexpression von ILT4 (Länder ohne Schweiz)**  
a) stratifiziert nach atopischer Erkrankung der Mutter (Diagnose Asthma, Neurodermitis oder allerg. Rhinitis)

| Atopische Erkrankung: ja (n=187, 1 fehlender Fall)        |      |           |              |
|-----------------------------------------------------------|------|-----------|--------------|
|                                                           | aOR* | 95% KI    | p-Wert       |
| Farmerstatus                                              |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,11 | 0,54-2,29 | 0,781        |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                         |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,23 | 0,56-2,70 | 0,604        |
| Häufiger Kontakt zu Bauernhoftieren w. d. Schwangerschaft |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 0,63 | 0,31-1,29 | 0,205        |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft           |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 0,60 | 0,30-1,24 | 0,167        |
| Zeit im Stall (Std. pro Monat)                            |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,00 | 0,99-1,01 | 0,849        |
| Atopische Erkrankung: nein (n=545, 2 fehlende Fälle)      |      |           |              |
|                                                           | aOR* | 95% KI    | p-Wert       |
| Farmerstatus                                              |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,89 | 1,21-2,94 | <b>0,005</b> |
| Methode Vorwärtsselektion:                                | 2,01 | 1,34-3,03 | <b>0,001</b> |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                         |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,87 | 1,14-3,07 | <b>0,013</b> |
| Methode Vorwärtsselektion:                                | 2,05 | 1,30-3,23 | <b>0,002</b> |
| Häufiger Kontakt zu Bauernhoftieren w. d. Schwangerschaft |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,82 | 1,18-2,81 | <b>0,007</b> |
| Methode Vorwärtsselektion:                                | 2,01 | 1,33-3,03 | <b>0,001</b> |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft           |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,65 | 1,07-2,54 | <b>0,023</b> |
| Methode Vorwärtsselektion:                                | 1,83 | 1,21-2,76 | <b>0,004</b> |
| Zeit im Stall (Std. pro Monat)                            |      |           |              |
| Einschluss-Methode:                                       | 1,01 | 1,00-1,01 | <b>0,034</b> |
| Methode Vorwärtsselektion:                                | 1,01 | 1,00-1,01 | <b>0,009</b> |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister, Haustiere

**Fortsetzung von Tabelle 16**

b) stratifiziert nach dem Rauchverhalten der Mutter

„jemals mehr als 5 Schachteln geraucht“: ja (n=306, 1 fehlender Fall)

|                                                         | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmer                                                  | 0,81        | 0,45-1,45     | 0,477         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                       | 0,85        | 0,44-1,63     | 0,621         |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft (n=303) | 0,88        | 0,50-1,54     | 0,644         |
| Zeit im Stall (Std. pro Monat)                          | 1,00        | 0,99-1,00     | 0,529         |
| Frischmilch w. der Schwangerschaft                      | 0,86        | 0,49-1,51     | 0,594         |

„jemals mehr als 5 Schachteln geraucht“: nein (n=426, 2 fehlende Fälle)

|                                                         | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmer                                                  | 2,56        | 1,55-4,25     | <b>0,000</b>  |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                       | 2,52        | 1,45-4,39     | <b>0,001</b>  |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft (n=425) |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                     | 1,56        | 0,96-2,54     | 0,074         |
| Methode Vorwärtsselektion:                              | 1,63        | 1,03-2,58     | <b>0,036</b>  |
| Zeit im Stall (Std. pro Monat)                          | 1,01        | 1,00-1,02     | <b>0,010</b>  |
| Frischmilch w. der Schwangerschaft                      | 1,28        | 0,78-2,10     | 0,325         |

Rauchen während der Schwangerschaft: ja (n=47, 1 fehlender Fall):

|                                                        | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmer                                                 | 0,29        | 0,05-1,77     | 0,179         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                      | 0,24        | 0,04-1,46     | 0,122         |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft (n=46) | 0,82        | 0,18-3,77     | 0,795         |
| Zeit im Stall (Std. pro Monat)                         | 0,99        | 0,97-1,00     | 0,121         |
| Frischmilch w. der Schwangerschaft                     | 0,63        | 0,14-2,93     | 0,556         |

Rauchen während der Schwangerschaft: nein (n=685, 2 fehlende Fälle)

|                                                         | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmer                                                  | 1,75        | 1,19-2,59     | <b>0,005</b>  |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                       | 1,85        | 1,20-2,86     | <b>0,005</b>  |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft (n=682) | 1,26        | 0,86-1,84     | 0,232         |
| Zeit im Stall (Std. pro Monat)                          | 1,01        | 1,00-1,01     | <b>0,029</b>  |
| Frischmilch w. der Schwangerschaft                      | 1,13        | 0,77-1,66     | 0,520         |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister, Haustiere; wenn nicht anders angegeben, wurde die Methode „Einschluss“ verwendet

**Tabelle 17 Stratifizierte, multivariate Analysen für die Genexpression von FOXP3 (Länder o. Schweiz)**  
a) stratifiziert nach atopischer Erkrankung der Mutter (Diagnose Asthma, Neurodermitis oder allerg. Rhinitis)

Atopische Erkrankung: ja (n=187, 1 fehlender Fall)

|                                                 | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|-------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                                    | 0,92        | 0,45-1,86     | 0,812         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof               | 0,81        | 0,38-1,72     | 0,582         |
| Frischmilch w. d. Schwangerschaft               | 0,83        | 0,41-1,69     | 0,603         |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft | 0,56        | 0,28-1,15     | 0,113         |

Atopische Erkrankung: nein (n=546, 1 fehlender Fall)

|                                                         | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                                            | 1,55        | 1,03-2,33     | <b>0,037</b>  |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof                       | 1,26        | 0,82-1,94     | 0,298         |
| Frischmilch w. d. Schwangerschaft                       |             |               |               |
| Einschluss-Methode:                                     | 1,45        | 0,95-2,21     | 0,084         |
| Methode Vorwärtsselektion:                              | 1,57        | 1,05-2,36     | <b>0,029</b>  |
| Häufiger Kontakt zu Kühen w. d. Schwangerschaft (n=544) | 1,26        | 0,83-1,90     | 0,279         |

b) stratifiziert nach dem Rauchverhalten der Mutter

„jemals mehr als 5 Schachteln geraucht“: ja (n=306, 1 fehlender Fall)

|                                   | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|-----------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                      | 0,78        | 0,45-1,35     | 0,374         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof | 0,71        | 0,39-1,29     | 0,257         |

„jemals mehr als 5 Schachteln geraucht“: nein (n=427, 1 fehlender Fall)

|                                   | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|-----------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                      | 1,97        | 1,23-3,16     | <b>0,005</b>  |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof | 1,54        | 0,94-2,51     | 0,088         |

Rauchen während der Schwangerschaft: ja (n=47, 1 fehlender Fall)

|                                   | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|-----------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                      | 1,63        | 0,33-7,90     | 0,547         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof | 0,79        | 0,13-4,70     | 0,798         |

Rauchen während der Schwangerschaft: nein (n=686, 1 fehlender Fall)

|                                   | <b>aOR*</b> | <b>95% KI</b> | <b>p-Wert</b> |
|-----------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| Farmerstatus                      | 1,34        | 0,94-1,92     | 0,111         |
| Mutter arbeitet auf dem Bauernhof | 1,16        | 0,79-1,70     | 0,443         |

\* adjustiert für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister; wenn nicht anders angegeben, wurde die Methode „Einschluss“ verwendet

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten im Rahmen einer Bauernstudie die der Hygienehypothese (siehe 2.2.2) zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen genauer beleuchtet werden. Der Grundstein für die Entwicklung von Toleranz wird bereits im Mutterleib gelegt. Während der Schwangerschaft kommt es bei Mutter und Kind zu einer Verschiebung der Th-Zellpopulation in Richtung Th2- und Th3-Zellen (Wegmann et al., 1993; Raghupathy, 2001). Dies ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, da ein Überwiegen der Th1-Immunantwort zu erhöhten Abortraten führen kann (Reinhard et al., 1998). Aus Proliferationsstudien weiß man, dass das Immunsystem des Neugeborenen verschiedene Allergene, z.B. Kuhmilchproteine, Hühnereiweißprotein und Birkenpollen erkennt und daraufhin eine veränderte T-Zellreaktivität aufweist (Szepfalusi et al., 1997; Van Duren-Schmidt et al., 1997). Bei den meisten Neugeborenen ist die Immunantwort zunächst durch ein relatives Th2-Übergewicht charakterisiert. Bei nicht-atopischen Kindern reift während des ersten Lebensjahres die Th1-Antwort aus. Bei Kindern, die Allergien entwickelten, persistierte hingegen das initiale Th2-Übergewicht über den 18. Lebensmonat hinaus (Prescott et al., 1999). Dies weist darauf hin, dass bei späteren Atopikern offenbar bereits bei der Geburt eine veränderte T-Zellreaktivität besteht und prä- oder perinatal eine immunologische Weichenstellung für die Entwicklung atopischer Erkrankungen erfolgt.

Damit stellt sich die Frage, welche regulatorischen Mechanismen für das Zustandekommen des Th1/Th2-Gleichgewichts verantwortlich sind. Zunächst vermutete man, dass bei späteren Atopikern in einem sensiblen Zeitfenster spezifische Trigger fehlen, die eine Th1-Immunantwort begünstigen bzw. solche Trigger überwiegen, die eine Th2-Immunantwort fördern. Heute weiß man, dass die Th1/Th2-Balance durch ein Netzwerk an regulatorischen Immunzellen, wie z.B. regulatorischen T-Zellen, NKT-Zellen und regulatorischen dendritischen Zellen, kontrolliert wird. Man geht davon aus, dass bei späteren „Allergikern“ regulatorische Mechanismen, die für die Th1/Th2-Immunebalance essentiell sind, defekt oder abgeschwächt sind. Dies wurde auch „Gegenregulations“ (*counter-regulation*)-Hypothese genannt (Wills-Karp et al., 2001). Man vermutet, dass mikrobielle Infektionen regulatorische T-Zell Antworten induzieren, die Th1- und Th2-assoziierte Erkrankungen unterdrücken. Dadurch könnte auch die niedrigere Prävalenz allergischer Erkrankungen bei den Bauernkindern erklärt werden kann.

Für ein besseres Verständnis dieser Regulationsmechanismen war es interessant, zu untersuchen, ob bei Bauernkindern bereits zum Zeitpunkt der Geburt eine erhöhte Aktivität

regulatorischer Immunzellen zu erkennen ist. Man stellte die Hypothese auf, dass Moleküle, die regulatorische Immunzellen aktivieren, in einer Population von Kindern mit erniedrigtem Risiko für die Entwicklung allergischer Erkrankungen höher exprimiert sein sollten als in Kindern mit durchschnittlichem Risiko. Hierfür wurde in dieser Arbeit die Expression der Gene IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 im Nabelschnurblut von Bauern- und Nichtbauernkindern untersucht.

Die Expression der genannten Gene wurde erstmals im Rahmen einer epidemiologischen Bauernstudie bestimmt; zudem handelt es sich um die erste Untersuchung der Genexpression von IDO, ILT3, ILT4 und RGS1 in Nabelschnurblut. Daher liegen keine Vergleichsdaten aus der Literatur vor.

### **Studienpopulation**

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Studie Genexpressionsdaten von 938 Neugeborenen (446 Bauern-, 492 Nicht-Bauernkinder) aus fünf europäischen Ländern erhoben werden. In vergleichbaren multizentrischen Studien wie der PARSIFAL- und der ALEX-Studie wurden jeweils nur die Blutproben der Schweizer Teilnehmer auf Expressionsunterschiede von TLRs und anderen Molekülen getestet. Die untersuchte Population bestand in der PARSIFAL-Studie aus 268 Kindern (150 Bauern und 118 Nicht-Bauernkindern) (Ege et al., 2007) und in der ALEX-Studie aus 96 Kindern (25 Bauern und 71 Nicht-Bauern) (Lauener et al., 2002).

Die Kontrollpopulation der PASTURE-Studie stammte aus der gleichen ländlichen Gegend wie die Bauern, wobei Familien aus Städten mit mehr als 30.000 Einwohnern oder aus Industriestandorten ausgeschlossen waren. Somit können Unterschiede, die zwischen „Stadt“- und „Landkindern“ bestehen, wie z.B. eine unterschiedliche Wohnsituation, Lärm und Luftverschmutzung als Störfaktoren vernachlässigt werden.

### **Methode**

Die Qualität der RNA beeinflusst die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen maßgeblich. Besonders kritisch ist dabei eine Lagerung bei Raumtemperatur bzw. bei ca. 4°C wegen der raschen Degradation der RNA. Von der Blutabnahme in der Klinik bis zum Einfrieren der Proben bei -80°C im Labor vergingen in der PASTURE-Studie bis zu 24 Stunden. Um die Stabilität der RNA während dieser kritischen Phase zu gewährleisten, wurde das PAXgene Blutabnahmesystem verwendet. Dabei handelt es sich um ein einfach zu handhabendes System, das die RNA durch eine in den Röhrchen vorgelegte Stabilisierungslösung unmittelbar nach der Blutabnahme vor Degradation schützt. Aufgrund dessen ist es besonders

für Verwendung in großen Studien mit Zentrallabor geeignet (Rainen et al., 2002; Ovstebo et al., 2007).

Die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse ist weniger kritisch. In Vorversuchen am Kinderspital Zürich wurde nachgewiesen, dass die RNA in der Stabilisierungslösung des PAXgene Röhrchens bei  $-80^{\circ}\text{C}$  Lagerung über mehrere Jahre hinweg stabil bleibt. Bei der photometrischen Quantifizierung konnte eine relativ gute Ausbeute und Reinheit der RNA beobachtet werden.

Die Real time RT-PCR wurde unter Verwendung von TaqMan Low Density Arrays durchgeführt. Bei dieser relativ neuen Methode ist die Zahl der Pipettierschritte reduziert und ermöglicht die simultane Bestimmung von bis zu 384 Genen auf einer Platte. Die Methode ist daher besonders für die Verwendung in Studien mit einer großen Probenanzahl geeignet. Aus finanziellen Gründen musste darauf verzichtet werden, die Bestimmungen in Duplikaten oder Triplikaten durchzuführen. Man kann aber davon ausgehen, dass bei der hohen Fallzahl einzelne Fehler bei der Messung nicht so sehr ins Gewicht fallen.

Ein wichtiger Aspekt bei der relativen Quantifizierung ist die Auswahl eines geeigneten internen Standards (Thellin et al., 1999). Das *Housekeeping* Gen sollte konstant exprimiert und das Expressionsniveau nicht durch die Versuchsbedingungen beeinflusst werden (Karge et al., 1998; Bustin, 2000).

Ein Vorteil der Verwendung von ribosomalen RNAs, wie der 18S rRNA, liegt darin, dass sie, anders als andere interne Standards, nicht von der RNA-Polymerase II, sondern von der RNA-Polymerase I transkribiert werden. Im Gegensatz zur Polymerase II wird die Polymerase I weniger von äußeren Faktoren beeinflusst und unterliegt dadurch nicht so hohen Transkriptionsschwankungen (Bustin, 2000).

Zwar korrelierte die Expression der drei verschiedenen *Housekeeping* Gene in hohem Maße (siehe Tabelle 6), dennoch variierten die Ergebnisse, je nachdem, auf welches *Housekeeping* Gen das zu untersuchende Gen bezogen wurde. Wir entschieden uns schließlich für 18S rRNA als internen Standard, da es ein sehr häufig verwendetes *Housekeeping* Gen ist und stabile Expressionsraten zeigt (Thellin et al., 1999; Bas et al., 2004). Zudem wird die Vergleichbarkeit mit in vorangegangenen Bauernstudien durchgeführten Genexpressionsanalysen ermöglicht, die ebenfalls 18S rRNA verwendeten (Lauener et al., 2002; Ege et al., 2007).

### **Ergebnisse der bivariaten Analysen mit den stetigen Daten**

Beim Vergleich der stetigen, nicht-adjustierten Genexpressionsdaten wurde deutlich, dass die Gene ILT3 und ILT4 bei den Bauern signifikant höher exprimiert waren als bei den Nicht-Bauern. FOXP3, ebenfalls bei der Bauerngruppe höher exprimiert, verfehlte knapp die Signifikanzgrenze.

Betrachtet man die Ergebnisse länderweise, so fällt auf, dass die Schweiz nicht mit den anderen Ländern übereinstimmte. Hier war die Genexpression von IDO, ILT3, ILT4 und RGS1 bei den Nicht-Bauern signifikant höher als bei den Bauern. Analyisierte man die vier Länder ohne die Schweiz, so war nun IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3 bei Bauernkindern signifikant höher exprimiert. Bei ILT3 und ILT4 ergaben sich hochsignifikante Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern. Aufgrund dieser länderspezifischen Unterschiede schien es nicht gerechtfertigt, alle Länder gemeinsam zu auswerten. Bei den folgenden Auswertungen wurden die Länder ohne die Schweiz und die Schweiz stets getrennt voneinander analysiert. Mögliche Gründe, warum die genannten Gene im Nabelschnurblut der Schweizer Bauernkinder niedriger exprimiert sind, werden im späteren Verlauf der Diskussion erläutert.

Die anfangs aufgestellte Hypothese einer höheren Expression der untersuchten Gene bei den Bauernkindern bestätigte sich in der Gesamtpopulation ohne Schweiz für IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3. Auf der Ebene der einzelnen Länder bestätigte sich die Vermutung für dieselben Gene in Deutschland, Finnland, Österreich und Frankreich. Diese Unterschiede zwischen Bauernkindern und Kontrollen erreichen jedoch nicht immer das Signifikanzniveau von 0,05, was wahrscheinlich auch an der geringeren Fallzahl der einzelnen Länder liegt.

### **Ergebnisse der bivariaten Analysen mit den kategorisierten Daten:**

Nach Dichotomisierung der Genexpressionsdaten sind die Unterschiede zwischen den Bauern- und Kontrollkindern weniger ausgeprägt. Man kann dies mit dem Informationsverlust begründen, den eine Einteilung von stetigen Daten in zwei Kategorien zur Folge hat. Der Informationsgehalt der dichotomisierten Variablen beschränkt sich nur auf das Vorhandensein eines bestimmten Merkmals, z.B. ob die relative Genexpression im unteren Quartil liegt. Wenn die Testvoraussetzungen für bestimmte Verfahren nicht erfüllt werden, bietet die Dichotomisierung der Daten den Vorteil, dass entsprechende Tests für dichotome Variablen angewendet werden können, die praktisch keine Anforderungen an die erhobenen Daten stellen (z.B. eine Normalverteilung).

Häufig findet der Median Verwendung als Schwellenwert für die Dichotomisierung. Dabei wird angenommen, dass es ein „normales“ Ausmaß der jeweils betrachteten Variable gibt. In dieser Arbeit entschied man sich für die Einteilung in Werte des ersten Quartils und der anderen Quartile, da die relativen Genexpressionsdaten größtenteils nahe bei Null lagen.

Es fällt auf, dass nach Dichotomisierung bei ILT3 die signifikanten Unterschiede zwischen Farmern und Nicht-Farmern in allen fünf Ländern und den Ländern ohne Schweiz nicht mehr bestehen. Auch bei IDO verschwinden die Signifikanzen in den Ländern ohne Schweiz; im Gegensatz dazu bleiben bei ILT4 und FOXP3 die signifikanten Unterschiede erhalten. Bei RGS1 ist im Gegensatz zu den stetigen Daten der Unterschied zwischen Bauern- und Nichtbauern in der Gesamtpopulation nun signifikant.

Bei Betrachtung der einzelnen Länder ergeben sich einige weitere Verschiebungen in den Signifikanzen im Vergleich zu den stetigen Daten. In der Schweiz z.B. fällt der Chi<sup>2</sup>-Test nur noch für ILT4 signifikant aus, für IDO, ILT3 sowie RGS1 dagegen nicht.

### **Ergebnisse der multivariaten Analysen**

Die Regressionsanalysen wurden nur für die Länder gerechnet, in denen für die jeweiligen Gene in den bivariaten Analysen bereits signifikante Unterschiede zu erkennen waren (Tabelle 8). Es wurde für alle Confounder adjustiert, die einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hatten (siehe Tabellen 9 und 10).

#### **ILT4**

Bei ILT4 stellte sich heraus, dass das Vorhandensein älterer Geschwister, Haustiere und das Geschlecht „Confounder“ darstellen, die den Einfluss des Farmerstatus auf die ILT4-Expression modifizieren. Dies ist insofern interessant, da Strachan bereits 1989 einen inversen Zusammenhang zwischen allergischer Rhinitis und der Anzahl der Geschwister sowie der Geburtenreihenfolge in größeren Familien fand (Strachan, 1989). Die Frage, ob Haustiere bei Kindern das Risiko für eine Sensibilisierung gegenüber Allergenen und für die Entwicklung allergischer Erkrankungen erhöhen oder erniedrigen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Anyo et al., 2002; Holscher et al., 2002; Lau et al., 2005; Waser et al., 2005). Dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Entwicklung kindlicher Atemwegserkrankungen hat, ist seit langem bekannt. Beispielsweise zeigen Jungen während der Kindheit häufiger ein pfeifendes Atemgeräusch („wheezing“) als Mädchen (Dodge und Burrows, 1980); und es ist bei den Jungen wahrscheinlicher, dass dieses Atemgeräusch persistiert (Martinez et al., 1995). Auch weisen Jungen häufiger als Mädchen erhöhte IgE-Werte bei der Geburt sowie während der Kindheit auf (Nickel et al., 2005).

Bei den multivariaten Analysen blieb nach Adjustierung für Länder, Geschlecht, ältere Geschwister und Haustiere der Einfluss des Farmerstatus auf die Expression von ILT4 signifikant. Um den „Bauerneffekt“ genauer zu analysieren, wurden anschließend weitere Faktoren getestet, die für die Exposition auf dem Bauernhof charakteristisch sind. Da einige dieser Variablen stark kollinear sind, z.B. „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“ und „häufiger Kontakt zu Kühen“, ist es nicht sinnvoll, diese gleichzeitig in ein Regressionsmodell einzuschließen. „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“ hängt fast genauso stark wie der Farmerstatus mit der ILT4-Expression zusammen. „Mutter arbeitet auf dem Hof“ untersucht, welche Frauen aktiv an der Bewirtschaftung des Hofes beteiligt sind und somit einer höheren mikrobiellen Exposition ausgesetzt sind. Die Frage aus dem Fragebogen bezieht sich nicht explizit auf die Schwangerschaft, aber vermutlich arbeiten diese Frauen auch während der Schwangerschaft auf dem Hof. Untersucht man speziell die Exposition gegenüber Tieren während der Schwangerschaft, so ist die während der Schwangerschaft im Stall verbrachte Zeit (in Stunden pro Monat) signifikant mit der Genexpression assoziiert, zumindest bei der Methode der Vorwärtsselektion von Confoundern. Hierbei werden nur diejenigen Confounder ins Modell einbezogen, die einen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable haben. Im Gegensatz dazu zwingt die Einschluss-Methode alle ausgewählten Variablen in die Regressionsgleichung.

Ein häufiger Kontakt zu Bauernhoftieren in der Schwangerschaft war ebenfalls nur bei der Vorwärtsselektion signifikant mit der ILT4-Expression assoziiert. Da der Kontakt zu Tieren offensichtlich eine wichtige Rolle zu spielen scheint, wurde darüber hinaus untersucht, wie die Anzahl der Tierspezies, zu denen die Mutter während der Schwangerschaft Kontakt hatte, das Odds Ratio beeinflusst. Interessanterweise erhöhte jede zusätzliche Tierspezies die Expression von ILT4 um den Faktor von ca. 1,3. Es scheint demnach eine „Dosis-Wirkungs-Beziehung“ zwischen der Anzahl der Tierspezies, zu denen die Mutter Kontakt hatte, und der Höhe der ILT4-Expression in Nabelschnurblut zu bestehen.

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der „Bauerneffekt“ auf die Genexpression von ILT4 vor allem durch den Kontakt zu den Bauernhoftieren (d.h. Kühe, Schweine, Schafe, Pferde) zustande kommt. Das Trinken roher Milch dagegen scheint keinen Einfluss auf die ILT4-Expression zu haben. Da es sich bei der PASTURE-Studie um eine Längsschnittstudie handelt, könnte man verfolgen, wie sich die ILT4-Expression in späteren Lebensjahren des Kindes entwickelt und ob die „Dosis-Wirkungs-Beziehung“ weiterhin bestehen bleibt.

Insgesamt stützen die Ergebnisse die Hypothese, dass eine starke mikrobielle Exposition der Mutter im Stall Auswirkungen auf die Regulation bestimmter Gene im Nabelschnurblut hat.

Sie weisen weiter auf einen starken mütterlichen Einfluss auf die Entwicklung von Toleranzmechanismen beim Kind *in utero* hin.

Im Nabelschnurblut der Schweizer Kinder unterschieden sich die Ergebnisse von denen der anderen Länder vor allem darin, dass die Effekte in die entgegengesetzte Richtung weisen. Die adjustierten Odds Ratios sind alle kleiner als Eins. Somit widersprechen die Ergebnisse in der Schweiz der anfangs aufgestellten Hypothese. Einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von ILT4 hat bei den Schweizer Kindern nur der häufige Kontakt zu Kühen in der Schwangerschaft. Der Farmerstatus, „Mutter arbeitet auf dem Bauernhof“ und das Trinken von Frischmilch während der Schwangerschaft haben nach Adjustierung keinen signifikanten Einfluss, was wahrscheinlich an der geringeren Fallzahl der Schweizer Proben im Vergleich zur Gesamtpopulation liegt.

### **IDO, ILT3, RGS1 und FOXP3**

Auch für IDO, ILT3 und RGS1 erhielt man bei den multivariaten Analysen in einzelnen Ländern keine signifikanten Ergebnisse. Die gleiche Beobachtung machte man für FOXP3 in der Schweiz. Darüber hinaus war der Einfluss des Farmerstatus auf die FOXP3-Expression auch in allen Ländern ohne die Schweiz nicht mehr signifikant, sobald für die entsprechenden Confounder adjustiert wurde.

### **Stratifizierte Analysen für ILT4 und FOXP3**

#### *Stratifiziert nach den atopischen Erkrankungen der Mutter*

Stratifiziert man nach dem Atopiestatus der Mutter (ärztliche Diagnose für Asthma, Neurodermitis oder Heuschnupfen), so fällt auf, dass nur in der Gruppe der nicht vorbelasteten Kinder der Farmerstatus signifikant mit der ILT4-Expression assoziiert ist. Auch die Exposition gegenüber Tieren bzw. dem Stall hat interessanterweise nur dann einen Effekt auf ILT4, wenn bei der Mutter keine atopische Erkrankung vorlag.

Bei FOXP3 bestätigt sich, dass nur bei den nicht vorbelasteten Kindern der Bauernstatus signifikant mit der Genexpression assoziiert ist. Auch das Trinken von Frischmilch während der Schwangerschaft hatte in der vorliegenden Arbeit nur dann einen signifikanten Einfluss auf die FOXP3-Expression, wenn bei der Mutter keine atopische Erkrankung vorlag. Aktuelle Ergebnisse aus der PARSIFAL-Studie zeigen, dass das Trinken von Bauernhof-Milch beim Schulkind invers mit Asthma, Rhinokonjunktivitis und der Sensibilisierung gegenüber verschiedenen Allergenen assoziiert war und der Effekt unabhängig von anderen Bauernhof-typischen Expositionen war (Waser et al., 2007). In dieser multizentrischen

Querschnittsstudie wurden Schulkinder aus Bauernfamilien, Kinder, die eine Rudolf Steiner-Schule besuchen, sowie Kinder aus jeweils einer Kontrollgruppe miteinander verglichen.

#### *Stratifizierung nach dem Rauchverhalten der Mutter*

Stratifizierte man nach „jemals mehr als 5 Schachteln geraucht“ und „Rauchen während der Schwangerschaft“, so war nur bei Kindern, deren Mütter nicht geraucht haben, der Farmerstatus signifikant und positiv mit der ILT4-Expression assoziiert. Ähnliches beobachtete man auch für FOXP3. Nur bei den Nichtraucherinnen bestand ein positiver, signifikanter Zusammenhang zwischen Bauernstatus und Genexpression im Vergleich zu den Müttern, die jemals mehr als fünf Schachteln geraucht hatten. Bei Stratifizierung nach Rauchen in der Schwangerschaft bestand dieser Unterschied bei FOXP3 nicht. Kürzlich wurde beobachtet, dass die Zahl an Leukozyten, wie Lymphozyten und (myeloide) dendritische Zellen im Nabelschnurblut von Kindern, deren Mütter in der Schwangerschaft geraucht hatten, signifikant erniedrigt waren (Pachlopnik Schmid et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Noakes und Mitarbeiter, dass Kinder von Raucherinnen im Vergleich zu Kindern von Nicht-Raucherinnen deutlich abgeschwächte TLR-vermittelte Immunantworten im Nabelschnurblut aufwiesen (Noakes et al., 2006). Durch TLR-vermittelte Signale werden auch regulatorische Immunantworten gefördert, die postnatal allergische Erkrankungen verhindern können. Es erscheint daher möglich, dass eine erhöhte Expression von immunregulatorischen Molekülen bei den Bauernkindern durch die negativen Auswirkungen des Rauchens auf das kindliche Immunsystem aufgehoben bzw. gegenreguliert werden.

#### **Mikrobielle Exposition auf dem Bauernhof und regulatorische T-Zellen**

Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, sind höheren Konzentrationen an Endotoxinen (LPS) ausgesetzt als Nicht-Bauernkinder. Der TLR4-Ligand Lipopolysaccharid (LPS) ist Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und besteht aus einem Polysaccharidanteil und einem Lipidanteil (Lipid A), der für die toxische Wirkung verantwortlich ist.

Tulic und Mitarbeiter führten Versuche an explantierter Mucosa von atopischen und nicht-atopischen Kindern durch. Sie stellten fest, dass LPS Stimulation in der Mucosa von atopischen Kindern eine allergen-induzierte Th2-vermittelte Entzündung verhindern konnte und Th1-Zytokine hochregulieren konnte (Tulic et al., 2004). TLR4 kann, neben TLR5, TLR7 und TLR8 von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert werden (Caramalho et al., 2003), und die TLR4-Expression wird durch LPS erhöht (Tulic et al., 2004). In der ALEX-Studie war die

mRNA-Expression von TLR2 und CD14 im peripheren Blut von Bauernkindern im Vergleich zu den Kontrollkindern signifikant erhöht (Lauener et al., 2002).

Caramalho et al. beobachteten außerdem, dass der TLR4-Ligand LPS in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen die Hochregulierung verschiedener Aktivierungsmarker auf ihrer Zelloberfläche induzierte, was das Überleben und die Proliferation der Zellen förderte (Caramalho et al., 2003). Die Behandlung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit LPS konnte deren Suppressor-Aktivität *in vitro* um das Zehnfache steigern.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass das angeborene Immunsystem auf die mikrobielle Exposition in der Umwelt reagiert und Toleranzmechanismen aktiviert.

### **IDO**

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass mikrobielle Produkte, nämlich LPS und synthetische Oligodesoxynukleotide, also immunstimulatorische Sequenzen aus bakterieller DNA (TLR9 Liganden), die Expression des Enzyms IDO *in vitro* und *in vivo* induzieren können (Hissong et al., 1995; Hayashi et al., 2001).

In einem tierexperimentellen Asthma-Modell konnte eine Induktion von IDO durch bakterielle DNA die Lunge vor Th1- und Th2-vermittelter Entzündung schützen (Hayashi et al., 2004). Die Autoren postulierten, dass das angeborene Immunsystem dabei einen sofortigen protektiven Effekt durch die Induktion von IDO vermittelt. Eine erhöhte Aktivität von IDO führt dem Modell nach zum Zelltod von T-Helferzellen, bedingt durch Tryptophan-Mangel und der Entstehung toxischer Tryptophan-Abbauprodukte. Ferner vermittelte IDO die Entfernung von Sauerstoffradikalen, so dass Entzündungsreaktionen in der Lunge abgeschwächt wurden. Andererseits gibt es nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten über IDO auch einen „Langzeitschutz“: Die Induktion der adaptiven Immunantwort geschieht über IDO-produzierende dendritische Zellen, die eine regulatorische T-Zellantwort hervorrufen (Mellor et al., 2003). Die Wirkung auf das adaptive Immunsystem würde auch im Einklang mit epidemiologischen Studien stehen, die zeigen, dass die mikrobielle Exposition in der frühen Kindheit einen langandauernden Schutz vor atopischen Erkrankungen bis ins Erwachsenenalter gewährt (Riedler et al., 2001).

Die bei den Bauernkindern vermutete höhere Expression von IDO konnte im Rahmen dieser Arbeit nur bei der Analyse der nicht-adjustierten Daten bestätigt werden. Der Median der relativen Expression war bei den Bauernkindern im Vergleich zu den Nicht-Bauernkindern in allen Ländern mit Ausnahme der Schweiz höher.

### FOXP3

Wie oben beschrieben war nur bei Kindern von Mütter ohne atopische Erkrankung der Bauernstatus signifikant mit der Genexpression von FOXP3 assoziiert. Der Einfluss der mütterlichen Atopie auf die FOXP3-Expression im Nabelschnurblut steht im Einklang mit einer anderen Studie: In mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut von Kindern, deren Mütter nicht atopisch waren, war die Expression von FOXP3 im Vergleich zu Kindern von atopischen Müttern erhöht. Die durch den TLR2-Agonisten Peptidoglykan *in vitro* induzierte IL-10 Produktion korrelierte dabei mit der FOXP3-Expression (Schaub et al., 2006). Auch von Amoudruz et al. wurde postuliert, dass die Kapazität, auf mikrobielle Stimuli zu antworten, im Nabelschnurblut von Müttern mit Allergien reduziert ist: Die mononukleären Zellen im Nabelschnurblut der Kinder von allergischen Müttern hatten eine deutlich niedrigere Expression von TLR2 und TLR4 verglichen mit Zellen der Kinder von Müttern ohne Allergien (Amoudruz et al., 2005).

Zusammenfassend sind bei Kindern mit erhöhtem Atopierisiko  $T_{reg}$  assoziierte Gene wie FOXP3 im Nabelschnurblut niedriger exprimiert als bei nicht-vorbelasteten Kindern. Diese Kinder haben möglicherweise eine reduzierte Fähigkeit, auf Mikroorganismen zu reagieren. Dadurch könnte es, zusammen mit zusätzlichen Umwelteinflüssen, leichter zur Entstehung atopischer Erkrankungen kommen.

In der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) asthmatischer Kinder war die Anzahl der  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kindern oder Kindern mit Husten erniedrigt und deren Funktion eingeschränkt. In gleicher Weise war die FOXP3 mRNA Expression in der BALF und im peripheren Blut bei den Asthmatikern im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen niedriger (Hartl et al., 2007).

Auch Lee et al. konnten zeigen, dass Kinder mit allergischen Erkrankungen weniger  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen besitzen als Kontrollkinder. Überraschenderweise fanden sie jedoch heraus, dass die Anzahl an  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen und die mRNA Expression von FOXP3 bei Kindern mit persistierender allergischer Rhinitis oder schwerem Asthma im Vergleich zu Kindern mit leichter allergischer Rhinitis oder leichtem Asthma erhöht war. Dies steht im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen, dass  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen bei Kindern mit allergischen Erkrankungen in ihrer Anzahl vermindert und funktionell eingeschränkt sind. Die Autoren vermuten, dass  $T_{reg}$  in Reaktion auf schwere atopische Erkrankungen möglicherweise verstärkt gebildet werden (Lee et al., 2007).

Die Rolle von FOXP3 in der Entwicklung des neonatalen Immunsystems ist noch nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit wurde erstmalig die FOXP3-Expression im Rahmen einer epidemiologischen Bauernstudie untersucht.

### **ILT3 und ILT4**

Humane Endothelzellen sind in der Lage, Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren; sie werden daher auch semi-professionelle APC genannt. In einer aktuellen Untersuchung wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit stimulierten Nabelvenen-Endothelzellen kokultiviert, woraufhin die T-Zellen proliferierten. Es zeigte sich, dass eine Vorbehandlung der Endothelzellen mit IL-10 zur Inhibierung der T-Zellproliferation führte. Die IL-10-Behandlung führte neben der Hochregulierung von SOCS-3, einem negativen Regulator der Zytokin-Sekretion, auch zu einer Induktion von ILT3 und ILT4 in den Endothelzellen. Die Antikörpervermittelte Blockade von ILT3 und ILT4 resultierte in einer fast vollständigen Wiederherstellung der T-Zellproliferation (Gleissner et al., 2007). Dieser Effekt wurde jedoch nicht durch eine Induktion von T<sub>reg</sub> vermittelt. Daher wird vermutet, dass die Expression von ILT3 und ILT4 in Endothelzellen direkt suppressiv auf T-Zellen wirkt und nicht über die Modulation kostimulatorischer Moleküle oder die Induktion von T<sub>reg</sub>.

Die Arbeitsgruppe um Katz führte eine Reihe von *in vitro* Experimenten durch, um die Rolle von gp49B1 bei der Mastzell-abhängigen anaphylaktischen Entzündungsreaktion zu untersuchen. gp49B1 ist das Maus-Homolog des humanen ILT3; es wurde später als Mitglied der LILRB-Familie identifiziert und in ILT3 umbenannt. Sie beobachteten, dass im gp49B1 Molekül die beiden ITIM-Domänen (Immunrezeptor Tyrosin-basierende inhibitorische Motive), die für eine Plasmamembranrekrutierung der SHP-1 Tyrosinphosphatase essentiell sind, auch für die Hemmung der IgE-vermittelten Mastzellaktivierung verantwortlich sind (Lu-Kuo et al., 1999). Auf molekularer Ebene geschieht dabei Folgendes auf der Mastzelle: Nach Vernetzung von gp49B1 (ILT3) mit FcεRI, dem hochaffinen Fc Rezeptor für IgE, assoziiert SHP-1 vorübergehend mit ILT3. Daraufhin werden der Austritt von Calcium aus intrazellulären Speichern und der Einstrom von extrazellulärem Calcium gehemmt. Die calciumabhängige Exozytose aus den Mastzellen und damit die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen wird so verhindert. Dies führt dazu, dass die ILT3<sup>-/-</sup> Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus höhere Inzidenzen und schwerere Ausprägungen von IgE-vermittelten und Mastzell-abhängigen anaphylaktischen Entzündungsreaktionen aufweist (Daheshia et al., 2001).

Außerdem wurde beobachtet, dass inflammatorische Reaktionen, ausgelöst durch LPS-induzierte Aktivierung von Neutrophilen, bei der  $ILT3^{-/-}$  Maus stark erhöht war. Bei der Wildtyp-Maus wurde  $ILT3$  in Neutrophilen als Reaktion auf LPS hochreguliert (Zhou et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulation von  $ILT3$  auf Neutrophilen ein angeborener Schutzmechanismus sein könnte, um pathologische Immunantworten auf bakterielle Bestandteile zu verringern.

In der Maus findet man weitere Ig-ähnliche Rezeptoren, die sogenannten PIRs (paired Ig-like receptors). Sie sind Maus-Verwandte/Orthologe zu den LILRs des Menschen und bestehen aus zwei Isoformen, dem aktivierenden PIR-A und dem inhibitorischen PIR-B. Man vermutet einen Einfluss von PIR-B auf allergische Reaktionen, da in der  $PIR-B^{-/-}$  Maus die Th2-Immunantwort verstärkt war, die durch eine erhöhte IL-4 Produktion sowie eine erhöhte Produktion von IgG1 und IgE charakterisiert war (Ujike et al., 2002).

Die oben genannten Studien wurden im Mausmodell durchgeführt. Sollten sich die Ergebnisse an humanen Zellen bestätigen, so würde dies auf eine wichtige Rolle der inhibitorischen Rezeptoren  $ILT3$  und  $ILT4$  bei der Entstehung allergischer Reaktionen hinweisen.

Andere Arbeitsgruppen untersuchten die Funktion von  $ILT3$  und  $ILT4$  in Antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, *in vitro*: Suciú-Foca und Mitarbeiter fanden heraus, dass T-Suppressor Zellen in antigenpräsentierenden Zellen die Hochregulierung der inhibitorischen Rezeptoren  $ILT3$  und  $ILT4$  induzieren und die APCs dadurch „tolerogen“ machen. Diese tolerogenen antigenpräsentierenden Zellen fördern die Entstehung von regulatorischen  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen. Sie postulieren, dass eine immunregulatorische Kaskade in Gang gesetzt wird, in der stets neue  $T_{reg}$ -Zellen entstehen (Abbildung 7) (Manavalan et al., 2003; Suciú-Foca et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Expression vor allem von  $ILT4$  im Nabelschnurblut von Bauern- im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern gefunden (mit Ausnahme der Schweiz). In Anlehnung an die eben besprochenen Ergebnisse wäre es möglich, dass eine Hochregulierung dieser Rezeptoren auf dendritischen Zellen von Bauernkindern zu deren höherer Toleranz gegenüber mikrobieller Stimulation beiträgt. Um die These zu überprüfen, könnte man z.B. mittels Durchflusszytometrie spezifizieren, welche Zellpopulation für die Hochregulation dieser inhibitorischen Rezeptoren verantwortlich ist.

## RGS1

Für RGS1 ergibt sich insgesamt ein anderes Bild als für die restlichen vier untersuchten Gene: RGS1 war tendenziell bei den Bauern niedriger exprimiert als bei den Nicht-Bauern. Dies stimmte in allen Ländern mit Ausnahme von Deutschland überein. Der Unterschied erreichte jedoch beim Vergleich der nicht-adjustierten, stetigen Daten keine Signifikanz, wenn man alle Länder gemeinsam analysierte. Nur in der Schweiz und in Frankreich war die Expression bei den Bauernkindern signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Nach Kategorisieren der Daten fiel der Unterschied in der Gesamtpopulation und auf der Ebene einzelner Länder nur noch für Frankreich signifikant aus.

Die Rolle von RGS1 bei der Entstehung allergischer Erkrankungen ist bisher noch ungeklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass RGS Proteine die Funktion von Immunzellen regulieren. RGS1 und RGS3 sind vorwiegend auf Monozyten und B-Zellen exprimiert, wohingegen RGS2, RGS3, RGS14, and RGS16 auf T Lymphozyten exprimiert sind (Denecke et al., 1999; Reif und Cyster, 2000).

Shi et al. machten die Beobachtung, dass Signale durch die Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 eine stark erhöhte Expression von RGS1, RGS16 und RGS20 in DCs bewirkten (Shi et al., 2004). Bauern-Kinder sind bekanntermaßen höheren Konzentrationen an Endotoxinen (LPS) ausgesetzt als Nicht-Bauernkinder. Somit sollten hohe Konzentrationen an LPS oder auch viraler doppelsträngiger RNA durch die Stimulation des TLR4 bzw. TLR3 eine Erhöhung der RGS1-Expression verursachen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da RGS1 bei den Bauernkindern im Allgemeinen niedriger exprimiert war. Allerdings wurden die Genexpressionsanalysen von Lee nach Stimulation mit TLR3 und TLR4 Liganden an isolierten unreifen DCs durchgeführt; hier wurde unstimuliertes Vollblut analysiert. Nur 0,2 bis 0,7% der im peripheren Blut vorhandenen Leukozyten sind DCs, im Nabelschnurblut ist der Anteil etwas höher (Szabolcs et al., 2003; Haller Hasskamp et al., 2005). Da RGS1 nicht nur in DCs, sondern auch in anderen Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird, kann man nicht beurteilen, welche Zellpopulation für die erniedrigte Expression bei den Bauern verantwortlich ist.

Außerdem ist bekannt, dass RGS1 und andere RGS-Vertreter die Migration von naiven und regulatorischen T-Zellen sowie von B-Zellen negativ regulieren können (Moratz et al., 2004; Agenes et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit war die RGS1-Expression bei den Bauern im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Im Anbetracht der eben besprochenen Ergebnisse zeigen T- und B-Zellen der Bauernkinder im Vergleich zu den Nicht-Bauernkindern

möglicherweise eine stärkere Antwort auf verschiedene Chemokine und eine verstärkte Wanderung in lymphoide Gewebe.

Mit dem heutigen Wissenstand ist eine Einschätzung der gefundenen Expressionsunterschiede von RGS1 im Nabelschnurblut nicht möglich.

### **Heterogenität der Schweiz im Vergleich zu den anderen Ländern**

Wie in vielen multizentrischen epidemiologischen Studien stellt die Heterogenität der Studienzentren auch in der PASTURE-Studie eine Herausforderung dar. Beispielsweise war in der PARSIFAL-Studie der Bauernstaus in Deutschland signifikant und invers mit der Entstehung von Asthma assoziiert; in den anderen teilnehmenden Ländern war dies nicht der Fall (Alfven et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde bei der Betrachtung der einzelnen Länder deutlich, dass sich die Genexpression der Schweizer Teilnehmer anders verhält als die der anderen Länder. In der Schweiz war der Median für die relative Expression von IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3 bei den Bauernkindern kleiner als bei den Nicht-Bauernkindern. Um eine mögliche Erklärung dafür zu finden, wurde die Studienpopulation auf verschiedene Charakteristika untersucht, getrennt nach der Schweiz und den anderen Ländern. Zunächst fiel die unterschiedliche Supplementation mit Mineral- oder Vitaminpräparaten während der Schwangerschaft auf: Signifikant mehr Schweizer Mütter als Mütter aus den anderen vier Ländern nahmen Multivitamin- und Magnesiumpräparate ein. Im Gegensatz dazu wurden in der Schweiz seltener Calcium-, Iodid-, Eisen-, Vitamin C- und Vitamin D-Präparate eingenommen. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf unterschiedliche Empfehlungen der Ärzte an die Schwangeren zurückzuführen, da die Ernährungsgesellschaften Deutschlands, Österreichs und der Schweiz einheitliche Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr haben.

Deutlich weniger Schweizerinnen nahmen während der Schwangerschaft Antibiotika ein.

Vergleicht man die Ernährung während der Schwangerschaft, so fällt auf, dass die Schweizer signifikant mehr Fleisch, Käse, Eier, Butter und Jogurt aus eigener Erzeugung (direkt vom eigenen Hof oder von einem anderen Hof) aßen. Demzufolge aßen sie auch signifikant weniger Käse, Jogurt, Margarine und Buttermilch, die sie im Lebensmittelgeschäft gekauft hatten. Auch der Anteil der Schwangeren, die Frischmilch direkt vom Bauernhof getrunken haben, ist bei den Schweizern signifikant höher.

Bei den Werten der spezifischen IgE-Antikörper im Nabelschnurblut fallen zwei signifikante Unterschiede auf: Mehr Kinder aus der Schweiz hatten ein erhöhtes IgE ( $\geq 0,2$  kU/l) gegen

Graspollen und Kuhmilch, jedoch konnte bei weniger Schweizer Kindern ein erhöhtes IgE gegen Haselnusspollen nachgewiesen werden.

In der Schweiz war in dieser Studienpopulation jeweils ein größerer Anteil der Frauen verheiratet und mehr Mütter hatten zwei oder mehr Geschwister als in anderen Ländern. Signifikant weniger Frauen waren erstgebärend, hatten jemals geraucht und besaßen eine mittlere oder hohe Schulbildung. Außerdem hatten weniger Frauen aus der Schweiz während der letzten 12 Monate Ekzeme oder eine laufende Nase, ohne dass eine Erkältung vorlag.

Auch bei den Vätern gab es signifikant weniger Schweizer, die in den letzten 12 Monaten eine laufende Nase hatten, die mindestens zwei Jahre lang regelmäßig morgendlichen Auswurf hatten oder die mindestens drei Monate des letzten Jahres Husten hatten.

Da die genannten Symptome von atopischen Erkrankungen bei Eltern aus der Schweiz weniger häufig auftraten, wurden wahrscheinlich auch signifikant weniger Allergie-vermeidende Maßnahmen vorgenommen, wie Haustiere abzuschaffen oder auf diese zu verzichten, auf Teppiche und andere Staubfänger zu verzichten oder milbendichte Matratzen zu kaufen.

Einen Überblick über alle signifikant unterschiedlichen Variablen gibt Tabelle 18 im Anhang. Inwiefern diese Unterschiede zwischen der Schweiz und den anderen Ländern für die veränderte Expression der hier untersuchten Gene verantwortlich sind, bleibt noch zu klären.

### **Ausblick**

Da es sich bei der PASTURE-Studie im Gegensatz zu den meisten bisher durchgeführten Bauernstudien um eine Längsschnittstudie handelt, hat man die Möglichkeit zu untersuchen, wie sich die Expression der hier untersuchten Gene in den späteren Lebensjahren der Kinder entwickelt. Es bleibt abzuwarten, ob sich die „Andersartigkeit“ der Schweizer Nabelschnurblutproben im Blut der einjährigen Kinder bestätigt. Bei den einjährigen Kindern kann man die im ersten Lebensjahr aufgetretenen Symptome atopischer Erkrankungen mit der Genexpression in Zusammenhang bringen und überprüfen, ob eine erhöhte Expression eines oder mehrerer der untersuchten Gene im Nabelschnurblut eventuell eine prädiktive Aussage für eine spätere Allergieentwicklung ermöglicht.

Da es sich bei regulatorischen Immunzellen um eine sehr heterogene Population handelt, wäre es interessant, die Zelltypen genauer zu identifizieren, in denen die Expression der untersuchten Gene erhöht ist.

## 7 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien zeigen, dass das Heranwachsen auf einem Bauernhof vor allergischer Sensibilisierung und der Entstehung atopischer Erkrankungen im Kindesalter schützt. Man vermutet, dass die Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten in frühester Kindheit bzw. pränatal eine entscheidende Rolle bei der Toleranzentwicklung gegenüber ubiquitär vorkommenden Allergenen haben könnte.

Derzeit wird die Theorie diskutiert, dass häufige mikrobielle Infektionen regulatorische T-Zell Antworten induzieren, die Th1- und Th2-assoziierte Immunantworten unterdrücken. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Moleküle, die mit regulatorischen Immunzellen assoziiert sind, bei den Bauernkindern höher exprimiert sein sollten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden mittels Real time RT-PCR Expressionsanalysen der Gene IDO, ILT3, ILT4, RGS1 und FOXP3 im Nabelschnurblut von 938 Kindern (446 Bauern- und 492 Nicht-Bauernkinder) durchgeführt. Die Blutproben wurden in fünf europäischen Ländern (Österreich, Schweiz, Deutschland, Frankreich und Finnland) im Rahmen der PASTURE-Studie gewonnen. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die komparative Ct-Methode verwendet.

In der Gesamtpopulation aller Länder zeigte sich beim Vergleich der relativen Genexpression, dass die inhibitorischen Ig-ähnlichen Rezeptoren ILT3 und ILT4 im Nabelschnurblut der Bauernkinder signifikant höher exprimiert waren. Es fiel auf, dass die Expression bei IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3 in allen Ländern mit Ausnahme der Schweiz bei den Bauern tendenziell höher war als bei den Nicht-Bauern. Wenn man die Ergebnisse in den Ländern ohne die Schweiz betrachtete, so ergab sich ein signifikanter Unterschied für IDO, ILT3, ILT4 und FOXP3. Die anfangs aufgestellte Hypothese bestätigte sich somit bei den nicht-adjustierten Daten in Deutschland, Österreich, Frankreich und Finnland.

Nach Dichotomisierung der Daten in das erste Quartil und die anderen Quartile wurden logistische Regressionsanalysen durchgeführt, bei denen für die jeweiligen, zuvor festgestellten Confounder adjustiert wurde. Dabei zeigte sich bei ILT4, dass in allen Ländern ohne die Schweiz vor allem die mütterliche Exposition gegenüber Bauernhoftieren sowie die im Stall verbrachte Zeit signifikant und positiv mit der ILT4-Expression assoziiert waren. Es scheint außerdem eine „Dosis-Wirkungs-Beziehung“ zwischen der Anzahl der Tierspezies, zu der die Mutter während der Schwangerschaft Kontakt hatte, und der Höhe der ILT4-Expression in Nabelschnurblut zu bestehen.

Interessanterweise bestand die Assoziation zwischen Farmerstatus und ILT4-Expression nicht, wenn man die Subgruppe der Mütter betrachtet, bei denen Asthma, Neurodermitis oder Heuschnupfen diagnostiziert wurde oder die jemals bzw. während der Schwangerschaft geraucht hatten.

Zusammengefasst weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass eine starke mikrobielle Exposition der Mutter während der Schwangerschaft zu einer erhöhten Expression von Genen, die mit der Funktion regulatorischer Immunzellen in Zusammenhang stehen, im Nabelschnurblut führt. Sie deuten auf einen starken mütterlichen Einfluss auf die Entwicklung von Toleranzmechanismen beim Kind *in utero* hin.

## 8 Anhang

Tabelle 18 Signifikante Unterschiede zwischen den Studienteilnehmern aus der Schweiz und den anderen Ländern

|                                                                             |                                                                         | Schweizer Teilnehmer<br>N (%) | Teilnehmer der anderen Länder<br>N (%) | p-Wert   |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|----------|
| Vitamin- und Mineralstoffsupplementation während der Schwangerschaft:       | Multivitaminpräparate                                                   | 135 (69)                      | 255 (35)                               | <0,001   |
|                                                                             | Vitamin C                                                               | 5 (3)                         | 62 (9)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Vitamin D                                                               | 3 (2)                         | 92 (13)                                | <0,001   |
|                                                                             | Iodid                                                                   | 2 (1)                         | 124 (17)                               | <0,001   |
|                                                                             | Magnesium                                                               | 123 (62)                      | 308 (42)                               | <0,001   |
|                                                                             | Calcium                                                                 | 12 (6)                        | 108 (15)                               | <0,001   |
|                                                                             | Eisen                                                                   | 95 (48)                       | 421 (58)                               | <0,05    |
| Exposition während der Schwangerschaft:                                     | Hund im Haus                                                            | 14 (7)                        | 133 (18)                               | <0,001   |
|                                                                             | Hund im Schlafzimmer                                                    | 2 (1)                         | 49 (7)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Katze im Haus                                                           | 30 (15)                       | 165 (23)                               | <0,05    |
|                                                                             | Feuchtigkeitsflecken/Schimmel in der Wohnung während des letzten Jahres | 32 (16)                       | 189 (26)                               | <0,001   |
|                                                                             | Aufenthalt in der Scheune                                               | 97 (52)                       | 290 (42)                               | <0,05    |
|                                                                             | Kontakt zu Schweinen mind. mehrmals pro Woche                           | 26 (13)                       | 53 (7)                                 | <0,05    |
|                                                                             | Kontakt zu Hasen mind. mehrmals pro Woche                               | 41 (21)                       | 104 (15)                               | <0,05    |
| Medikamente bzw. Erkrankungen während der Schwangerschaft:                  | Antibiotika im 1., 2. oder 3. Trimenon                                  | 29 (15)                       | 182 (25)                               | <0,001   |
|                                                                             | Medikamente zur Lungenreifung vor der Geburt                            | 10 (5)                        | 10 (1)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Atemwegserkrankung mit Fieber während der Schwangerschaft               | 13 (7)                        | 84 (11)                                | <0,05    |
|                                                                             | vor Geburt im Krankenhaus aufgrund vorzeitiger Wehen/Blutungen          | 20 (10)                       | 40 (6)                                 | <0,05    |
|                                                                             | Ödeme während der Schwangerschaft                                       | 66 (34)                       | 303 (42)                               | <0,05    |
| Medikamente bzw. Erkrankungen des Neugeborenen:                             | Gelbsucht innerhalb der ersten Lebenswoche                              | 43 (22)                       | 227 (31)                               | <0,05    |
|                                                                             | Antibiotika innerhalb der ersten Lebenswoche                            | 1 (1)                         | 27 (4)                                 | <0,05    |
|                                                                             | Diarrhoe innerhalb der ersten Lebenswoche                               | 0 (0)                         | 16 (2)                                 | <0,05    |
| Erzeugnisse vom eigenen oder einem anderen Hof während der Schwangerschaft: | Käse                                                                    | 50 (25)                       | 47 (6)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Jogurt                                                                  | 33 (17)                       | 23 (3)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Dickmilch                                                               | 2 (1)                         | 65 (9)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Eier                                                                    | 114 (58)                      | 305 (41)                               | <0,001   |
|                                                                             | gekochtes Obst/Beeren                                                   | 38 (19)                       | 293 (40)                               | <0,001   |
|                                                                             | gefrorenes Obst/Beeren                                                  | 21 (11)                       | 143 (20)                               | <0,001   |
|                                                                             | Butter                                                                  | 32 (16)                       | 35 (5)                                 | <0,001   |
|                                                                             | Fleisch                                                                 | 101 (51)                      | 297 (40)                               | <0,001   |
|                                                                             | Kartoffeln                                                              | 72 (37)                       | 350 (48)                               | <0,001   |
|                                                                             | gefrorenes Gemüse                                                       | 54 (27)                       | 123 (18)                               | <0,001   |
|                                                                             | Frischmilch vom Bauernhof                                               | 102 (52)                      | 303 (41)                               | <0,001   |
|                                                                             | Nahrungsmittel aus dem Lebensmittelgeschäft:                            | Käse                          | 135 (69)                               | 648 (88) |
| Margarine                                                                   |                                                                         | 37 (19)                       | 274 (39)                               | <0,001   |
| Buttermilch                                                                 |                                                                         | 3 (2)                         | 64 (9)                                 | <0,001   |
| Jogurt                                                                      |                                                                         | 155 (79)                      | 656 (89)                               | <0,001   |
| Quark                                                                       |                                                                         | 35 (18)                       | 199 (27)                               | <0,001   |

|                                                                        |                                                                                                   |                                                |          |          |        |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|----------|--------|
| Mutter:                                                                | verheiratet                                                                                       | 183 (93)                                       | 514 (70) | <0,001   |        |
|                                                                        | erstgebärend                                                                                      | 48 (24)                                        | 237 (32) | <0,05    |        |
|                                                                        | 2 oder mehr Geschwister                                                                           | 163 (83)                                       | 456 (62) | <0,001   |        |
|                                                                        | jemals geraucht                                                                                   | 45 (23)                                        | 312 (42) | <0,001   |        |
|                                                                        | Realschulabschluss oder höherer Schulabschluss                                                    | 142 (72)                                       | 633 (86) | <0,001   |        |
|                                                                        | Nationalität des jeweiligen Studienzentrums                                                       | 181 (92)                                       | 718 (98) | <0,001   |        |
|                                                                        | Ekzeme jemals                                                                                     | 30 (15)                                        | 185 (25) | <0,001   |        |
|                                                                        | Ekzeme in den letzten 12 Monaten                                                                  | 12 (6)                                         | 98 (13)  | <0,001   |        |
|                                                                        | laufende Nase ohne Erkältung in den letzten 12 Monaten                                            | 69 (35)                                        | 317 (43) | <0,05    |        |
|                                                                        | zwischen dem 10. und 18. Lebensjahr beim Heuen geholfen                                           | 147 (75)                                       | 478 (65) | <0,05    |        |
|                                                                        | Auf dem Hof, auf dem Mutter als Kind lebte, wurden andere Tiere außer Kühe oder Schweine gehalten | 1 (1)                                          | 34 (5)   | <0,001   |        |
|                                                                        | Vater:                                                                                            | Realschulabschluss oder höherer Schulabschluss | 104 (55) | 529 (75) | <0,001 |
| Nationalität des jeweiligen Studienzentrums                            |                                                                                                   | 178 (93)                                       | 706 (99) | <0,001   |        |
| 2 oder mehr Geschwister                                                |                                                                                                   | 158 (82)                                       | 483 (68) | <0,001   |        |
| Schweine auf dem Bauernhof, auf dem Vater als Kind lebte               |                                                                                                   | 25 (13)                                        | 32 (5)   | <0,001   |        |
| jemals geraucht                                                        |                                                                                                   | 77 (40)                                        | 400 (56) | <0,001   |        |
| Auswurf an d. meisten Tagen mind. 3 Monate pro Jahr                    |                                                                                                   | 8 (4)                                          | 88 (12)  | <0,001   |        |
| Husten an d. meisten Tagen mind. 3 Monate pro Jahr mind. 2 Jahre lang  |                                                                                                   | 4 (2)                                          | 60 (9)   | <0,001   |        |
| Auswurf an d. meisten Tagen mind. 3 Monate pro Jahr mind. 2 Jahre lang |                                                                                                   | 7 (4)                                          | 73 (10)  | <0,001   |        |
| Husten an d. meisten Tagen mind. 3 Monate pro Jahr                     |                                                                                                   | 7 (4)                                          | 68 (10)  | <0,001   |        |
| laufende Nase in den letzten 12 Monaten ohne Erkältung                 |                                                                                                   | 56 (29)                                        | 286 (40) | <0,001   |        |
| COPD                                                                   |                                                                                                   | 3 (2)                                          | 36 (5)   | <0,05    |        |
| Katze während des ersten Lebensjahres des Vaters                       |                                                                                                   | 117 (63)                                       | 366 (54) | <0,05    |        |
| Allergievermeidende Maßnahmen/Veränderungen im Kinderzimmer:           |                                                                                                   | Allergievermeidende Maßnahmen                  | 17 (9)   | 143 (19) | <0,001 |
|                                                                        |                                                                                                   | Verzicht auf Teppiche                          | 10 (5)   | 96 (13)  | <0,001 |
|                                                                        | milbendichte Matratzen/Betten                                                                     | 4 (2)                                          | 55 (8)   | <0,001   |        |
|                                                                        | Haustiere vermieden/abgeschafft                                                                   | 8 (4)                                          | 74 (10)  | <0,001   |        |
|                                                                        | neuer Teppich im Kinderzimmer während des letzten Jahres                                          | 10 (5)                                         | 9 (1)    | <0,001   |        |
|                                                                        | neue Tapete im Kinderzimmer                                                                       | 3 (2)                                          | 49 (7)   | <0,001   |        |
| IgE im Nabelschnurblut:                                                | Gras IgE                                                                                          | 16 (8)                                         | 20 (3)   | <0,001   |        |
|                                                                        | Kuhmilch IgE                                                                                      | 25 (13)                                        | 46 (6)   | <0,001   |        |
|                                                                        | Haselnusspollen IgE                                                                               | 1 (1)                                          | 32 (4)   | <0,001   |        |
| Sonstiges:                                                             | Entfernung zum nächsten Haus höchstens 100 Meter                                                  | 31 (16)                                        | 165 (23) | <0,001   |        |
|                                                                        | Felder in der Nähe werden regelmäßig geodelt                                                      | 175 (89)                                       | 553 (76) | <0,001   |        |
|                                                                        | Komposthaufen auf dem Grundstück                                                                  | 136 (69)                                       | 241 (33) | <0,001   |        |

N: absolute Anzahl, %: Anteil der Teilnehmer aus der Schweiz bzw. den anderen Ländern in %; p-Wert des Chi<sup>2</sup>-Test

Tabelle 19 Charakterisierung der Studienpopulation: Mütter mit Nabelschnurblut RNA-Proben

|                                  | Nicht-Farmer |               | Farmer |               | p-Wert*<br>nur RNA | p-Wert*<br>Gesamtpop. |
|----------------------------------|--------------|---------------|--------|---------------|--------------------|-----------------------|
|                                  | n/N          | %             | n/N    | %             |                    |                       |
| <b>Alter der Mutter</b>          |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
| 18-25                            | 78           | 15,9          | 59     | 13,2          | <b>0,025</b>       | <b>0,013</b>          |
| 26-35                            | 361          | 73,4          | 310    | 69,5          |                    |                       |
| 35-45                            | 53           | 10,8          | 76     | 17,0          |                    |                       |
| über 45                          | 0            | 0,0           | 1      | 0,2           |                    |                       |
| <b>BMI der Mutter</b>            |              |               |        |               |                    |                       |
| Median (Min-Max)                 | 22,4         | (16,1 - 43,5) | 23,3   | (16,1 - 48,3) | <b>&lt;0,001</b>   | <b>&lt;0,001</b>      |
| <b>Gestationsalter (SSW)</b>     |              |               |        |               |                    |                       |
| Median (Min-Max)                 | 40,0         | (37 - 43)     | 40,0   | (37 - 43)     | 0,460              | 0,729                 |
| <b>Schulabschluss</b>            |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
| keiner                           | 4            | 0,8           | 7      | 1,6           | <b>0,008</b>       | <b>0,001</b>          |
| Hauptschule                      | 68           | 13,8          | 90     | 20,2          |                    |                       |
| Realschule                       | 202          | 41,1          | 192    | 43,0          |                    |                       |
| (Fach)Abitur/Hochsch.            | 218          | 44,3          | 157    | 35,2          |                    |                       |
| <b>Asthma</b>                    |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
|                                  | 51           | 10,4          | 32     | 7,2           | 0,086              | 0,080                 |
| <b>Diagnose Asthma</b>           |              |               |        |               |                    |                       |
| n=936                            | 491          |               | 445    |               |                    |                       |
| fehlend: 2                       | 45           | 9,2           | 28     | 6,3           | 0,102              | 0,091                 |
| <b>Allergische Rhinitis</b>      |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
|                                  | 157          | 31,9          | 90     | 20,2          | <b>&lt;0,001</b>   | <b>&lt;0,001</b>      |
| <b>Diagnose allerg. Rhinitis</b> |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
|                                  | 103          | 20,9          | 59     | 12,0          | <b>0,002</b>       | <b>&lt;0,001</b>      |
| <b>Neurodermitis</b>             |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
|                                  | 48           | 9,8           | 33     | 7,4           | 0,199              | 0,305                 |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>    |              |               |        |               |                    |                       |
| n=938                            | 492          |               | 446    |               |                    |                       |
|                                  | 45           | 9,1           | 30     | 6,7           | 0,172              | 0,367                 |

## Fortsetzung von Tabelle 19

|                                                |     |      |     |      |        |        |
|------------------------------------------------|-----|------|-----|------|--------|--------|
| <b>Mutter arbeitet aktiv auf dem Bauernhof</b> |     |      |     |      |        |        |
| n=937                                          | 492 |      | 445 |      | <0,001 | <0,001 |
| fehlend: 1                                     | 1   | 0,2  | 344 | 77,3 |        |        |
| <b>Rauchen während der Schwangerschaft</b>     |     |      |     |      |        |        |
| n=938                                          | 492 |      | 446 |      |        |        |
|                                                | 34  | 6,9  | 24  | 5,4  | 0,331  | 0,624  |
| <b>Frischmilch während der Schwangerschaft</b> |     |      |     |      |        |        |
| n=938                                          | 492 |      | 446 |      |        |        |
|                                                | 76  | 15,4 | 345 | 77,4 | <0,001 | <0,001 |
| <b>Wird die Milch abgekocht?</b>               |     |      |     |      |        |        |
| n=937                                          | 492 |      | 445 |      | <0,001 | <0,001 |
| ja, im Sommer                                  | 1   | 0,2  | 9   | 2,0  |        |        |
| ja, immer                                      | 21  | 4,3  | 78  | 17,5 |        |        |
| nein                                           | 470 | 95,5 | 358 | 80,4 |        |        |
| <b>Haustiere</b>                               |     |      |     |      |        |        |
| n=938                                          | 492 |      | 446 |      |        |        |
|                                                | 227 | 46,1 | 369 | 82,7 | <0,001 | <0,001 |
| <b>Katzen</b>                                  |     |      |     |      |        |        |
| n=937                                          | 492 |      | 445 |      | <0,001 | <0,001 |
| fehlend: 1                                     | 116 | 23,6 | 306 | 62,2 |        |        |
| <b>Hunde</b>                                   |     |      |     |      |        |        |
| n=935                                          | 491 |      | 444 |      | <0,001 | 0,005  |
| fehlend: 3                                     | 94  | 19,1 | 207 | 46,6 |        |        |

\*Chi-Quadrat-Test bei nominal- bzw. ordinalskalierten Daten, Mann-Whitney-U-Test bei metrischen Daten

**Tabelle 20 Charakterisierung der Studienpopulation: Väter von Kindern mit Nabelschnurblut RNA-Proben**

|                                            | Nicht-Farmer |      | Farmer |      | p-Wert*          | p-Wert*          |
|--------------------------------------------|--------------|------|--------|------|------------------|------------------|
|                                            | n/N          | %    | n/N    | %    | nur RNA          | Gesamtpop.       |
| <b>Alter des Vaters</b>                    |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      |                  |                  |
| bis 25                                     | 36           | 7,6  | 17     | 3,9  | <b>0,018</b>     | <b>0,006</b>     |
| 26 - 35                                    | 288          | 60,6 | 252    | 57,3 |                  |                  |
| über 35                                    | 151          | 31,8 | 171    | 38,9 |                  |                  |
| <b>Asthma</b>                              |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      |                  |                  |
|                                            | 36           | 7,6  | 24     | 24,0 | 0,195            | 0,150            |
| <b>Diagnose Asthma</b>                     |              |      |        |      |                  |                  |
| n=912                                      | 473          |      | 439    |      | 0,133            | 0,235            |
| fehlend: 3                                 | 28           | 5,9  | 22     | 5,0  |                  |                  |
| <b>Allergische Rhinitis</b>                |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      |                  |                  |
|                                            | 158          | 33,3 | 73     | 16,6 | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Diagnose allerg. Rhinitis</b>           |              |      |        |      |                  |                  |
| n=914                                      | 475          |      | 439    |      | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| fehlend: 1                                 | 97           | 20,4 | 27     | 6,2  |                  |                  |
| <b>Neurodermitis</b>                       |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      |                  |                  |
|                                            | 42           | 8,8  | 35     | 8,0  | 0,629            | 0,839            |
| <b>Diagnose Neurodermitis</b>              |              |      |        |      |                  |                  |
| n=913                                      | 474          |      | 439    |      |                  |                  |
| fehlend: 2                                 | 27           | 5,7  | 29     | 6,6  | 0,054            | 0,187            |
| <b>Leben auf Bauernhof mit Viehhaltung</b> |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      |                  |                  |
|                                            | 4            | 0,8  | 422    | 95,9 | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Vater aktiv auf Bauernhof</b>           |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      |                  |                  |
|                                            | 1            | 0,2  | 403    | 91,6 | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Rauchen</b>                             |              |      |        |      |                  |                  |
| n=913                                      | 474          |      | 439    |      | 0,159            | 0,569            |
| fehlend: 2                                 | 132          | 27,8 | 110    | 25,1 |                  |                  |
| <b>Schulabschluss</b>                      |              |      |        |      |                  |                  |
| n=915                                      | 475          |      | 440    |      | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| kein                                       | 27           | 5,7  | 13     | 3,0  |                  |                  |
| Hauptschule                                | 89           | 18,7 | 139    | 31,6 |                  |                  |
| Realschule                                 | 182          | 38,3 | 186    | 42,3 |                  |                  |
| (Fach-)Abitur/Hochs.                       | 174          | 36,6 | 95     | 21,6 |                  |                  |
| Sonstige                                   | 3            | 0,6  | 7      | 1,6  |                  |                  |

Tabelle 21 Charakterisierung der Studienpopulation: Kinder mit Nabelschnurblut RNA-Proben

|                                                     | Nicht-Farmer       |      | Farmer             |      | p-Wert*<br>nur RNA | p-Wert*<br>Gesamtpop. |
|-----------------------------------------------------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|-----------------------|
|                                                     | n/N                | %    | n/N                | %    |                    |                       |
| <b>Geschlecht</b>                                   |                    |      |                    |      |                    |                       |
| n=927                                               | 484                |      | 443                |      |                    |                       |
| Junge                                               | 246                | 50,8 | 223                | 50,3 | 0,882              | 0,988                 |
| Mädchen                                             | 238                | 49,2 | 220                | 49,7 |                    |                       |
| <b>Anzahl der Geschwister</b>                       |                    |      |                    |      |                    |                       |
| n=938                                               | 492                |      | 446                |      |                    |                       |
| keine                                               | 214                | 43,5 | 114                | 25,6 | <0,001             | <0,001                |
| 1                                                   | 170                | 34,6 | 119                | 26,7 |                    |                       |
| 2                                                   | 83                 | 16,9 | 139                | 31,2 |                    |                       |
| 3 und mehr                                          | 25                 | 5,1  | 74                 | 16,6 |                    |                       |
| <b>Entbindung</b>                                   |                    |      |                    |      |                    |                       |
| n=927                                               | 484                |      | 443                |      |                    |                       |
| stationär                                           | 467                | 96,5 | 437                | 98,6 | 0,035              | 0,029                 |
| ambulant                                            | 17                 | 3,5  | 6                  | 1,4  |                    |                       |
| <b>Geburtsmodus</b>                                 |                    |      |                    |      |                    |                       |
| n=920                                               | 480                |      | 440                |      | 0,384              | 0,087                 |
| spontan                                             | 375                | 78,1 | 359                | 81,6 |                    |                       |
| vaginale Op.                                        | 25                 | 5,2  | 17                 | 3,9  |                    |                       |
| Sectio                                              | 80                 | 16,7 | 64                 | 14,5 |                    |                       |
| <b>Wurde jemals gestillt?</b>                       |                    |      |                    |      |                    |                       |
| n=927                                               | 484                |      | 443                |      |                    |                       |
| ja                                                  | 448                | 92,6 | 403                | 91,0 | 0,378              | 0,415                 |
| nein                                                | 36                 | 7,4  | 40                 | 9,0  |                    |                       |
| <b>Wird zur Zeit gestillt? (Alter ca. 2 Monate)</b> |                    |      |                    |      |                    |                       |
| n=926                                               | 483                |      | 443                |      | 0,209              | 0,082                 |
| ausschließlich                                      | 296                | 61,3 | 258                | 58,2 |                    |                       |
| nicht ausschließlich                                | 61                 | 12,6 | 74                 | 16,7 |                    |                       |
| nein                                                | 126                | 26,1 | 111                | 25,1 |                    |                       |
| <b>Geburtsgewicht (g)</b>                           |                    |      |                    |      |                    |                       |
| Median (Min-Max)                                    | 3450 (1990 - 5450) |      | 3545 (1900 - 5100) |      | <0,001             | <0,001                |

\*Chi-Quadrat-Test bei nominal- bzw. ordinalskalierten Daten, Mann-Whitney-U-Test bei metrischen Daten

## 9 Literaturverzeichnis

- Agenes F, Bosco N, Mascarell L, Fritah S, Ceredig R (2005) Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4<sup>+</sup> naive and regulatory T cells. *Immunology* 115:179-188.
- Alfven T, Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, von Mutius E, Riedler J, Scheynius A, van Hage M, Wickman M, Benz MR, Budde J, Michels KB, Schram D, Ublagger E, Waser M, Pershagen G (2006) Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. *Allergy* 61:414-421.
- Amoudruz P, Holmlund U, Malmstrom V, Trollmo C, Bremme K, Scheynius A, Sverre-remark-Ekstrom E (2005) Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy? *J Allergy Clin Immunol* 115:1304-1310.
- Anyo G, Brunekreef B, de Meer G, Aarts F, Janssen NA, van Vliet P (2002) Early, current and past pet ownership: associations with sensitization, bronchial responsiveness and allergic symptoms in school children. *Clin Exp Allergy* 32:361-366.
- Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368:733-743.
- Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al. (1995) International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 8:483-491.
- Babcock TA, Carlin JM (2000) Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 12:588-594.
- Bach JF (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347:911-920.
- Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 59:566-573.
- Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J (2003) Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 111:862-868.
- Biosystems A (2001) User Bulletin No.2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System. Foster City, CA.
- Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wuthrich B (1999) Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 29:28-34.
- Brown D, Trowsdale J, Allen R (2004) The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64:215-225.
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.

- Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T, Kinet JP, Long EO (1996) Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 4:77-85.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193.
- Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J (2003) Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197:403-411.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8790-8794.
- Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI (1989) Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 45:29-34.
- Carlsson P, Mahlapuu M (2002) Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250:1-23.
- Cavani A, Nasorri F, Ottaviani C, Sebastiani S, De Pita O, Girolomoni G (2003) Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol* 171:5760-5768.
- Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciufoca N (2002) Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3:237-243.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
- Coffer PJ, Burgering BM (2004) Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:889-899.
- Colonna M, Nakajima H, Cella M (2000) A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Semin Immunol* 12:121-127.
- Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML (1997) A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7:273-282.
- Daheshia M, Friend DS, Grusby MJ, Austen KF, Katz HR (2001) Increased severity of local and systemic anaphylactic reactions in gp49B1-deficient mice. *J Exp Med* 194:227-234.
- Dai W, Gupta SL (1990) Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon-gamma-inducible indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1-8.
- Daley-Yates PT, Powell AP, Smith LL (1988) Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 96:222-232.
- De Vries L, Mousli M, Wurmser A, Farquhar MG (1995) GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11916-11920.
- Denecke B, Meyerdierks A, Bottger EC (1999) RGS1 is expressed in monocytes and acts as a GTPase-activating protein for G-protein-coupled chemoattractant receptors. *J Biol Chem* 274:26860-26868.
- Dodge RR, Burrows B (1980) The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 122:567-575.

- Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR, Weiss G, Nyberg F, van Hage M, Pershagen G, Brunekreef B, Riedler J, Lauener R, Braun-Fahrlander C, von Mutius E (2007) Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* 119:1140-1147.
- Ernst P, Cormier Y (2000) Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1563-1566.
- Ferris BG (1978) Epidemiology Standardization Project (American Thoracic Society). *Am Rev Respir Dis* 118:1-120.
- Fry AM, Lanier LL, Weiss A (1996) Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184:295-300.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995-1001.
- Gleissner CA, Zastrow A, Klingenberg R, Kluger MS, Konstandin M, Celik S, Haemmerling S, Shankar V, Giese T, Katus HA, Dengler TJ (2007) IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 37:177-192.
- Grindebacke H, Wing K, Andersson AC, Suri-Payer E, Rak S, Rudin A (2004) Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 34:1364-1372.
- Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24:242-248.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
- Haller Hasskamp J, Zapas JL, Elias EG (2005) Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults. *Am J Hematol* 78:314-315.
- Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, Griese M, Krauss-Etschmann S (2007) Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119:1258-1266.
- Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E (2004) Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 114:270-279.
- Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, Van Uden JH, Kornbluth RS, Baird SM, Taylor MW, Carson DA, Catanzaro A, Raz E (2001) Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 69:6156-6164.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986-994.
- Heinzmann A, Blattmann S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (2000) Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. *Eur J Immunogenet* 27:121-127.
- Higuchi K, Hayaishi O (1967) Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. *Arch Biochem Biophys* 120:397-403.
- Hissong BD, Byrne GI, Padilla ML, Carlin JM (1995) Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1. *Cell Immunol* 160:264-269.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280.

- Holscher B, Frye C, Wichmann HE, Heinrich J (2002) Exposure to pets and allergies in children. *Pediatr Allergy Immunol* 13:334-341.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U (2001) Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *Bmj* 322:390-395.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jean-Baptiste G, Yang Z, Greenwood MT (2006) Regulatory mechanisms involved in modulating RGS function. *Cell Mol Life Sci* 63:1969-1985.
- Karge WH, 3rd, Schaefer EJ, Ordovas JM (1998) Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. *Methods Mol Biol* 110:43-61.
- Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P (2004) Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 199:1679-1688.
- Khatti R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.
- Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M (2000) Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 30:201-208.
- Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE (1999) Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 353:450-454.
- Lau S, Illi S, Platts-Mills TA, Ripoza D, Nickel R, Gruber C, Niggemann B, Wahn U (2005) Longitudinal study on the relationship between cat allergen and endotoxin exposure, sensitization, cat-specific IgG and development of asthma in childhood--report of the German Multicentre Allergy Study (MAS 90). *Allergy* 60:766-773.
- Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufe A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M, Sennhauser FH (2002) Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 360:465-466.
- Lee JH, Yu HH, Wang LC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL (2007) The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Clin Exp Immunol* 148:53-63.
- Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS (2004) Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608-615.
- Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR (1998) Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 158:176-181.
- Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciuc-Foca N (1998) Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* 10:775-783.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-362.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
- Lu-Kuo JM, Joyal DM, Austen KF, Katz HR (1999) gp49B1 inhibits IgE-initiated mast cell activation through both immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, recruitment

- of src homology 2 domain-containing phosphatase-1, and suppression of early and late calcium mobilization. *J Biol Chem* 274:5791-5796.
- Macian F, Im SH, Garcia-Cozar FJ, Rao A (2004) T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* 16:209-216.
- Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yamilina A, Cortesini R, Mancini D, Suci-Foca N (2003) High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 11:245-258.
- Martin AM, Kulski JK, Witt C, Pontarotti P, Christiansen FT (2002) Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends Immunol* 23:81-88.
- Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ (1995) Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 332:133-138.
- Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, Bonini S (2000) Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Bmj* 320:412-417.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
- Mellor AL, Munn DH (2001) Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression. *Semin Immunol* 13:213-218.
- Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762-774.
- Mellor AL, Baban B, Chandler P, Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M, Munn DH (2003) Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 171:1652-1655.
- Moffett JR, Namboodiri MA (2003) Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 81:247-265.
- Moratz C, Hayman JR, Gu H, Kehrl JH (2004) Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in *Rgs1*<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol* 24:5767-5775.
- Moratz C, Kang VH, Druey KM, Shi CS, Scheschonka A, Murphy PM, Kozasa T, Kehrl JH (2000) Regulator of G protein signaling 1 (RGS1) markedly impairs Gi alpha signaling responses of B lymphocytes. *J Immunol* 164:1829-1838.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193.
- Neaville WA, Tisler C, Bhattacharya A, Anklam K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Adler K, Dasilva DF, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Anderson E, Yoshihara D, Gangnon R, Mikus LD, Rosenthal LA, Gern JE, Lemanske RF, Jr. (2003) Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 112:740-746.
- Nickel R, Illi S, Lau S, Sommerfeld C, Bergmann R, Kamin W, Forster J, Schuster A, Niggemann B, Wahn U (2005) Variability of total serum immunoglobulin E levels from birth to the age of 10 years. A prospective evaluation in a large birth cohort (German Multicenter Allergy Study). *Clin Exp Allergy* 35:619-623.
- Noakes PS, Hale J, Thomas R, Lane C, Devadason SG, Prescott SL (2006) Maternal smoking is associated with impaired neonatal toll-like-receptor-mediated immune responses. *Eur Respir J* 28:721-729.
- Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S (2007) Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689.

- Ovstebo R, Lande K, Kierulf P, Haug KB (2007) Quantification of relative changes in specific mRNAs from frozen whole blood - methodological considerations and clinical implications. *Clin Chem Lab Med* 45:171-176.
- Pachlopnik Schmid JM, Kuehni CE, Strippoli MP, Roiha HL, Pavlovic R, Latzin P, Gallati S, Kraemer R, Dahinden C, Frey U (2007) Maternal tobacco smoking and decreased leukocytes, including dendritic cells, in neonates. *Pediatr Res* 61:462-466.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Prescott SL, King B, Strong TL, Holt PG (2003) The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy* 58:1187-1194.
- Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG (1999) Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353:196-200.
- Raghupathy R (2001) Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 13:219-227.
- Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem* 48:1883-1890.
- Raitala A, Karjalainen J, Oja SS, Kosunen TU, Hurme M (2006) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity is lower in atopic than in non-atopic individuals and is enhanced by environmental factors protecting from atopy. *Mol Immunol* 43:1054-1056.
- Reif K, Cyster JG (2000) RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines. *J Immunol* 164:4720-4729.
- Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV (1998) Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 245:933-938.
- Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M (2000) Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 30:194-200.
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E (2001) Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358:1129-1133.
- Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM (2003) Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 23:413-421.
- Romagnani S (2004) Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113:395-400.
- Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Schaub B, Campo M, He H, Perkins D, Gillman MW, Gold DR, Weiss S, Lieberman E, Finn PW (2006) Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. *Respir Res* 7:40.
- Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A (1996) Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 347:1792-1796.
- Shi GX, Harrison K, Han SB, Moratz C, Kehrl JH (2004) Toll-like receptor signaling alters the expression of regulator of G protein signaling proteins in dendritic cells: implications for G protein-coupled receptor signaling. *J Immunol* 172:5175-5184.
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 299:1259-1260.

- Strachan DP, Wong HJ, Spector TD (2001) Concordance and interrelationship of atopic diseases and markers of allergic sensitization among adult female twins. *J Allergy Clin Immunol* 108:901-907.
- Suciu-Foca N, Manavalan JS, Cortesini R (2003) Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol* 11:235-244.
- Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y (2006) Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2611-2616.
- Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J (2003) Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* 21:296-303.
- Szefalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R, Herkner K, Urbanek R (1997) Prenatal allergen contact with milk proteins. *Clin Exp Allergy* 27:28-35.
- Taams LS, Vukmanovic-Stejić M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JW, Lafeber FP, Salmon M, Akbar AN (2002) Antigen-specific T cell suppression by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 32:1621-1630.
- Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196:447-457.
- Theillin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75:291-295.
- Tulic MK, Fiset PO, Manoukian JJ, Frenkiel S, Lavigne F, Eidelman DH, Hamid Q (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.
- Ujike A, Takeda K, Nakamura A, Ebihara S, Akiyama K, Takai T (2002) Impaired dendritic cell maturation and increased T(H)<sub>2</sub> responses in PIR-B(-/-) mice. *Nat Immunol* 3:542-548.
- van Dongen MJ, Cederberg A, Carlsson P, Enerback S, Wikstrom M (2000) Solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the adipocyte-transcription factor FREAC-11. *J Mol Biol* 296:351-359.
- Van Duren-Schmidt K, Pichler J, Ebner C, Bartmann P, Forster E, Urbanek R, Szefalusi Z (1997) Prenatal contact with inhalant allergens. *Pediatr Res* 41:128-131.
- von Bubnoff D, Fimmers R, Bogdanow M, Matz H, Koch S, Bieber T (2004) Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure. *Clin Exp Allergy* 34:1056-1063.
- von Bubnoff D, Matz H, Frahnert C, Rao ML, Hanau D, de la Salle H, Bieber T (2002) FcεRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J Immunol* 169:1810-1816.
- von Mutius E, Schmid S (2006) The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 61:407-413.
- von Mutius E, Fritzsche C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H (1992) Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *Bmj* 305:1395-1399.
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 37:129-138.

- Waser M, von Mutius E, Riedler J, Nowak D, Maisch S, Carr D, Eder W, Tebow G, Schierl R, Schreuer M, Braun-Fahrlander C (2005) Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy* 60:177-184.
- Waser M, Michels KB, Bieli C, Floistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrlander C (2007) Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37:661-670.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14:353-356.
- Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A (1999) Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome* 10:154-160.
- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1:69-75.
- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
- Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1643-1656.
- Yamamoto S, Hayaishi O (1967) Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem* 242:5260-5266.
- Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296:490-494.
- Zhou JS, Friend DS, Feldweg AM, Daheshia M, Li L, Austen KF, Katz HR (2003) Prevention of lipopolysaccharide-induced microangiopathy by gp49B1: evidence for an important role for gp49B1 expression on neutrophils. *J Exp Med* 198:1243-1251.
- Ziegler SF (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 24:209-226.

## 10 Danksagung

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Frau Prof. Erika von Mutius, dass ich meine Promotion im Rahmen der PASTURE-Studie durchführen konnte sowie für Möglichkeit, an den spannenden Studientreffen teilzunehmen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann für die Idee zu dieser Arbeit und ihre tatkräftige Unterstützung und konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung der Dissertation.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Sabina Illi aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. von Mutius bedanken, die mich bei der statistischen Auswertung der Daten anleitete und mir viele wertvolle Ratschläge gab.

Herrn Prof. Roger Lauener sowie seinen Mitarbeitern Johanna Steinle, Dr. Dirk Steinhoff und Susanne Loeliger von der Allergologie der Universitäts-Kinderklinik in Zürich gilt mein besonderer Dank für die Überlassung der Rohdaten und dafür, die Real-time RT-PCR in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei Anastasia, Rania, Sylvia, Anke, Thomas und allen anderen Laborkollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Besonders danke ich Rania für die verständnisvollen, aufmunternden Gespräche und die Einarbeitung in SPSS. Sylvia danke ich für die gute und nette Zusammenarbeit. Die Studienorganisation war zu zweit viel einfacher zu bewältigen.

Gaby Heilig danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der Real time RT-PCR.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund Stylianos für ihre kontinuierliche Geduld und liebevolle Unterstützung bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum 30.05.1975  
 Geburtsort München  
 Staatsangehörigkeit deutsch  
 Familienstand ledig  
 Adresse Fasanenweg 11c  
 82110 Germering

### Schulbildung

1981 - 1985 Grundschule am Niederbronnerweg Fürstenfeldbruck  
 1985 - 1994 Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck

### Studium

1994 -1999 Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität  
 München  
 12/2000 Approbation als Apothekerin

### Praktisches Jahr

11/1999 - 04/2000 1. Halbjahr der praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der  
 medizinisch-wissenschaftlichen Abteilung der Firma Hexal in  
 Holzkirchen  
 05/2000 - 10/2000 2. Halbjahr der praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der  
 Isartor Apotheke in München

### Berufserfahrung

02/2001 - 07/2001 Apothekerin in der Abteilung Medizinische Wissenschaft der  
 Firma Hermes Arzneimittel  
 10/2001 - 11/2006 Clinical Research Associate in der Abteilung Klinische  
 Forschung der Firma Astellas Pharma, vormals Fujisawa  
 Deutschland  
 01/2004 - 05/2007 Promotion im Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen  
 Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München  
 in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann  
 Seit 06/2007 Clinical Site Manager bei Bristol-Myers Squibb in München