

Aus dem Forschungszentrum Borstel

Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Laborgruppe Angeborene Immunität (PD Dr. Holger Heine)

Abteilung Immunologie und Zellbiologie

(Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

**MÖGLICHE MECHANISMEN DER ALLERGIEPRÄVENTION:
DENDRITISCHE ZELLEN ALS REGULATOREN DER DURCH STALL-
BAKTERIEN AUSGELÖSTEN ALLERGIEPROTEKTIVEN IMMUNANTWORT**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrecht-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

JENNIFER DEBARRY

Kiel
2007

Referent/in:	...PD Dr. Holger Heine.....
Korreferent/in:	...Prof. Dr. Thomas Roeder.....
Tag der mündlichen Prüfung:	...11. Juli 2007
Zum Druck genehmigt:	...Kiel, 18.Juli 2007, der Dekan....

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	10
1.1 ATOPISCHE ERKRANKUNGEN UND ASTHMA	10
1.2 T-ZELLIMMUNANTWORT: DIE VERSCHIEDENEN T _{HELPER} -ZELLEN	12
1.3 EINFLUSS VON UMWELTBEDINGUNGEN AUF DIE ENTWICKLUNG ATOPISCHER ERKRANKUNGEN.....	13
1.4 BEDEUTUNG DENDRITISCHER ZELLEN (DCs) FÜR DIE POLARISIERUNG DER T _{HELPER} -ZELLANTWORT UND FÜR DIE ALLERGIEENTWICKLUNG	16
1.5 BEDEUTUNG DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS BEI DER AKTIVIERUNG UND POLARISIERUNG VON DCs.....	19
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 CHEMIKALIEN	23
2.2 GERÄTE	24
2.3 STIMULANTIEN UND WEITERE SUBSTANZEN.....	25
2.4 ALLGEMEINE PUFFER UND MEDIEN.....	26
2.5 BAKTERIEN	26
2.5.1 Kultivierung und Aufbereitung der Bakterien.....	26
2.5.2 FITC-Markierung der Bakterien	29
2.6 VERSUCHSTIERE.....	29
2.6.1 Sensibilisierung, Behandlung und Allergenprovokation der Mäuse.....	29
2.6.2 Differenzielle Zellzählung in der Broncho-alveolären-Lavage-Flüssigkeit	30
2.6.3 Lungenhistologie	30
2.6.4 Analyse der Atemwegsreaktivität	30
2.7 ZELLKULTUR	31
2.7.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen (MNCs)	31
2.7.2 Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten mittels Elutriation.....	31
2.7.3 Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten mittels Plastikadhärenz	31
2.7.4 Differenzierung humaner DCs aus Monozyten	32
2.7.5 Isolierung naiver T-Zellen aus Lymphozyten.....	32
2.7.6 Stimulation humaner DCs.....	33
2.7.7 Kokultur humaner DCs mit naiven T-Zellen	34
2.7.8 Rekultur humaner DCs	34
2.7.9 HEK293-Zellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)	34
2.7.10 Transfektion und Stimulation von HEK293-Zellen	34

2.7.11	Zellzahlbestimmung.....	35
2.8	ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)	35
2.8.1	OVA-spezifische Immunglobuline	35
2.8.2	Zytokine	36
2.9	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING, FACS).....	36
2.10	WESTERN BLOT	37
2.10.1	Herstellung von Zelllysaten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	37
2.10.2	SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran.....	38
2.10.3	Immunhistochemischer Nachweis der Proteine	38
2.11	KONFOKALE LASERSCANMIKROSKOPIE	39
2.12	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	40
2.12.1	Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA).....	40
2.12.2	Reverse Transkription	40
2.12.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
2.12.4	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR.....	41
2.12.5	Agarosegelelektrophorese	43
2.13	MICROARRAY	43
2.14	STATISTIK	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	ALLERGIEPRÄVENTIVE EIGENSCHAFTEN DER KUHSTALLBAKTERIEN IN EINEM IN VIVO-MAUSMODELL	45
3.1.1	Reduzierte allergische Parameter nach Behandlung mit den Bakterien <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78	45
3.1.2	Verbesserte Atemwegsreaktivität in den Bakterien-behandelten Mäusen.....	47
3.2	KUHSTALLBAKTERIEN BEGÜNSTIGEN EINE T_H1-ANTWORT	49
3.2.1	Aktivierung und Reifung humaner dendritischer Zellen durch <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78	49
3.2.2	<i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78 induzieren ein T _H 1-polarisierendes Programm in DCs.....	51
3.2.3	Mit Kuhstallbakterien aktivierte DCs induzieren eine T _H 1-Immunantwort.....	53
3.3	FÜR DIE ALLERGIEPRÄVENTIVEN EIGENSCHAFTEN VON A. LWOFFII F78 VERANTWORTLICHE STRUKTUREN	56
3.3.1	Aktivierung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch <i>A. Iwoffii</i> F78	57
3.3.2	Die Bedeutung der TLR2-, NOD1- und NOD2-Liganden von <i>A. Iwoffii</i> F78 für die Aktivierung von humanen DCs.....	59
3.3.3	Bedeutung von TLR4-Liganden für die Aktivierung und T _H 1-Ausrichtung von humanen DCs mit <i>A. Iwoffii</i> F78	62
3.3.4	LPS von <i>A. Iwoffii</i> F78 besitzt ebenfalls T _H 1-polarisierende Eigenschaften	63
3.4	BEDEUTUNG INTRAZELLULÄRER REZEPTOREN BEI DER AKTIVIERUNG UND POLARISIERUNG VON DCs DURCH L. LACTIS G121	65

3.4.1	Aktivierung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch <i>L. lactis</i> G121	66
3.4.2	Bedeutung der TLR2-Liganden von <i>L. lactis</i> G121 für die Aktivierung von humanen DCs	68
3.4.3	Verspätete Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121	69
3.4.4	Ein intrazellulärer Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung humaner DCs durch <i>L. lactis</i> G121.....	71
3.5	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN KUHSTALLBAKTERIEN UND REFERENZBAKTERIEN	73
3.5.1	Microarray-Analysen von Bakterien-behandelten humanen DCs	73
3.5.2	Polarisierung dendritischer Zellen durch Kuhstallbakterien und entsprechende Referenzbakterien	77
3.6	MÖGLICHE MECHANISMEN DER ALLERGIEPRÄVENTION	78
3.6.1	Aktivierung verschiedener IRFs durch <i>L. lactis</i> G121	78
3.6.2	Aktivierung von NF- κ B-Untereinheiten durch <i>L. lactis</i> G121.....	80
3.6.3	Langanhaltende Aktivierung humaner DCs durch <i>L. lactis</i> G121	82
3.6.4	Synergistische Effekte von <i>A. lwoffii</i> F78 und <i>L. lactis</i> G121	84
4	DISKUSSION	85
4.1	ALLERGIEPRÄVENTIVE EIGENSCHAFTEN DER KUHSTALLBAKTERIEN	85
4.2	IMMUNMODULATORISCHE FÄHIGKEITEN DER KUHSTALLBAKTERIEN	86
4.3	DAS LPS IST DIE ZENTRALE T _H 1-POLARISIERENDE STRUKTUR VON <i>A. LWOFFII</i> F78.....	89
4.4	INTRAZELLULÄRE REZEPTOREN SPIELEN BEI DER T _H 1-POLARISIERENDEN WIRKUNG VON <i>L. LACTIS</i> G121 EINE ENTSCHEIDENDE ROLLE	91
4.5	ALLERGIEPROTEKTIVE BAKTERIEN INDUZIEREN T _H 1-POLARISIERENDE GENPROGRAMME	93
4.6	MÖGLICHE MECHANISMEN DER ALLERGIEPRÄVENTION DURCH DIE KUHSTALLBAKTERIEN.....	95
4.7	FAZIT	97
	LITERATUR	98
	ZUSAMMENFASSUNG.....	111
	ABSTRACT.....	112
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	113
	TABELLENVERZEICHNIS.....	115
	CURRICULUM VITAE	116
	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	117
	DANKSAGUNG	118
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
<i>A. Iwoffii</i> F78	<i>Acinetobacter Iwoffii</i> F78
APC	Antigenpräsentierende Zelle
as	<i>anti-sense</i>
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i> DSM 618	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 618
BAL	Broncho-alveoläre-Lavage
BALF	Broncho-alveoläre-Lavage-Flüssigkeit
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C406	Compound 406
CCL	<i>chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4 ⁺	CD4-positiv
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cfu	<i>colony-forming units</i>
CytD	Cytochalasin D
CXCL	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAP	Diaminopimelinsäure
DC	dendritische Zellen
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
<i>E. coli</i> F1111 9-41	<i>Escherichia coli</i> F1111 9-41
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>Forkhead box p3</i>
GAPDH	Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GBP	<i>Interferon-induced guanylate-binding protein</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRAS	<i>generally regarded as save</i>
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HBSS	<i>Hanks buffered salt solution</i>
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HPRT	Hypoxanthin/Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICOS-L	<i>inducible T-cell costimulator Ligand</i>
iDC	unreife (<i>immature</i>) DC
IFI	<i>Interferon induced protein</i>
IFI44L	<i>Interferon induced protein 44-like;</i>
IFIH1	<i>Interferon induced with helicase C domain protein 1</i>
IFIT	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
IFITM	<i>Interferon-induced transmembrane protein</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-12R	<i>IL-12 Receptor</i>
IFN	Interferon
IFNAR1	<i>Interferon-alpha/beta receptor alpha chain</i>
IFNAR2	<i>Interferon-alpha/beta receptor beta chain</i>
IFNGR1	<i>Interferon-gamma receptor alpha chain</i>
IFNGR2	<i>Interferon-gamma receptor beta chain;</i>
I-κB	<i>inhibitor of kappa B</i>
IKK	I-κB-Kinase
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon-regulatory factor</i>
ISG20	<i>Interferon-stimulated gene 20 kDa protein;</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LAB	<i>lactic acid bacteria</i>
<i>L. lactis</i> G121	<i>Lactococcus lactis</i> G121
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin rich repeats</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAPK	MAP-Kinase
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
mDC	myeloide DC
MDP	Muramyldipeptid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MNCs	mononukleäre Zellen
MOPS	<i>Morpholinopropane sulfonic acid</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam ₃ CSK ₄	<i>N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-propyl]-(R)-cysteinyll-(lysyl)3-lysine</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAS	Periodsäure-Schiff Reaktion
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmacytoide DC
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normally T-expressed, and presumably Secreted</i>
RICK	<i>receptor-interacting serine/threonine kinase</i>
RHD	<i>rel homology domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>

RT	Reverse Transkriptase
s	<i>sense</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBet	<i>T-box expression factor</i>
TC	T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T _{Helfer}
Tim	<i>T cell immunoglobulin mucin</i>
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor Homologie-Domäne
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
T _{Reg}	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
WAO	<i>World Allergy Organization</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

1 EINLEITUNG

Nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) ist Asthma die am meisten verbreitete chronische Krankheit unter Kindern und mit weltweit über 300 Millionen Betroffenen eine weit verbreitete Krankheit. Die Inzidenz für Asthma und atopische Erkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen, und die durch Asthma hervorgerufenen Todesfälle werden in den nächsten 10 Jahren voraussichtlich von derzeit ca. 250.000 im Jahr um weitere 20 % steigen (WHO). Die dabei jährlich für die Therapie anfallenden Kosten werden von der *World Allergy Organization* (WAO) zurzeit auf 20 Milliarden US-Dollar geschätzt. Aufgrund dieser Fakten besteht ein großes Interesse an einer effektiven Vorbeugung zur Vermeidung atopischer Erkrankungen und Asthma. In einer Reihe epidemiologischer Studien wurde gezeigt, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, deutlich weniger unter atopischen Erkrankungen leiden als gleichaltrige Kinder, die zwar in derselben Umgebung, aber nicht auf einem Bauernhof aufwachsen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die allergiepräventiven Eigenschaften von Kuhstallbakterien und grundlegende Mechanismen der Allergieprävention untersucht werden, um Ansatzpunkte für eine wirkungsvolle Allergieprophylaxe zu schaffen.

1.1 ATOPISCHE ERKRANKUNGEN UND ASTHMA

Die Atopie, vom griechischen *atopos* („fehl am Platze“) abgeleitet, ist eine individuelle Prädisposition Immunglobulin (Ig) E-vermittelte Allergien gegen harmlose Umweltallergene zu entwickeln. Zu den atopischen Erkrankungen zählen zum Beispiel die Allergische Rhinitis (chronische Entzündung der Nasenschleimhaut) und das Atopische Ekzem. Im Gegensatz zu den atopischen Erkrankungen werden allergische Erkrankungen wie die Kontaktdermatitis, die durch IgE-unabhängige Mechanismen entstehen, als non-atopische Allergien bezeichnet¹. Einhergehend mit den allergischen Erkrankungen leiden viele der Betroffenen an *Asthma bronchiale*, einer chronisch entzündlichen Erkrankung der kleinen

Atemwege, die mit einer dauerhaften Hyperreaktivität der Lunge und einer vermehrten Sekretion von Mukus verbunden ist². Dies führt zu einer Verengung der Atemwege (Bronchialobstruktion) und dadurch zu den typischen Atemnotanfällen. Ein geringer Prozentsatz der unter *Asthma bronchiale* leidenden Personen weist allerdings keine offensichtlichen atopischen Symptome auf. Dieses non-atopische *Asthma bronchiale* tritt zumeist erst im Erwachsenenalter auf und scheint nicht-allergischer Natur zu sein.

Gründe für die Entstehung atopischer Erkrankungen sind vermutlich in einer Veränderung der T_HHelfer (T_H)-Immunantwort zu finden (s. auch Kapitel 1.2). So wurde eine in Richtung T_H2 verschobene Immunantwort bei Allergikern beobachtet, welche die Pathologie der Krankheit bestimmt³⁻⁵. Als verantwortliche Mechanismen werden sowohl eine fehlende Suppression der T_H2-Antworten durch regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) als auch eine Verschiebung der T_H1-/T_H2-Balance in Richtung T_H2 diskutiert^{6;7}. Die durch eine verstärkte T_H2-Immunantwort freigesetzten Interleukine (IL) IL-4 und IL-13 führen zu einem Isotypenwechsel von IgM zu IgE und somit zu einer verstärkten Produktion von IgE durch die B-Zellen (s. auch Abb. 1.1). Diese IgEs werden über den hoch affinen Fc-ε-Rezeptor auf Mastzellen gebunden, was bei Kontakt mit dem Allergen zur Quervernetzung dieser Rezeptoren und dadurch zur Freisetzung verschiedener Mediatoren, u.a. Histamin, Chemo- und Zytokinen führt⁸. Diese Mediatoren vermitteln ihrerseits eine erhöhte Mukussekretion durch die Becherzellen, eine Kontraktion der glatten Muskulatur, eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit und eine Entzündungsreaktion, die das Anlocken weiterer Zellen wie beispielsweise der Eosinophilen zur Folge hat.

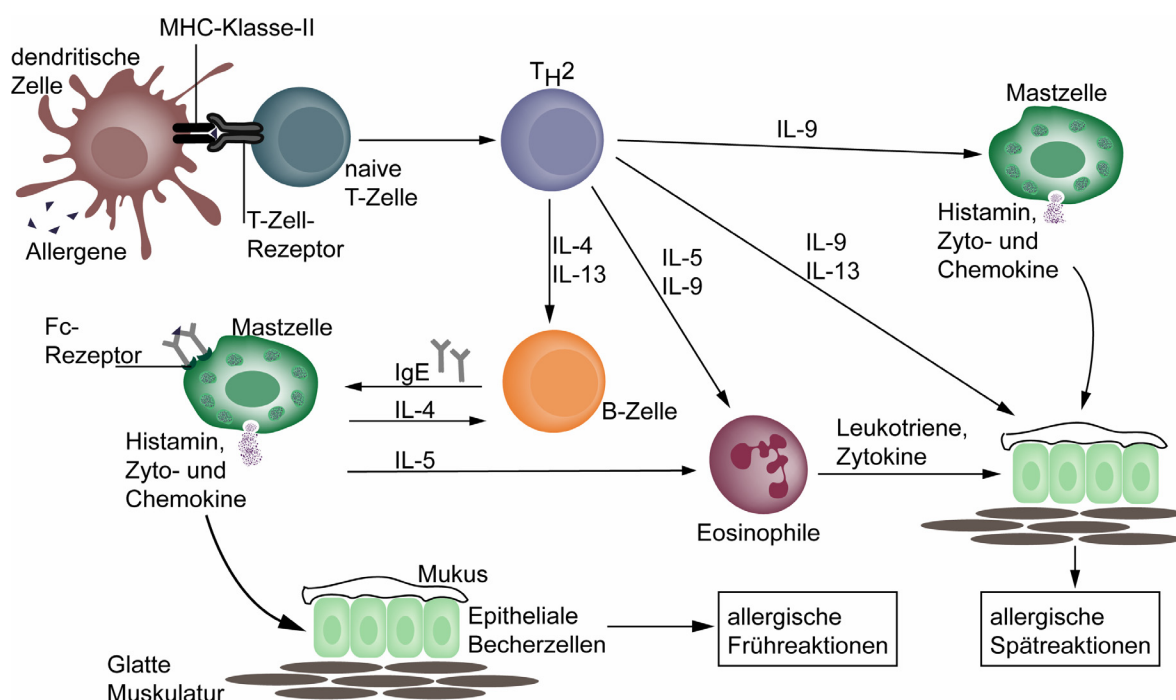


Abb. 1.1: Mechanismen der allergischen Reaktion.

Abgewandelt nach Harylowicz und O'Garra⁶. Erläuterungen siehe Text. MHC, *major histocompatibility complex*.

Nicht-atopische Personen entwickeln dagegen nur eine geringe Immunantwort gegen dieselben Umweltallergene, produzieren vornehmlich IgG1- und IgG2a-Antikörper und weisen deutlich weniger allergen-spezifische IgG4- und IgE-Antikörper auf^{1;9}. Zudem konnte bei Nicht-Atopikern *in vitro* eine T_H1-gerichtete Immunantwort gegen entsprechende Allergene gezeigt werden^{3;10}.

1.2 T-ZELLIMMUNANTWORT: DIE VERSCHIEDENEN T_{HELPER}-ZELLEN

Wie bereits in dem vorangegangenen Kapitel erörtert, spielt die Polarisierung der T-Zellimmunantwort bei atopischen Erkrankungen eine große Rolle. Die T-Zellen werden in zwei große Hauptgruppen, die CD4-positiven- (CD4⁺) und CD8-positiven- (CD8⁺)-T-Zellen unterteilt (CD = *cluster of differentiation*)¹¹. Bei den CD8⁺-T-Zellen handelt es sich vornehmlich um zytotoxische T-Zellen, die u.a. eine Rolle bei der Erkennung und Beseitigung von Virus-infizierten Zellen spielen. Die T_{Helper}-Zellen sind klassischer Weise CD4⁺ und bilden eine sehr heterogene Gruppe. Sie werden nochmals in verschiedene T_{Helper}-Subgruppen unterteilt, wobei derzeit T_H1-, T_H2-, T_H17- und T_{Reg}-Zellen anhand ihres Zytokinprofils, sowie bestimmter Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren unterschieden werden. Die wichtigsten Differenzierungssignale sowie charakteristische Merkmale der Subgruppen sind in Tab. 1.1 zusammengefasst. Die den T-Zellen nachgeschaltete Immunantwort unterscheidet sich dementsprechend je nach aktivierter T_{Helper}-Subgruppe und ist ebenfalls in Tab. 1.1 aufgeführt.

Tab. 1.1: Merkmale der T_{Helper}-Subgruppen.

	Differenzierungssignal	Zytokinprofil	Weitere Merkmale	Nachgeschaltete Immunantwort	Referenzen
T _H 1	IL-12	IFN- γ , TNF, IL-2	TBet, TIM-3, IL-12R β 2, STAT-4	Zelluläre Immunantwort: Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen	12-14
T _H 2	IL-4	IL-4	GATA3, TIM-1, STAT-6	Humorale Immunantwort: B-Zell-Reifung, Aktivierung von Eosinophilen	13;15
T _{Reg}	TGF- β , IL-10	TGF- β , IL-10	Foxp3, CD25	Suppression anderer T _{Helper} -Zellen	16
T _H 17	TGF- β , IL-23, TNF	IL-17, IL-6, TNF	ROR γ T	Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort, Anlocken von Neutrophilen	17-20

* Foxp3, Forkhead box p3; GATA3, GATA binding protein 3; IL-12R, IL-12 Receptor; ROR, RAR-related orphan receptor; STAT, Signal transducer and activator of transcription; TBet, T-box expression factor; TGF, transforming growth factor; TIM, T cell immunoglobulin mucin; TNF, tumor necrosis factor

Neben den beschriebenen T_{Helfer} -Subgruppen wurden sogenannte T_{H0} -Zellen beschrieben, die bei Aktivierung kein bestimmtes Zytokinprofil aufweisen, sondern sowohl das T_{H2} -Zytokin IL-4 als auch das T_{H1} -Zytokin Interferon (IFN)- γ produzieren²¹. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um ein Zwischenstadium in der T-Zell-Differenzierung handelt und sich die T_{H0} -Zellen bei entsprechenden Differenzierungssignalen in die verschiedenen T_{Helfer} -Zellen weiter entwickeln können^{21;22}.

Die T_{H1} - und T_{H2} -Zellen wurden bereits in den 70er-80er Jahren entdeckt und Mosmann *et al.* entwickelten 1986 die Hypothese der T_{H1} -/ T_{H2} -Balance, die besagt, dass sich die beiden Zelltypen gegenseitig regulieren und hemmen können²³. Einige Jahre später konnte dann gezeigt werden, dass der zu Grunde liegende Mechanismus einerseits auf einer Inhibierung der T_{H1} -Entwicklung durch IL-4 und andererseits auf einer Inhibierung der T_{H2} -Entwicklung durch INF- γ beruht^{24;25}. Weiterhin zeigte sich, dass eine überschießende T_{H1} -Antwort zu Autoimmunkrankheiten und eine dominierende T_{H2} -Antwort zu Allergien führen können²⁶. Dementsprechend ist eine gesunde Balance zwischen diesen T_{Helfer} -Subgruppen von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang spielen die regulatorischen T-Zellen, die ebenfalls in den 70er Jahren beschrieben wurden, eine entscheidende Rolle, da sie sowohl die T_{H1} -, als auch die T_{H2} -Antwort supprimieren können²⁷. Bei den T_{Regs} unterscheidet man nochmals verschiedene Subgruppen anhand folgender Merkmale: (i) Natürlich vorkommende $CD4^+$ - $CD25^+$ - T_{Regs} . Diese exprimieren Foxp3 und moderate Mengen an IL-10 und TGF- β ^{6;8;16;28}. (ii) Induzierbare T_{Regs} , TR1, die sich durch die Produktion großer Mengen an IL-10 und TGF- β auszeichnen^{8;29} und (iii) die den TR1 vergleichbaren T_{H3} -Zellen, die ebenfalls große Mengen an TGF- β , aber variable Mengen an IL-4 und IL-10 produzieren⁸. Die erst vor kurzem beschriebenen T_{H17} -Zellen sind wie die T_{H1} -Zellen in Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten gebracht worden^{30;31}. So konnte gezeigt werden, dass diese Zellen für Zellschädigungen und Zelltod bei chronisch entzündlichen Erkrankungen verantwortlich sind, und nicht, wie ursprünglich angenommen, die IFN- γ -produzierenden T_{H1} -Zellen^{17;32}.

1.3 EINFLUSS VON UMWELTBEDINGUNGEN AUF DIE ENTWICKLUNG ATOPISCHER ERKRANKUNGEN

Die Inzidenz für atopische Erkrankungen und Asthma, aber auch für Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose, Morbus Crohn und Typ 1 Diabetes, ist, wie bereits erwähnt, in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen³³. Gleichzeitig konnte ein Rückgang vieler Infektionskrankheiten wie Mumps, Masern, Tuberkulose und Hepatitis A verzeichnet werden^{33;34}. Diese und weitere Befunde führten zu der erstmals von Strachan *et al.* beschriebenen „Hygiene-Hypothese“, die besagt, dass die Zunahme atopischer Erkrankungen mit der zunehmenden Hygiene und der geringeren Anzahl an Infektionen im Kindesalter

korreliert³⁵. Gestützt wird diese These durch eine Reihe von Studien, die zeigen, dass virale, bakterielle sowie parasitäre Infektionen einen protektiven Effekt auf die Allergieentwicklung haben^{36;37}. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass der übermäßige Einsatz von Antibiotika die Entstehung von atopischen Erkrankungen begünstigt³⁸. Als mögliche Erklärung für diese Befunde kann die Tatsache herangezogen werden, dass Kleinkinder in den ersten Lebensmonaten eine T_H2 -dominierte Immunantwort aufweisen³⁹⁻⁴¹, welche, wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, mit atopischen Erkrankungen assoziiert ist. Diese T_H2 -Polarisierung der Immunantwort ist während der Schwangerschaft und Geburt wichtig, um eine mögliche Immunreaktion zwischen Mutter und Kind zu vermeiden⁴². Die ersten Lebensjahre sind dann entscheidend für die Ausbildung einer gesunden T_H1 -/ T_H2 -/ T_{Reg} -Balance. Die oben erwähnten Infektionskrankheiten würden eine T_H1 -Immunantwort begünstigen und damit die allergieassoziierte T_H2 -Antwort unterdrücken. Wie in Abb. 1.2 gezeigt, können neben den schon genannten Umwelteinflüssen auch weitere Faktoren bei der Ausbildung dieser Balance sowohl positiv- als auch negativ-regulierend eingreifen. So scheinen die zunehmende Schadstoffbelastung durch das erhöhte Verkehrsaufkommen und die Industrialisierung Allergien zu fördern. Zurückzuführen ist dies auf die vermehrt in der Luft vorkommenden gasförmigen Stoffe wie Ozon und Stickstoffdioxid aber auch Dieselabgaspartikel, die eine T_H2 -Immunantwort hervorrufen und damit eine Allergieentwicklung begünstigen^{43;44}. Im gleichen Zusammenhang konnte ein negativer Effekt sowohl des Aktiv- als auch des Passivrauchens gezeigt werden⁴⁵. Aber auch mangelnde Bewegung und Fettleibigkeit werden als begünstigende Faktoren bei der Entstehung von Allergien diskutiert^{46;47}. Auf der anderen Seite wurden eine Reihe an Faktoren beschrieben, die das Risiko an Allergien zu erkranken mindern. So konnten allergieprotektive Effekte u.a. für den Kontakt mit bestimmten mikrobiellen Komponenten, den Aufenthalt in einer Tageskrippe, ältere Geschwister, die gastrointestinale Kolonisation mit Kommensalen und den Gebrauch von Probiotika gezeigt werden⁴⁸⁻⁵². Der dabei zu Grunde liegende Mechanismus scheint einerseits in der Induktion einer starken T_H1 -Antwort, andererseits aber auch in der Induktion einer regulatorischen Immunantwort zu liegen. Letzteres erklärt auch den etwas widersprüchlichen Zusammenhang zwischen einer T_H2 -dominierten Helmintheninfektion und dem dennoch protektiven Effekt auf die Allergieentwicklung. Diese Infektionen induzieren T_{Regs} und supprimieren damit generell die T_{Helfer} -Immunantworten⁵³.

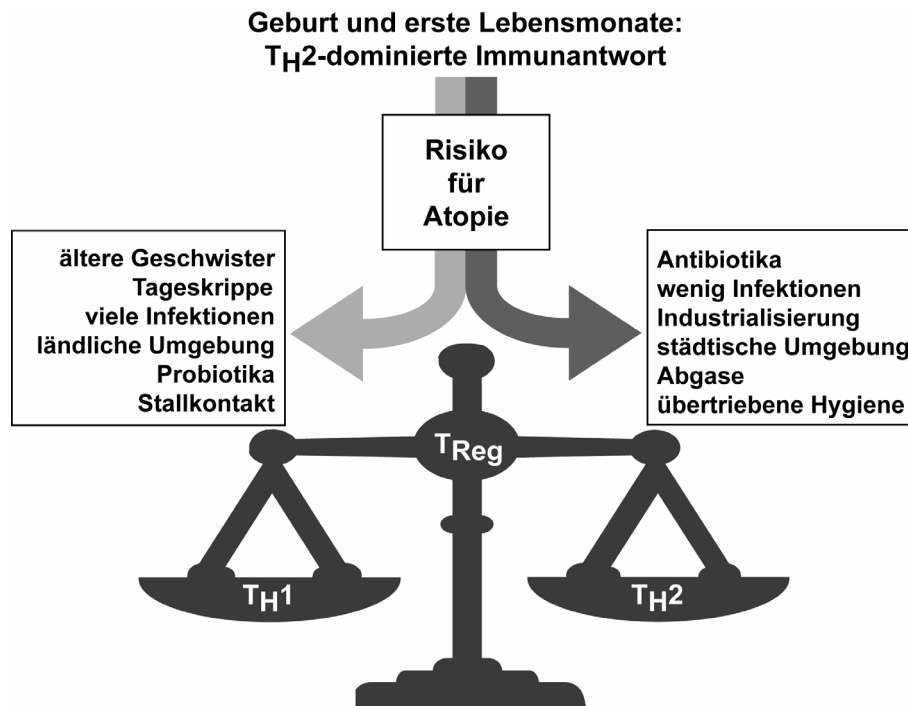


Abb. 1.2: Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Ausbildung einer gesunden T_H1/T_H2-Balance.
Erläuterungen siehe Text.

Ein oft nachgewiesener Umwelteinfluss, der sich protektiv auf die Entstehung atopischer Krankheiten und Asthma auswirkt, ist das Aufwachsen auf einem Bauernhof. So belegt eine Reihe epidemiologischer Studien, dass Kinder, die auf traditionell geführten Bauernhöfen aufwachsen, signifikant weniger an atopischen Krankheiten und Asthma leiden, als Kinder aus nicht-landwirtschaftlich tätigen Familien derselben Umgebung⁵⁴⁻⁵⁷. Insbesondere konnten Riedler *et al.* zeigen, dass dieser positive Effekt u.a. auf den Aufenthalt im Stall und das Trinken von Rohmilch zurückzuführen ist⁵⁸. Dabei war der protektive Effekt umso ausgeprägter, je früher und je häufiger bzw. länger dieser Kontakt stattfand. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die zunehmende Urbanisierung mit einem Anstieg an atopischen Krankheiten einhergeht^{59,60}. Der positive Effekt der Bauernhofumgebung wird derzeit mit der Aktivierung des angeborenen Immunsystems (s. auch Kapitel 1.5, Seite 19) in Zusammenhang gebracht⁶¹. So konnte eine inverse Beziehung zwischen der mikrobiellen Belastung, gemessen am Endotoxin- (Lipopolysaccharid (LPS), Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien) oder auch Bakterien-DNA-Gehalt (nicht-methylierte CpG-Motive) in den Matratzen der Kinder und der Entwicklung von atopischen Erkrankungen gezeigt werden^{62,63}. *In vivo*-Mausversuche bestätigten diese positive Wirkung der mikrobiellen Belastung und zeigten für LPS und für bakterielle DNA protektive Effekte bezüglich einer Allergieentstehung⁶⁴⁻⁶⁶. Zudem scheint auch der aus dem Stall gewonnene Staub allergieprotektive Wirkung zu haben, wie Peters *et al.* vor kurzem zeigen konnten⁶⁷. Bei all diesen *in vivo*-Experimenten wurde jedoch deutlich, dass sowohl der Zeitpunkt als auch die

Dosis der entsprechenden Substanzen einen kritischen Aspekt darstellt⁴⁹. So hat z.B. LPS allergieprotektive Wirkungen, wenn der Kontakt vor der Allergensensibilisierung erfolgt bzw. allergiefördernde Wirkungen, wenn der Kontakt erst nach der Sensibilisierung erfolgt^{68;69}.

Neben den beschriebenen Umwelteinflüssen ist auch die genetische Prädisposition des Einzelnen entscheidend. In den letzten Jahren konnten eine Reihe an Genpolymorphismen identifiziert werden, die mit Allergien und Asthma positiv wie auch negativ assoziiert sind⁷⁰⁻⁷². Diese vielen verschiedenen Faktoren, die an der Allergieentstehung beteiligt sein können, machen deutlich, dass man die Entstehung von allergischen Erkrankungen und Asthma nicht eindimensional betrachten darf, sondern immer eine Vielzahl an Faktoren berücksichtigt werden müssen.

1.4 BEDEUTUNG DENDRITISCHER ZELLEN (DCs) FÜR DIE POLARISIERUNG DER T_{HELPER}-ZELLANTWORT UND FÜR DIE ALLERGIEENTWICKLUNG

Auch wenn die in den vorangegangenen Kapitel beschriebenen T_{Helper}-Zellantworten den Verlauf der Immunantwort maßgeblich beeinflussen, sind sie nicht in der Lage selbstständig eine Immunantwort auszulösen, da der T-Zell-Rezeptor (TCR) nur prozessierte Antigene erkennt. Antigenpräsentierende Zellen (APCs) hingegen können unprozessiertes Antigen aufnehmen, fragmentieren und diese Fragmente dann über MHC-Klasse-II-Moleküle den T-Zellen präsentieren^{73;74}. Zudem liefern die APCs neben den in Tab. 1.1, Seite 12 aufgeführten Differenzierungssignalen noch weitere wichtige Signale, die für die T-Zellaktivierung benötigt werden (s. folgende Seiten). Bei atopischen Erkrankungen und Asthma konnten dendritische Zellen (DCs) als wesentliche APCs identifiziert werden⁷⁴⁻⁷⁶, wohingegen die Bedeutung anderer APCs wie bspw. Makrophagen unklar ist⁷⁷. Die große Bedeutung der DCs bei diesen Erkrankungen wird durch folgende Befunde unterstrichen: (i) DCs finden sich in den Atemwegen sowohl oberhalb als auch unterhalb der Basallamina und sind so in der Lage, eingeatmete Allergene aufzunehmen und zu präsentieren⁷⁸. (ii) Die Anzahl der DCs in der Lunge ist bei erkrankten Personen signifikant höher als bei gesunden Personen^{74;77;79}. (iii) Die Transplantation von Allergen-behandelten DCs führt im Mausmodell zu Asthma^{74;77;79} und (iv) die Depletion von DCs während der Sensibilisierungsphase verhindert im Mausmodell die Ausbildung der klassischen Asthmasymptome⁸⁰. Im Hinblick auf die T_{H2}-dominierte Immunantwort atopischer Personen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die DCs dieser Personen präferentiell T_{H2}-Zellen und DCs gesunder Personen eher T_{H1}-Zellen induzieren^{81;82}. Weiterhin ist bekannt, dass die Atemwegs-DCs per se eine T_{H2}-Immunantwort begünstigen und für eine T_{H1}-Polarisierung ein zusätzliches T_{H1}-polarisierendes Signal benötigen^{77;83}. Dieser Befund macht die DCs zu einem interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer vorbeugender Maßnahmen oder auch Therapien atopischer Erkrankungen.

Dendritische Zellen stellen nach heutigem Kenntnisstand keinen einheitlichen Zelltypus dar, sondern bilden eine heterogene Leukozytenklasse mit verschiedenen Subpopulationen. Anhand verschiedener phänotypischer Merkmale unterteilt man die im peripheren Blut vorkommenden DCs in zwei Hauptgruppen: die myeloiden CD11c⁺ DCs, die sich aus myeloiden Vorläuferzellen differenzieren (mDCs) sowie die plasmazytoiden CD11c⁻ DCs, welche aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen (pDCs)^{84;85}. Neben der unterschiedlichen Entwicklung unterscheiden sich die beiden Gruppen auch hinsichtlich ihrer Rezeptorausstattung und Funktion⁸⁶. So scheinen die pDCs eine entscheidende Rolle bei der Abwehr viraler Erreger zu spielen und setzen bei Kontakt mit viralen Strukturen schnell große Mengen an Typ I Interferonen frei⁸⁷. Die sowohl im Blut als auch in fast allen Geweben vorkommenden mDCs sind in der Lage eine Reihe inflammatorischer Signale nach Kontakt mit Antigenen auszusenden, wobei die Art des Signals vom Antigen abhängt (s. folgende Seiten). Für Forschungszwecke werden inzwischen vornehmlich *in vitro* mit Hilfe von *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und IL-4 aus Monozytengenerierte DCs verwendet, die mit den mDCs vergleichbar sind.

Die aus den Vorläuferzellen differenzierten unreifen DCs (iDCs) patrouillieren im peripheren Blut und Gewebe und sind darauf spezialisiert, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen^{73;83;88}. Nach der Antigenaufnahme wird dieses prozessiert und über MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle den T-Zellen präsentiert⁸⁹. Weiterhin führt die Aktivierung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (s. Kapitel 1.5) entweder direkt durch das Antigen oder durch andere in der Umgebung vorhandene Signale zur Reifung der DCs. Dies beinhaltet neben der Hochregulation verschiedener kostimulatorischer MHC-Klasse-I- und II-Moleküle auch die Aktivierung verschiedener Polarisierungssignale für die T_{Helfer}-Zellen sowie die Migration der DCs in die lymphatischen Organe^{90;91}. Durch diesen Reifungsprozess verlieren die DCs zwar die Fähigkeit Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen, sind aber in der Lage T-Zellen sehr effektiv zu aktivieren, da sie jetzt die für die Aktivierung naiver T-Zellen entscheidenden drei Signale bereitstellen⁸⁹: (1) Präsentation des Antigens über MHC-Klasse-II⁸⁹, (2) Aktivierung der T-Zellen über kostimulatorische Moleküle (z. B. CD40, CD80, CD86)^{90;92-94}, (3) Polarisierung der T-Zellen durch verschiedene Zytokine und Oberflächenmarker^{89;91} (s. auch Abb. 1.3).

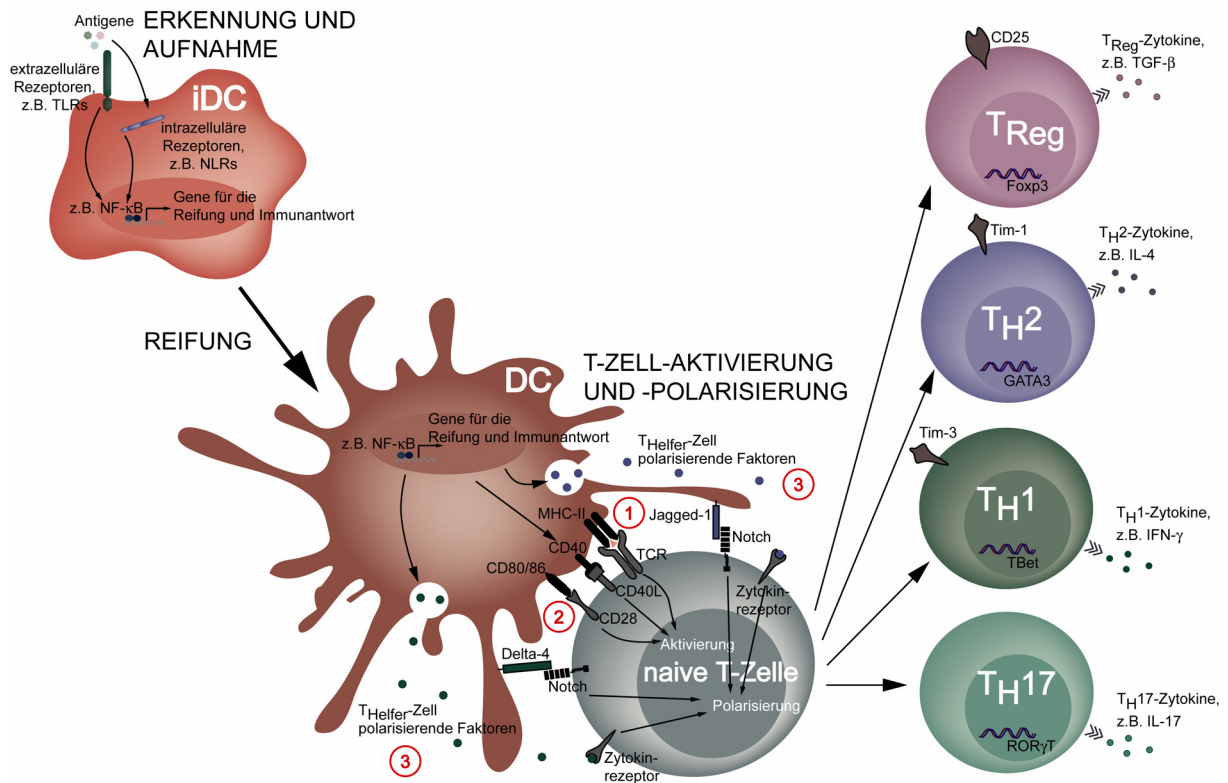


Abb. 1.3: T-Zell-Aktivierung und -Polarisierung durch DCs.

Erläuterungen siehe Text. NF-κB, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*; NOD, *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*; TLR, *toll-like receptor*.

Die wichtigsten, von DCs bereitgestellten, Polarisierungsfaktoren sind in Tab. 1.2 zusammengefasst. Dabei stellt IL-12 eines der zentralen TH1-polarisierenden Signale dar und ist auch bei atopischen Erkrankungen von großer Bedeutung. So konnten Morahan *et al.* einen Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität für Asthma und einem Polymorphismus im IL-12-Gen zeigen⁷¹. Die erhöhten IL-12-Konzentrationen wurden zudem bei Morbus Crohn-Patienten mit der geringeren Anfälligkeit dieser Patienten für atopische Erkrankungen in Verbindung gebracht⁹⁵. Das aktive IL-12p70 wird aus den zwei Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40 gebildet⁹⁶⁻⁹⁸. Dabei kann die IL-12p40 Untereinheit zusammen mit IL-23p19 ebenfalls aktives IL-23 bilden^{97,99}. Die effektive TH1-Polarisierung durch IL-12 erfolgt über den IL-12-Rezeptor und die Aktivierung von STAT4, der wiederum den TH1-Transkriptionsfaktor TBet aktiviert, was in der Produktion von IFN-γ und Inhibition von IL-4 und IL-5 resultiert^{12,100}. In ähnlicher Weise aktiviert das bedeutendste TH2-polarisierende Zytokin IL-4 über STAT6 den Transkriptionsfaktor GATA3 aktiviert, der dann die Produktion von IL-4 induziert^{97,101}.

Tab. 1.2: Differenzierungssignale von DCs für die Polarisierung der T_{Helfer}-Zellen.

Differenzierungs-Signal in Richtung	Zyto- und Chemokine	Weitere Merkmale	Referenzen
T _{H1}	IL-12p70, CCL5 (RANTES), IFN Typ I, IFN- γ , viel IL-6	ICAM-1, Delta-4	98;102-110
T _{H2}	IL-4, IL-5, IL-13, TSLP	OX40-L, Jagged-1	102;108;109;111;112
T _{Reg}	IL-10, TGF- β , wenig IL-6	ICOS-L, CTLA4	106;113
T _{H17}	IL-23		17;18

CCL, *chemokine (C-C motif) Ligand*; CTLA4, *cytotoxic T-lymphocyte protein 4*; ICAM, *intercellular adhesion molecule*; ICOS-L, *inducible T-cell costimulator Ligand*; RANTES, *Regulated upon Activation, Normally T-expressed, and Presumably Secreted*, TSLP, *thymic stromal lymphopoietin*

1.5 BEDEUTUNG DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS BEI DER AKTIVIERUNG UND POLARISIERUNG VON DCs

Das menschliche Immunsystem lässt sich funktionell in zwei Hauptkomponenten gliedern: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das, evolutionär betrachtet, ursprünglichere angeborene Immunsystem, bildet mit zellulären und humoralen Komponenten eine erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Pathogene^{114;115}. Zu den humoralen Komponenten zählen unter anderem das Komplementsystem und Enzyme wie das Lysozym, welche in der Lage sind Mikroorganismen zu eliminieren¹¹⁶. Die Epithelzellen der Lunge und des Gastrointestinaltraktes stellen eine erste wichtige zelluläre Barriere für invasive Mikroorganismen dar. Zudem gehören die phagozytierenden APCs (Monozyten/Makrophagen und DCs), aber auch Mastzellen, Neutrophile und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems¹¹⁵. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt dabei antigenunabhängig mit Hilfe von keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), die konservierte mikrobielle Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), wie Membranbestandteile oder Nukleinsäurestrukturen, als körperfremd erkennen¹¹⁵. Im Gegensatz hierzu erkennt das erworbene Immunsystem hochspezifisch Antigene und ist in der Lage, mit Hilfe von spezialisierten T- und B-Zellen ein immunologisches Gedächtnis auszubilden¹¹⁷. Die zellulären Komponenten des erworbenen Immunsystems sind vornehmlich die bereits in Kapitel 1.2, Seite 12 beschriebenen CD4⁺-T_{Helfer}-Zellen, die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen sowie die Antikörper-produzierenden B-Zellen. Auch wenn die angeborene und die erworbene Immunantwort unterschiedliche Komponenten der Immunabwehr darstellen, können sie nicht unabhängig voneinander betrachtet werden, da sie eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig beeinflussen¹¹⁸. So benötigen die T_{Helfer}-Zellen, wie bereits in Kapitel 1.4, Seite 16 beschrieben, eine effiziente Präsentation der

entsprechenden Antigene durch APCs, um diese über den TCR zu erkennen. In diesem Zusammenhang kommt den DCs eine einzigartige Bedeutung zu, da sie Pathogene über die PRRs erkennen und entsprechende Signale sowohl durch eine Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle aber auch mit Hilfe von Aktivierungssignalen an die T-Zellen weitergeben⁸⁸. Dies und die Möglichkeit entsprechende Immunantworten zu polarisieren (s. auch Kapitel 1.4, Seite 16), macht die DCs zu einem entscheidenden Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Ausschlaggebend für die Art der Polarisierung ist dabei, welcher PRR bzw. Kombination an PRRs aktiviert wird¹¹⁹⁻¹²². Diesbezüglich konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des angeborenen Immunsystem und der Prävention von atopischen Erkrankungen, aber auch der Verstärkung atopischer Erkrankungen hergestellt werden¹²³.

Eine große Familie der PRRs bilden die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs). Der Namensgeber der TLRs, der Toll-Rezeptor, wurde in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo er neben der Polarisierung der dorso-ventralen Achse der Larven auch an der Abwehr gegen Pathogene beteiligt ist^{124;125}. TLRs sind Typ-I-Transmembranproteine mit einem extrazellulären Amino-Terminus, der aus Leucin-reichen Motiven (*leucin rich repeats*, LRR) besteht¹²⁶, die an der Erkennung der PAMPs beteiligt sind¹²⁷. Der intrazelluläre Carboxy-Terminus besteht im Wesentlichen aus der so genannten Toll/Interleukin-1-Rezeptor Homologie-Domäne (TIR), die Protein-Protein-Interaktionen mit den Komponenten nachgeschalteter Signaltransduktionswege vermittelt¹²⁷. Im humanen System sind 11 TLRs beschrieben, die unterschiedliche PAMPs erkennen¹¹⁸. So stellt bspw. TLR4 den Rezeptor für LPS dar, während TLR2 als Heterodimer mit TLR1 bzw. TLR6 Lipoteichonsäuren und Lipopeptide erkennt¹²⁸⁻¹³².

Eine weitere wichtige Familie der PRRs bilden die intrazellulären *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLRs) mit über 23 Mitgliedern^{122;133;134}. Die generelle Struktur dieser Proteine beinhaltet eine aminoterminal Effektor-domäne, wie bspw. die *caspase recruitment domain* (CARD), die an der Interaktion mit weiteren Signaltransduktionsmolekülen beteiligt ist, gefolgt von einer zentralen *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)¹³⁴⁻¹³⁶. Diese ist an der Oligomerisierung der NLRs beteiligt. Am carboxyterminalen Ende besitzen die NLRs ebenfalls LRRs, die an der Erkennung der PAMPs beteiligt zu sein scheinen¹³³. Für die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe, NOD1 und NOD2, konnten unterschiedliche bakterielle Peptidoglykanfragmente als Agonisten identifiziert werden^{137;138}. Die minimale Struktur, die von NOD2 erkannt wird, ist das Muramyldipeptid (MDP), das sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien zu finden ist¹³⁸. NOD1 hingegen erkennt nur Peptidoglykanstrukturen in denen die *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-DAP) vertreten ist¹³⁹. Diese Strukturen sind vornehmlich im Peptidoglykan Gram-negativer Bakterien enthalten.

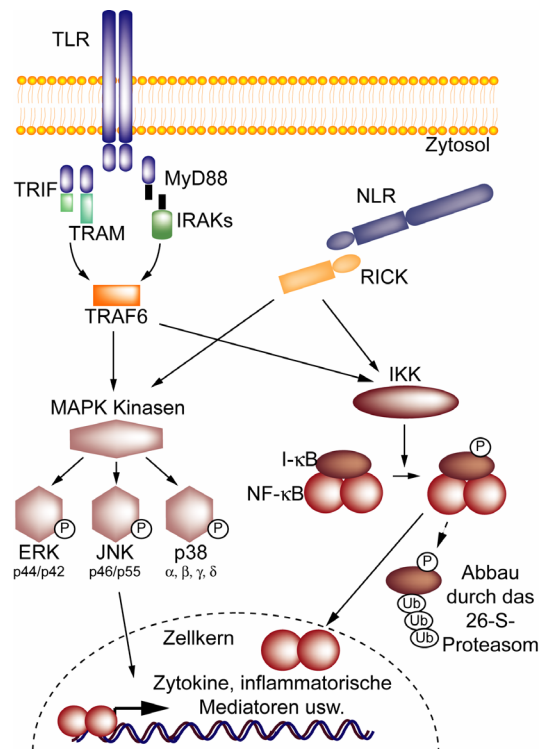


Abb. 1.4: Signaltransduktionswege der angeborenen Immunität.

Erläuterungen siehe Text. ERK, extrazellulär-regulierte Kinase; IRAK, Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; MAP, Mitogen aktivierte Kinase; MAPK, MAP-Kinase, MyD88, *Myeloid differentiation factor 88*; RICK, receptor-interacting serine/threonine kinase; TRAF, TNF-Rezeptor assoziierter Faktor; TRAM, *Trif-related adaptor molecule*; TRIF, *TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN-β*.

Die den PRRs nachgeschalteten Signaltransduktionswege unterscheiden sich hinsichtlich der beteiligten Moleküle deutlich voneinander (siehe Abb. 1.4), führen aber zur Aktivierung ähnlicher Signalkaskaden. Die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Kaskade und des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells* (NF-κB) stellen dabei die zentralen Signalwege dar. NF-κB wird aus Homo- und Heterodimeren der Rel-Familie gebildet. Diese Proteine zeichnen sich durch eine amino-terminale *Rel homology domain* (RHD) aus, die neben der DNA-Bindung und nukleären Lokalisation auch die Dimerisierung der Untereinheiten steuert¹⁴⁰. Im humanen System werden fünf NF-κB-Untereinheiten exprimiert: RelA (auch p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 p50 und NF-κB2 p52¹⁴¹. Im nicht aktivierten Zustand binden Mitglieder der inhibitorischen I-κB-Familie im Zytosol an die NF-κB-Dimere, wodurch die Kerntranslokationssequenz verdeckt und damit eine Translokation in den Zellkern verhindert wird¹⁴¹. Die Aktivierung der PRRs führt zur Aktivierung der I-κB-Kinasen (IKK), die daraufhin die I-κBs phosphorylieren und damit das Signal für eine Poly-Ubiquitinylierung geben. Die daraus resultierende Degradierung der I-κBs führt zu frei vorliegenden NF-κB-Dimeren, die in den Zellkern translokieren und Gene mit NF-κB-Bindestellen aktivieren¹⁴². Je nach Art der Aktivierung der Zellen werden drei unterschiedliche NF-κB Signalwege unterschieden: der kanonische

(klassische), der alternative und der p105 Signalweg¹⁴⁰. Je nach Signalweg werden verschiedene NF- κ B Heterodimere gebildet, die sich auch in der von ihnen induzierten Genaktivierung unterscheiden können. So ist z. B. für die IL-12p35-Aktivierung die Translokation des p50/c-Rel-Dimer essentiell¹⁴³. Durch das angeborene Immunsystem wird hauptsächlich der klassische NF- κ B-Signalweg aktiviert, der zur Bildung von p50/p65- bzw. p50/c-Rel-Dimeren und zur Transkription von u.a. Chemo- und Zytokinen sowie inflammatorischen Mediatoren führt¹⁴².

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der in Kapitel 1.3, Seite 13 beschriebene protektive Effekt einer bäuerlichen Umgebung auf die Allergieentwicklung näher untersucht werden. Da Mikroorganismen dieser Umgebung möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Ausbildung des Immunsystems in früher Kindheit spielen, wurden im Rahmen der ALEX Studie⁵⁸ verschiedene Mikroorganismen aus den Ställen isoliert, um deren Einfluss auf die Allergieprotektion zu untersuchen. So messen Rook und Brunet sogenannten „*good old friends*“ (bestimmte harmlose Bakterien wie bspw. Lactobacillen, die Teil der evolutionären Geschichte des Menschen sind) eine große Bedeutung in der Prägung des Immunsystems bei¹⁴⁴. Die in dieser Arbeit untersuchten Bakterien *Acinetobacter Iwoffii* F78 (*A. Iwoffii* F78) und *Lactococcus lactis* G121 (*L. lactis* G121) wurden aufgrund ihrer hohen Abundanz in den Kuhställen ausgewählt. Sie erfüllen die Kriterien der „*good old friends*“ und sind in der Natur weit verbreitet. Zudem hat *L. lactis* den GRAS (*generally regarded as safe*) Status erhalten, was es zu einem interessanten Bakterium für mögliche allergieprotektive Anwendungen macht¹⁴⁵.

In der vorliegenden Arbeit sollte die in einem *in vivo*-Maus-Modell gezeigte allergieprotektive Wirkung der beiden Bakterienstämme hinsichtlich der zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Dabei dienten humane dendritische Zellen als Modellsystem, da diese bei der Ausbildung und Prägung des Immunsystems eine entscheidende Rolle spielen und, wie in Kapitel 1.4, Seite 16 beschrieben, gerade bei der Kommunikation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem von zentraler Bedeutung sind. Dabei war vor allem die Art der Polarisierung der Immunantwort durch die Kuhstallbakterien von großem Interesse. Weiter sollten auch die für die Allergieprotektion verantwortlichen Strukturen aus den Bakterien charakterisiert werden, da einzelne Strukturen aufgrund der zu erwartenden geringeren Nebenwirkungen eventuell leichter in der Allergieprävention eingesetzt werden könnten als ganze Bakterien. Letztendlich sollten auch vergleichende Analysen mit anderen, nicht aus dem Kuhstall isolierten Bakterien durchgeführt werden, um so mögliche Unterschiede zu identifizieren und einen tieferen Einblick in die Mechanismen und Wirkungsweisen der Allergieprotektion durch die Kuhstallbakterien zu erhalten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN

Agarose	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aluminiumhydroxid (Al(OH) ₃)	Pierce, Rockford, USA
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Azeton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Congo Red	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
1,4-Dithio-DL-Threitol (DTT)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glyzerin	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt Deutschland
<i>Morpholinopropane sulfonic acid</i> (MOPS)	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland
Ovalbumin (OVA) <i>Grade VI</i>	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
OVA <i>Grade V</i>	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Penicillin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Amersham, Cleveland, USA
Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tetramethylbenzidin (TMB)	Biochemika Fluka, Buchs, Schweiz
Tris	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Triton X-100	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trypton	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween20	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Tween80	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Darmstadt Deutschland

2.2 GERÄTE

AutoMACS™	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Binocular und Durchlichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
ChemiDoc 2000	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Electrophoresis Power Supply (EPS 300)	Amersham, Cleveland, USA
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Gelkammer	PeqLab GmbH, Erlangen, Deutschland
JE-B6-Elutriator	Beckmann, München, Deutschland
Konfokales Laserscanmikroskop TCS SP	Leica, Bensheim, Deutschland
LightCycler® 2.0	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
20 µl LightCycler® Sample Carousel 2.0	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Model 200/2.0 Power Supply	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Novex Mini-Cell	Invitrogen, Leek, Niederlande
Odyssey® Infrared Imaging System	Li-Cor, Lincoln, USA

Plattenschüttler	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Rotanta 46RC	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Sysmex Platelet Counter PL-100	Sysmex, Hamburg, Deutschland
Ultrawash Plus	Dynex Technologies, Berlin, Deutschland
X Cell IITM Blot Module	Invitrogen, Leek, Niederlande

2.3 STIMULANTIEN UND WEITERE SUBSTANZEN

Die zur Stimulation oder auch zur Blockierung bestimmter Signalwege eingesetzten Substanzen sind im Folgenden aufgeführt:

<i>A. Iwoffii</i> F78	zur Verfügung gestellt von Ania Hanuszkiewicz (FZ Borstel)
<i>A. Iwoffii</i> LPS	von <i>A. Iwoffii</i> F78, zur Verfügung gestellt von Ania Hanuszkiewicz (FZ Borstel), Isolation durch die Phenol-Chloroform-Petroleum-Ether-Methode, Aufbewahrung der Stammlösung in 1 mg/ml Aqua dest.
BrefeldinA	eBiosciences
<i>B. subtilis</i> DSM 618	zur Verfügung gestellt von Kay Vogel (FZ Borstel)
Compound 406 (C406)	synthetische Lipid A-Partialstruktur, zur Verfügung gestellt von Prof. K. Fukase, Graduate School of Science, Osaka Universität, Osaka, Japan
Cytochalasin D (CytD)	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland
<i>E. coli</i> F1111 9-41	zur Verfügung gestellt von Uwe Mamat und Ania Hanuszkiewicz (FZ Borstel)
ieDAP	synthetische Peptidoglykanstruktur, zur Verfügung gestellt von Prof. K. Fukase, Graduate School of Science, Osaka Universität, Osaka, Japan
Ionomycin	Molecular Probes, Eugene, USA
<i>L. lactis</i> G121	zur Verfügung gestellt von Ania Hanuszkiewicz (FZ Borstel)
LPS	von <i>Salmonella enterica</i> sv. Friedenau, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Helmut Brade (FZ Borstel), Isolation durch die Phenol-Chloroform-Petroleum-Ether-Methode, Aufbewahrung der Stammlösung in 1 mg/ml Aqua dest.
MDP	bezogen von Shoichi Kusomoto (Osaka, Japan)
mouse anti-human TLR2	Genentech, South San Francisco, USA
Pam ₃ CSK ₄	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
PMA	CalBiochem, Darmstadt, Deutschland

2.4 ALLGEMEINE PUFFER UND MEDIEN

DMEM komplett	DMEM, <i>high Glucose, with L-Glutamin</i> (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS
FCS	inaktiviert für 30 min, 56 °C, sterilfiltriert
HBSS	1 x HBSS <i>without NaHCO₃</i> (PanBiotech, Aidenbach, Deutschland), 5 mM NaHCO ₃ pH 7,2
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Rxx10	RPMI 1640 <i>with L-Glutamin</i> (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS
Rxx10plus	RPMI 1640 <i>with L-Glutamin</i> (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS, 500 U/ml IL-4 (Strathmann, Hamburg, Deutschland), 500 U/ml GM-CSF (Strathmann, Hamburg, Deutschland)

2.5 BAKTERIEN

2.5.1 Kultivierung und Aufbereitung der Bakterien

- ♦ *A. Iwoffii* F78 Kulturmedium (*Super Broth* Medium): 10 g MOPS, 20 g Hefeextrakt, 30 g Trypton in 1 l H₂O, nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml 2 M Glucose, pH 7
- ♦ *L. lactis* G121 Kulturmedium (*Tryptic Soya Broth* (TSB) Medium): TSB Medium mit 0,3 % Hefeextrakt, pH 6,8 – 7,2
- ♦ *E. coli* F1111 9-41 Kulturmedium (Luria-Bertani Medium): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 l H₂O, pH 7
- ♦ *B. subtilis* DSM 618 Kulturmedium (Luria-Bertani Medium): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 l H₂O, pH 7
- ♦ Pen/Strep-Lösung: 1000 U/ml Penicillin, 1000 µg/ml Streptomycin in PBS

Für die Isolation von repräsentativen Kuhstallbakterien wurden Proben in Kuhställen von Bauernhöfen in Bayern (Deutschland) genommen und auf Agarplatten kultiviert. Die Probenentnahme und Isolierung der Bakterien erfolgte im Rahmen der ALEX Studie⁵⁸. Die Identifizierung der Stämme erfolgte anschließend mit Hilfe der 16S rRNA Sequenz (durchgeführt von Ania Hanuszkiewicz aus der LG Strukturbiochemie, Prof. Dr. Otto Holst, FZ Borstel). Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 wurden aufgrund ihrer hohen Abundanz in den Kuhställen ausgewählt. Die Sequenzen der beiden Stämme wurden bei GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) veröffentlicht und sind unter den Zugangsnummern DQ341260 (*A. Iwoffii* F78) und DQ341261 (*L. lactis* G121) zugänglich.

Die Kultivierung und Aufarbeitung der Bakterienpräparationen wurde von Ania Hanuszkiewicz (*A. Iwoffii* F78, *L. lactis* G121 und *E. coli* F1111 9-41) und Kay Vogel (*B. subtilis* DSM 618) aus der LG Strukturbiochemie, Prof. Dr. Otto Holst, FZ Borstel, übernommen. Die Bakterien wurden in den entsprechenden Medien bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert (*A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 bei 30 °C, *B. subtilis* DSM 618

und *E. coli* F1111 9-41 bei 37 °C) und dann entweder direkt im Versuch eingesetzt (lebende Bakterien) oder für die Inaktivierung der Bakterien weiter aufbereitet. Um eine längere Lagerungszeit der abgetöteten Präparationen zu gewährleisten, wurden die Bakterien zunächst pelletiert und in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die Abtötung der Bakterien durch folgende Methoden:

- A. Hitze-Inaktivierung: Hier erfolgte das Abtöten der Bakterien durch autoklavieren der Präparationen (20 min bei 121 °C).
- B. Antibiotika-Behandlung: Für die Abtötung der Bakterien mit Antibiotika wurden die Bakterienpräparationen für eine halbe Stunde bei 37 °C mit der Pen/Strep-Lösung inkubiert.

Der Erfolg der Inaktivierung wurde durch Ausstreichen der Präparationen auf den jeweiligen Agarplatten überprüft. Ebenso erfolgte die Bestimmung der *colony-forming units* (cfu) durch Ausstreichen der Bakterien auf den Agarplatten und Auszählen der gewachsenen Kolonien am folgenden Tag.

Um zu überprüfen, ob die inaktivierten Bakterien dieselbe Aktivität wie die lebenden Bakterien besitzen, wurde die Aktivierung von DCs durch lebende Bakterien mit der Aktivierung dieser Zellen durch abgetötete Bakterien verglichen. Dabei fiel auf, dass die durch Hitze abgetöteten *A. lwoffii* F78- und *L. lactis* G121-Präparationen deutlich weniger TNF- α - und IL-12p70-Freisetzung in DCs induzierten als lebende Bakterien (s. Abb. 2.1). Die Präparationen, die mit der Pen/Strep-Lösung abgetötet wurden, zeigten hingegen mehr oder weniger die gleiche Aktivierung wie die lebenden Bakterien. Dies zeigte sich sowohl durch die Aktivierung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (s. Abb. 2.2), als auch durch die Induktion der Freisetzung von bspw. TNF- α und IL-12p70 durch DCs (Daten nicht gezeigt).

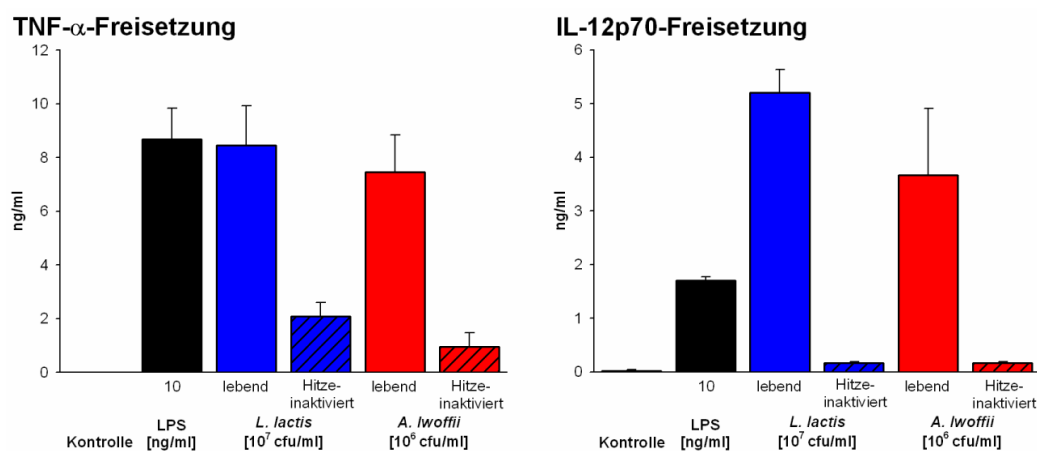


Abb. 2.1: Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit lebenden bzw. Hitze-inaktivierten *L. lactis* G121- und *A. lwoffii* F78-Präparationen.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Freisetzung von TNF- α und IL-12p70 wurde nach 24 h im Zellkulturüberstand bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=2).

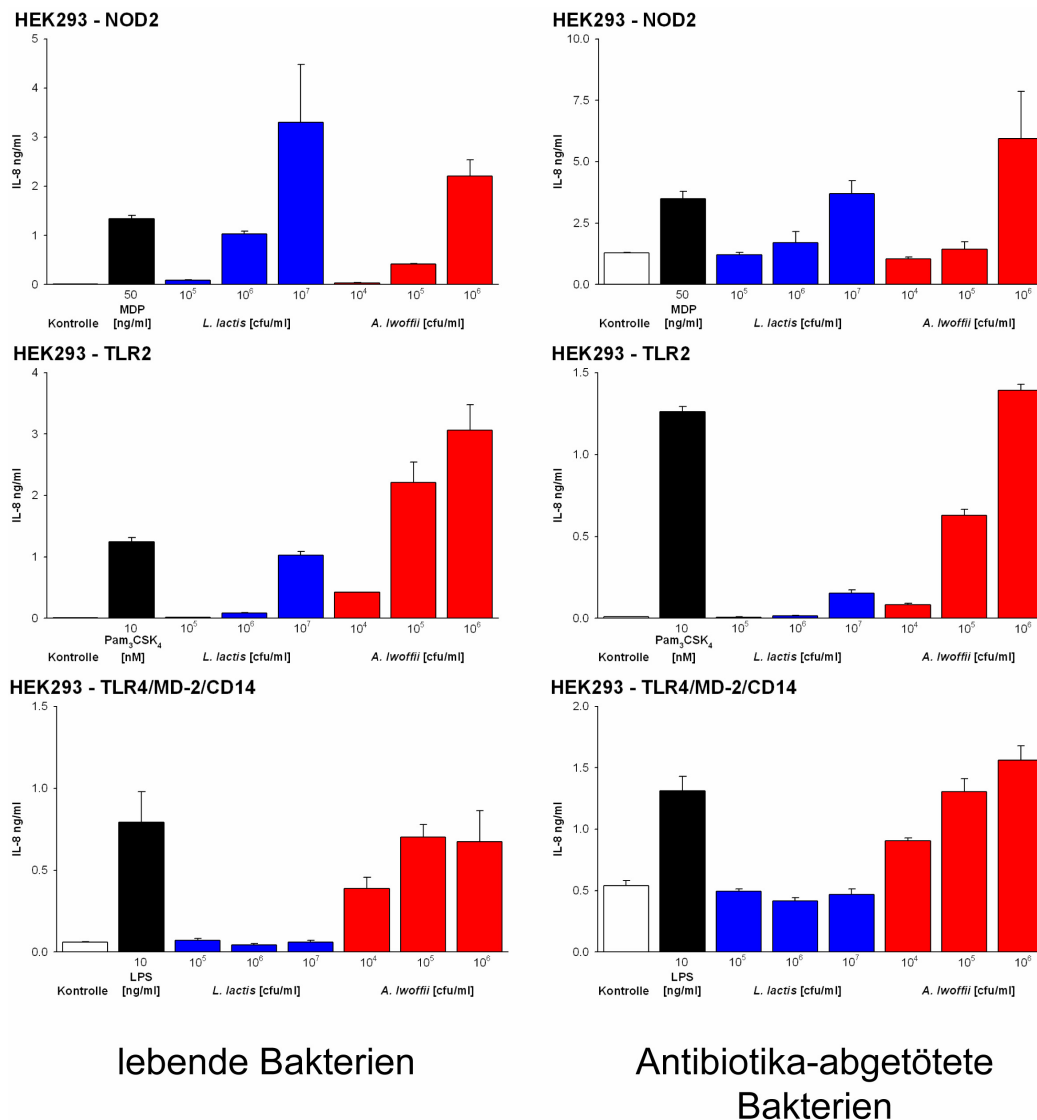


Abb. 2.2: Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch lebende und Antibiotika-abgetötete Bakterien.

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren transient transfiziert und anschließend mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 18 h wurde die Aktivierung der Zellen anhand der IL-8-Konzentration im Überstand bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten aus unabhängigen Experimenten (n=3).

Da gezeigt werden konnte, dass sich die mit Antibiotika-abgetöteten Bakterien bezogen auf die in DCs induzierte Aktivität nicht von den lebenden Bakterien unterschieden, wurden die Versuche zumeist mit diesen Präparationen durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben wurden in allen dargestellten Versuchen die mit Antibiotika-abgetöteten Bakterien mit einer Konzentration von 10⁶ cfu/ml verwendet. Für die *in vivo*-Mausversuche (s. Kapitel 2.6.1; Seite 29) wurden die Bakterien wie oben beschrieben kultiviert und anschließend lyophilisiert, da zum einen ein Transport nach Marburg erfolgen musste und zum anderen eine Behandlung über einen langen Zeitraum mit denselben Bakterien gewährleistet sein sollte. In Marburg wurden die Bakterien dann erst kurz vor Gebrauch wieder aufgenommen

und verwendet.

2.5.2 FITC-Markierung der Bakterien

- ♦ FITC-Lösung (frisch angesetzt): 10 mg FITC gelöst in 10 ml Na₂CO₃ + 0,05 % Tween80
- ♦ PBS/Tween20: 0,05 % Tween20 in PBS

Für die Markierung mit FITC wurden 10⁸ cfu der zu färbenden Bakterien in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, durch Zentrifugation bei 14.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C) pelletiert und in 1 ml der FITC-Lösung aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C (im Dunkeln auf dem Schüttler) wurden die Bakterien mit PBS/Tween20 solange gewaschen bis der Überstand keine Färbung mehr aufwies (mind. 3x). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Bakterien in PBS aufgenommen und bei 4 °C im Dunkeln gelagert (maximal 2 Wochen).

2.6 VERSUCHSTIERE

Die Tierversuche wurden unter Leitung von PD Dr. Holger Garn und Dr. Nicole Blümer in der Abteilung der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik der Medizinischen Fakultät der Philipps Universität in Marburg durchgeführt. Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Giessen genehmigt.

Pathogenfreie, 6-8 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden unter standardisierten Tierhausbedingungen gehalten und die Wasser- und Futtermittellversorgung (OVA-frei) erfolgte *ad libitum*.

2.6.1 Sensibilisierung, Behandlung und Allergenprovokation der Mäuse

Die Mäuse wurden durch drei intraperitoneale Injektionen mit 10 µg OVA *Grade VI* an Tag 0, 7 und 14 sensibilisiert. Dafür wurde das OVA an 1,5 mg Al(OH)₃ adsorbiert und in 200 µl PBS aufgenommen. Um eine lokale allergische Antwort der Lunge zu induzieren, wurden die Tiere, wie bei Wegmann *et al.* beschrieben, an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag 19, 20 und 21) für 20 Minuten über die Atemwege mit OVA-Aerosol [1 % w/v OVA in PBS] provoziert¹⁴⁶. Die Kontrollgruppe erhielt sowohl während der Sensibilisierung als auch während der Provokation PBS.

Für die Bakterienbehandlung wurden die Mäuse anästhesiert und erhielten intranasal 10⁸ cfu *L. lactis* G121, *A. lwoffii* F78 oder PBS als Kontrolle. Die Behandlung fand, beginnend 10 Tage vor der ersten Sensibilisierung, während der gesamten Sensibilisierungs- und Provokationsphase dreimal pro Woche statt. Für einen genauen Überblick über das Behandlungsschema siehe auch Abb. 2.3.

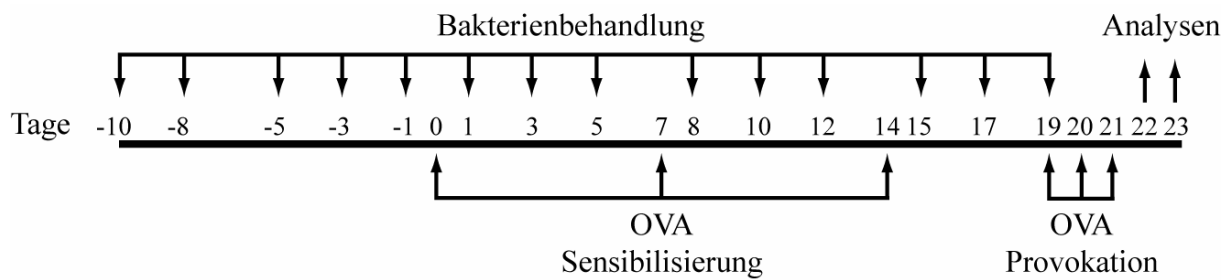


Abb. 2.3: Sensibilisierungs- und Behandlungsschema des OVA-Akutmodells.

2.6.2 Differenzielle Zellzählung in der Broncho-alveolären-Lavage-Flüssigkeit

48 h nach der letzten Allergenprovokation wurde die Broncho-alveoläre-Lavage (BAL), wie bei Neuhaus-Steinmetz *et al.* beschrieben, durchgeführt und die Broncho-alveoläre-Lavage-Flüssigkeit (BALF) gewonnen¹⁴⁷. Die Gesamtleukozytenzahl wurde mit Hilfe eines automatischen Casy TT Zellzählers (Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland) bestimmt. Die BALF Zellen wurden bei 300 g zentrifugiert, mit Methanol fixiert und anschließend mit Diff-Quick (DADE Diagnostics, Unterschleissheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers angefärbt. Die Analyse der BALF erfolgte dann an einem Lichtmikroskop, wobei für die differentielle Zellzählung jeweils zweimal hundert Leukozyten gezählt wurden.

2.6.3 Lungenhistologie

- ◆ Congo Red-Lösung: 0,5 % Congo Red (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 50 %igem Ethanol

Die Lungen der Tiere wurden *ex situ* mit 4 % (w/v) Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurde das Lungengewebe in Paraffin eingebettet und 3 µm Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) oder der Periodsäure-Schiff Reaktion (PAS) gefärbt. Für die Congo Red-Färbung wurden die Schnitte zunächst für 20 min in der Congo Red-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10 Mal in alkalisches Ethanol getaucht und zwischendurch mit destilliertem Wasser gewaschen. Letztendlich erfolgte eine Gegenfärbung mit Weigerts Hämtoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland).

2.6.4 Analyse der Atemwegsreaktivität

Die nicht invasive Messung des Atemzugvolumens wurde nach Gabe von steigenden Mengen an β -Methacholin mit Hilfe eines Ganzkörper- Plethysmographen, wie bei Wegmann *et al.* beschrieben, durchgeführt¹⁴⁸. Dabei wurde die Methacholinkonzentration ermittelt, die eine 50 %ige Reduktion des Ausgangsatemzugvolumens verursachte (MCH_{50}).

2.7 ZELLKULTUR

2.7.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen (MNCs)

Die Isolierung humaner MNCs erfolgte mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten über eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurde heparinisieretes Vollblut der Spender (20 E/ml Liquemin N25000, Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zu gleichen Teilen mit HBSS gemischt und in 50 ml Röhrchen über 10 ml Ficoll-Paques (LSM 1077 Separation Medium, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) geschichtet. In der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum wurden die Zellen für 40 min bei 400 g (Abstoppen ohne Bremse) und Raumtemperatur aufgetrennt¹⁴⁹. Nach der Zentrifugation wurde der Plasmaüberstand abgesaugt und die MNCs, die sich in der Interphase ansammeln, geerntet. Die so gewonnenen MNCs wurden zweimal mit *Hanks buffered salt solution* (HBSS) gewaschen (10 min, 400 g, 4 °C) und die Zellzahl wurde bestimmt (s. Kapitel 2.7.11, Seite 35).

2.7.2 Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten mittels Elutriation

Für die Gewinnung der Monozyten mit Hilfe der Elutriation¹⁵⁰ (Gegenstrom-Zentrifugation, JE-6B-Elutriator, Beckmann Instruments, München, Deutschland) wurden die isolierten MNCs (s. 2.7.1) in HBSS mit 0,1 % BSA mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen. Die Zellen wurden bei laufendem Rotor (1720 g, konstant für die gesamte Auftrennung) und einer Fließgeschwindigkeit von 25 ml/min in die Trennkammer des Elutriators eingeladen. Die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstroms wurde während der folgenden Zellauftrennung kontinuierlich erhöht (bis 50 ml/min), wodurch zunächst kleinere (Lymphozyten) und dann größere Zellen (Monozyten) aus der Kammer gespült werden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit Hilfe des *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) überprüft (s. Kapitel 2.9, Seite 36), dabei lag die Reinheit der so gewonnenen Monozyten und Lymphozyten für alle Versuche über 80 %, bei einem Großteil über 90 %.

2.7.3 Isolierung humaner Monozyten und Lymphozyten mittels Plastikadhärenz

Um Monozyten mit Hilfe der Plastikadhärenz aufzureinigen, wurden die isolierten MNCs (s. Kapitel 2.7.1, Seite 31) in Rxx10 mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und in 6-well Platten (5 ml/well) oder Zellkulturflaschen (12 ml je 75 cm² Flasche) ausgesät. Nach 1-2 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) wurden alle nicht adhärenen Zellen (vornehmlich Lymphozyten) mit warmem PBS abgespült. Die in der Platte bzw. Flasche verbliebenen Zellen (vornehmlich Monozyten) wurden dann wie in Kapitel 2.7.4, Seite 32 und

die Lymphozyten wie in Kapitel 2.7.5, Seite 32 beschrieben weiterverarbeitet. Die Reinheit der so gewonnenen Monozyten lag bei allen Versuchen über 70 %.

2.7.4 Differenzierung humaner DCs aus Monozyten

Humane DCs wurden aus Monozyten mit der von Sallusto und Lanzavecchia beschriebenen Methode differenziert¹⁵¹. Dafür wurden die durch die Elutriation gewonnenen Monozyten (s. Kapitel 2.7.2, Seite 31) mit 10^6 Zellen/ml in Rxx10plus aufgenommen, in 6-well Platten (5 ml/well) ausgesät und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Die durch Plastikadhärenz gewonnenen Monozyten (s. Kapitel 2.7.3, Seite 31) erhielten nach dem letzten Waschschrift ebenfalls Rxx10plus und wurden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte des Medium durch neues Rxx10plus ersetzt. Nach 6-8 Tagen wurden die DCs geerntet und für die Stimulation in Rxx10plus mit 10^6 Zellen/ml ausgesät. Die Differenzierung wurde anhand bestimmter Oberflächenmarker im FACS überprüft (s. auch Kapitel 2.9, Seite 36). In Abb. 2.4 ist anhand eines repräsentativen Experimentes die Differenzierung von Monozyten in DCs dargestellt. Während Monozyten eine hohe Expression von CD14 aufweisen, sind die DC-Marker CD1a und CD209 (DC-SIGN) nicht auf der Oberfläche detektierbar. Nach der Differenzierung in DCs, ist hingegen kein CD14, dafür aber CD1a und CD209 nachweisbar.

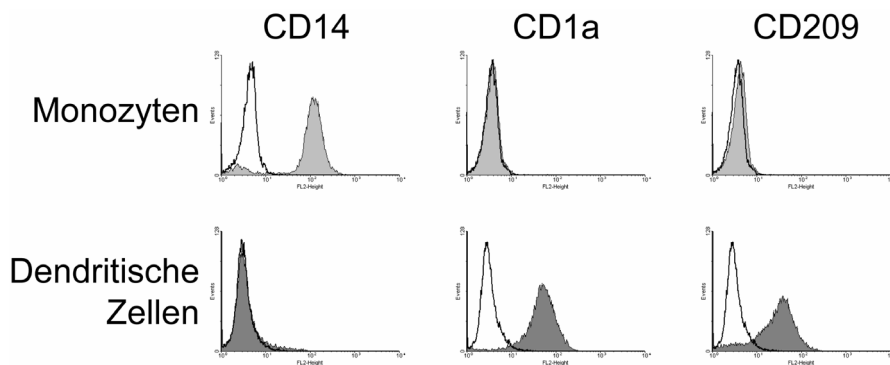


Abb. 2.4: Differenzierung humaner DCs aus Monozyten.

Die Expression von CD14, CD1a und CD209 auf humanen Monozyten und aus Monozyten generierten DCs wurde mittels FACS analysiert. Die schwarzen, offenen Histogramme zeigen die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörpers und die gefüllten Histogramme (hellgrau bei Monozyten und dunkelgrau bei DCs) zeigen die Expression des jeweiligen Oberflächenmarkers. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender.

2.7.5 Isolierung naiver T-Zellen aus Lymphozyten

Die aus humanen MNCs isolierten Lymphozyten (s. Kapitel 2.7.2, Seite 31 bzw. Kapitel 2.7.3, Seite 31) wurden entweder direkt weiter aufgereinigt (s. unten) oder mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Rxx10 aufgenommen, in 6-well Platten (5 ml/well)

ausgesät und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Spätestens 7 Tage nach der Gewinnung der Lymphozyten erfolgte dann die Isolierung der naiven T-Zellen mit dem *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Mit Hilfe dieses Kits werden alle anderen Zellen (bspw. B-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten etc.) durch Biotin-gekoppelte Antikörper markiert und mit Hilfe von Anti-Biotin MicroBeads entfernt. Die magnetische Aufreinigung erfolgte mit dem AutoMACS™ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Der Erfolg der Aufreinigung wurde anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD45RA im FACS überprüft (s. Abb. 2.5). Bei allen Experimenten konnte eine Reinheit von über 85 % erzielt werden. Die so gewonnenen naiven T-Zellen wurden mit 10⁶ Zellen/ml (in Rxx10) in 24-*well* (1 ml), 48-*well* (500 µl) oder 96-U-*well* (200 µl) Platten ausgesät und am nächsten Tag entsprechend stimuliert (s. Kapitel 2.7.7, Seite 34).

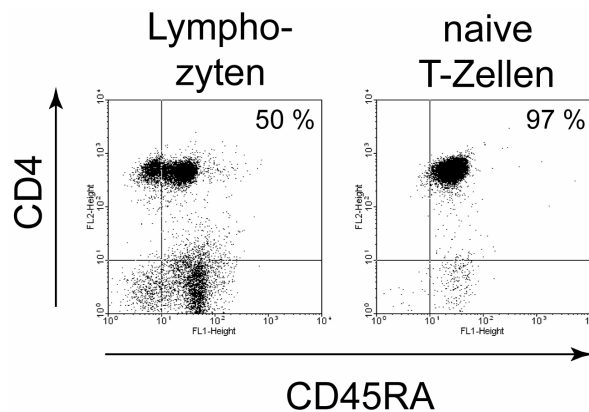


Abb. 2.5: Isolierung naiver T-Zellen aus Lymphozyten.

Naive T-Zellen wurden mit Hilfe des *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit* aufgereinigt und die Reinheit über die Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD45RA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender.

2.7.6 Stimulation humaner DCs

Die differenzierten humanen DCs (s. Kapitel 2.7.4, Seite 32) wurden für die verschiedenen Experimente mit 10⁶ Zellen/ml (in Rxx10) in 24-*well* (1 ml), 48-*well* (500 µl) oder 96-*well* (200 µl) Platten bzw. in µ-Slide VI (150 µl) ausgesät und vor der Stimulation für mind. 2 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Die bei dem jeweiligen Experiment angegebenen Stimuli wurden in Rxx10 verdünnt und im Verhältnis 1:10 zu den Ansätzen gegeben, so dass die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde. Je nach Experiment wurde nach Ende der Stimulation (I) der Überstand gewonnen und für spätere Analysen eingefroren (ELISA, s. Kapitel 2.8, Seite 35), (II) die Zellen pelletiert und für die spätere RNA-Isolierung eingefroren (Kapitel 2.12.1, Seite 40), (III) die Zellen pelletiert und für die FACS-Analysen verwendet (FACS-Analysen, s. 2.9, Seite 36), (IV) die Zellen pelletiert und mit Laemmli-Puffer lysiert

(Western Blot, s. Kapitel 2.10, Seite 37), (V) die Zellen pelletiert und in Rxx10 resuspendiert (Kokultur und Rekultur, s. Kapitel 2.7.7 bzw. 2.7.8, Seite 34) oder (VI) die Zellen für die Konfokale Laserscanmikroskopie weiterverarbeitet (s. Kapitel 2.11, Seite 39).

2.7.7 Kokultur humaner DCs mit naiven T-Zellen

Humane DCs wurden wie in Kapitel 2.7.6, Seite 33 beschrieben stimuliert und die Zellen nach der im jeweiligen Experiment angegebenen Zeit pelletiert, in Rxx10 aufgenommen und im Verhältnis 1:10 (DC:TC) zu den naiven T-Zellen gegeben (96-*U-well* Platten). Nach 4-6 Tagen der Kokultur wurden die T-Zellen mit PMA und Ionomycin reaktiviert und nach weiteren 24 h die Zytokinfreisetzung im ELISA gemessen. Bei der intrazellulären Analyse (FACS) der Zytokinproduktion fand die Reaktivierung der Zellen in Gegenwart von Brefeldin A statt, um die Ausschüttung der Zytokine zu verhindern.

Für die Analyse der RNA-Expression wurde der Überstand der DCs gewonnen und im Verhältnis 1:2 zu den naiven T-Zellen gegeben. Nach 24 h wurden die T-Zellen geerntet und für die spätere RNA-Isolierung eingefroren.

2.7.8 Rekultur humaner DCs

Für die Rekultur humaner DCs wurden diese wie für die Kokultur stimuliert, pelletiert (s. Kapitel 2.7.7, Seite 34) und in Rxx10 aufgenommen. Dann folgte eine weitere Inkubation der Zellen in 96-*well* Platten (200 µl) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) für die im jeweiligen Experiment angegebene Zeit. Der Überstand nach der ersten und zweiten Inkubation wurde gewonnen und für spätere Analysen der Zytokinkonzentration eingefroren.

2.7.9 HEK293-Zellen (*human embryonic kidney cells*)

HEK293-Zellen wurden in DMEM komplett in Zellkulturflaschen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen geerntet, in neue Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert.

2.7.10 Transfektion und Stimulation von HEK293-Zellen

Die Transfektion von Fremd-DNA in die HEK293-Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme des Transfektionsreagens Polyfect (Qiagen, Hilden, Deutschland). Zunächst wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zellen in 150 µl DMEM komplett in 96-*well* Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Polyfect nach Angaben des Herstellers mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die eingesetzte Konzentration der Plasmide ist in Tab. 2.1 aufgeführt.

24 h nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen gewaschen und mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen

und mit Hilfe des IL-8-ELISA die Aktivierung der Zellen analysiert. Für die Bestimmung der Aktivierung des Interferon- β Promoters und *Interferon-regulatory factor 3* (IRF3) wurden die Zellen nach 16 h lysiert und die Aktivität der Luciferase-gekoppelten Reporterplasmide (UAS-luciferase und pRL-TK) mittels Chemilumineszenz (Dual-luciferase System, Promega) in einem Bioluminometer (Berthold Technologies, Wildbad, Deutschland) bestimmt.

Tab. 2.1: Verwendete Plasmide im HEK293-System.

Plasmid	Bezugsquelle	eingesetzte Konzentration
TLR2	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	200 ng/ml
TLR4	Dr. P. Nelson, Seattle, USA	200 ng/ml
CD14	Dr. D. T. Golenbock, Worcester, USA	25 ng/ml
MD-2	K. Miyake, Tokyo, Japan	25 ng/ml
NOD1	Dr. P. Rosenstiel, Kiel, Deutschland	200 ng/ml
NOD2	Dr. P. Rosenstiel, Kiel, Deutschland	200 ng/ml
Gal4IRF3	Dr. K. Fitzgerald, Worcester, USA	400 ng/ml
p110-IFN β	Dr. K. Fitzgerald, Worcester, USA	400 ng/ml
UAS-luciferase	Dr. K. Fitzgerald, Worcester, USA	400 ng/ml
pRL-TK	Promega, Madison, USA	50 ng/ml

2.7.11 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl der aus humanem Blut gewonnenen Zellen (MNCs, Monozyten, Lymphozyten und DCs) erfolgte mit Hilfe eines Zählgerätes (Sysmex Platelet Counter LP-100, Sysmex, Hamburg, Deutschland). Dafür wurden die Zellen in Zählösung (Cellpack PK-30L, Sysmex, Hamburg, Deutschland) verdünnt. Die Zellkonzentration in Zellen/ml ergab sich aus der Verdünnung der Zellen und dem Kammerfaktor von 200.

HEK293-Zellen wurden mit Trypanblau-Lösung (GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (Braun, Ludwigshafen, Deutschland) ausgezählt.

2.8 ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)

2.8.1 OVA-spezifische Immunglobuline

- ♦ Waschlösung: 0,1 % Tween20 in PBS
- ♦ BSA-Lösung: 1 % (w/v) BSA in PBS

Diese Versuche wurden unter Leitung von PD Dr. Holger Garn und Dr. Nicole Blümer in der Abteilung der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik der Medizinischen Fakultät der Philipps Universität in Marburg durchgeführt.

Den Versuchstieren wurde einen Tag nach der letzten OVA-Provokation (s. Kapitel 2.6.1, Seite 29) Blut entnommen und im daraus gewonnenen Serum die Konzentration an OVA-

spezifischen Immunglobulinen gemessen. Dafür wurden 96-well Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) über Nacht bei 4 °C mit 20 mg/ml OVA beschichtet. Die Platten wurden mit Waschlösung gewaschen und freie Bindungsstellen mit BSA-Lösung für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die Serumproben bzw. monoklonale OVA-spezifische Immunglobuline [IgE (Serotec, Düsseldorf, Deutschland), IgG1 (Dianova, Hamburg, Deutschland) und IgG2a (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)] als Standard auf die Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden gewaschen und mit biotin-konjugierten anti-Maus IgE, IgG1 bzw. IgG2a Antikörpern (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Nach 2 h wurden freie Antikörper gewaschen und die Platten für 30 min bei Raumtemperatur mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert. Abschließend erfolgte die Entwicklung der Platten mit Peroxidasesubstrat (Roche, Mannheim, Deutschland) und die Messung der Absorption mit Hilfe eines ELISA-Readers (Tecan, Crailsheim, Deutschland). Anhand der entsprechenden Antikörperstandards wurde dann die Immunglobulinkonzentration der Serumproben ermittelt.

2.8.2 Zytokine

Für die Bestimmung der Konzentration humaner Zytokine wurden die unten aufgeführten ELISA Kits verwendet. Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Absorption der entwickelten ELISA Platten wurde mit Hilfe eines Tecan Sunrise Readers (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 550 nm gemessen und mit der Software Magellan 2 ausgewertet. Die Durchführung des IL-4-ELISA wurde von Achim Gronow aus der LG Zelluläre Allergologie von Prof. Dr. Helmut Haas am Forschungszentrum Borstel übernommen.

IL-8	BioSource (Flynn Road, USA)
TNF- α	Intex AG (Weil am Rhein, Deutschland)
IL-12p70	eBioscience (San Diego, USA)
IL-4	Diaclone (Besancon, Frankreich)
IFN- γ	BioSource (Flynn Road, USA)

2.9 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (*FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING, FACS*)

- ♦ Azid-PBS: 0,1 % (w/v) NaN₃ in PBS
- ♦ 3 % PFA: 3 % para-Formaldehyd in PBS

Die zu markierenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, bei 4 °C und 1.500 rpm (Hettich Zentrifuge Rotana 45RC) für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Für die Markierung wurden die Antikörper entsprechend Tab. 2.2 in Azid-PBS verdünnt und mit

einem Volumen von 50 μl zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen mit Azid-PBS gewaschen und anschließend für die Messung am FACS mit Azid-PBS wieder aufgenommen. Erfolgte die Messung der Proben nicht unmittelbar, wurden die Proben zusätzlich mit 3 %igem PFA versetzt, um die Markierung zu fixieren. Innerhalb von sieben Tagen wurden die Proben am FACS-Calibur analysiert und die Daten mit Hilfe der Software WinMDI ausgewertet.

Tab. 2.2: Antikörper für die FACS-Analysen.

Antikörper	Bezugsquelle	Isotyp	Fluorochrom	eingesetzte Verdünnung
Maus IgG1	BeckmanCoulter	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Maus IgG2a	BeckmanCoulter	Maus IgG2a	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD1a	Immunotech	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD14	BeckmanCoulter	Maus IgG2a	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD209	BeckmanCoulter	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD40	Immunotech	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD80	Immunotech	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD86	BD PharMingen	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human MHC-II	CoulterCorp.	Maus IgG2a	PE	0,15 μl auf 50 μl
Anti-human CD4	ImmunoTools	Maus IgG1	PE	3 μl auf 50 μl
Anti-human CD45RA	ImmunoTools	Maus IgG2b	FITC	3 μl auf 50 μl
Anti-human IL-4	eBioscience	Ratte IgG1	PE	2,5 μl auf 50 μl
Anti-human IFN- γ	eBioscience	Maus IgG1	FITC	1 μl auf 50 μl

2.10 WESTERN BLOT

2.10.1 Herstellung von Zelllysaten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

- ♦ Laemmli-Puffer: 60 mM Tris pH 6,8, 100 mM DTT, 5 % Glycerol, 2 % SDS, 0,001 % Bromphenolblau

Die Zellen wurden mit den in den jeweiligen Experimenten angegebenen Stimulantien behandelt. Nach entsprechenden Zeiträumen wurde die Aktivierung auf Eis gestoppt, die Zellen gewonnen und mit Laemmli-Puffer lysiert. Die gewonnenen Proteinlysate wurden für 5 min bei 95 °C reduziert und anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.10.2 SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

- ♦ Laufpuffer: 0,25 % NuPAGE™ Antioxidant (Invitrogen, Leek, Niederlande) in 1x NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- ♦ Transferpuffer: 0,1 % NuPAGE™ Antioxidant (Invitrogen, Leek, Niederlande), 10 % Methanol in 1x NuPAGE™ Transfer Buffer (Invitrogen, Leek, Niederlande)

Die Proteinlysate (s. 2.10.1, Seite 37) und ein Größenstandard (PrecisionPlus Protein™ Standard Dual Color, BioRad Laboratories, München, Deutschland) wurden auf NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Gele (Invitrogen, Leek, Niederlande) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 1 h bei 200 Volt unter reduzierenden Bedingungen mit dem Laufpuffer. Für den immunhistochemischen Nachweis wurden die so aufgetrennten Proteine im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran (Nitrocellulose Transfer Membrane Proton®, Whatman®, Schleich und Schuell, Dassel) transferiert. Das Blotting erfolgte mit der Novex Mini-Cell (Invitrogen, Leek, Niederlande) in Transferpuffer für 2 h bei 30 Volt nach Herstellerangaben.

2.10.3 Immunhistochemischer Nachweis der Proteine

- ♦ T/PBS: 0,1 % Tween20 in PBS
- ♦ Blockpuffer: 50 % Blockpuffer (Odyssey Li-Cor, Lincoln, USA) in PBS
- ♦ Antikörperpuffer: 50 % Blockpuffer (Odyssey Li-Cor, Lincoln, USA), 0,1 % Tween20 in PBS

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese zunächst kurz in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit Blockpuffer, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Für den Nachweis der Proteine wurde die Membran mit entsprechendem Primärantikörper in Antikörperpuffer (s. Tab. 2.3) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit T/PBS erfolgte am nächsten Tag die Detektion der Proteine. Dafür wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit den Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (s. Tab. 2.3) in Antikörperpuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran mit T/PBS wurden die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe des Odyssey® Infrared Imaging System (Li-Cor, Lincoln, USA) bei 700 und 800 nm eingescannt. Die Auswertung erfolgte mit der Odyssey® Software v1.2 (Li-Cor, Lincoln, USA).

Tab. 2.3: Antikörper für die Western Blots.

Primärantikörper	Bezugsquelle	eingesetzte Verdünnung
<i>rabbit</i> anti-human p38	Cell Signaling	1:1000
<i>mouse</i> anti-human phospho p38	Cell Signaling	1:10000
Sekundärantikörper		
<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> IRDye800	Molecular Probes	1:10000
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> AlexaFluor680	Molecular Probes	1:10000

2.11 KONFOKALE LASERSCANMIKROSKOPIE

- ♦ TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4
- ♦ Permeabilisierungspuffer: 0,25 % Triton X-100 in TBS
- ♦ Antikörperpuffer: 10 % BSA bzw. 1 % BSA in PBS
- ♦ 4 % PFA (immer frisch aufgetaut): 4 % para-Formaldehyd in PBS

Für den Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie wurden die Zellen wie in 2.7.6, Seite 33 beschrieben, ausgesät (48-well Platten oder μ -Slide VI) und entsprechend stimuliert. Von den in 48-well Platten stimulierten Zellen wurden Cytospins angefertigt. Dafür wurden die Zellen nach den im jeweiligen Experiment angegebenen Zeiten geerntet und in Antikörperpuffer (10 % BSA) aufgenommen. Anschließend wurden ca. 75.000 Zellen auf die Objektträger zentrifugiert (Cytospin 2, Shandon, Oberhausen, Deutschland) und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger entweder direkt für die Färbung verwendet oder zum späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Im Falle der μ -Slides VI wurde die Färbung und Detektion der Proteine direkt in den μ -Slides VI durchgeführt.

Der histochemische Nachweis der Proteine erfolgte nach folgendem Protokoll mit den in Tab. 2.4 aufgelisteten Antikörpern und Farbstoffen.

- (1) Zellen 1 x mit TBS waschen
- (2) 15 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA fixieren
- (3) Zellen 2 x mit TBS waschen
- (4) 5 min bei Raumtemperatur mit Permeabilisierungspuffer inkubieren
- (5) Zellen 2 x mit TBS waschen
- (6) 10 min bei mit Antikörperpuffer (10 % BSA) blockieren
- (7) Zellen 2 x mit TBS waschen
- (8) mit Primärantikörper in Antikörperpuffer (1 % BSA) inkubieren
(*rabbit* anti human c-rel über Nacht, alle anderen für 2 h)
- (9) Zellen 3 x mit TBS waschen
- (10) 1 h mit Sekundärantikörper in Antikörperpuffer (10 % BSA) inkubieren (ab jetzt im Dunkeln)
- (11) Zellen 3 x mit TBS waschen
- (12) Färbung des Zellkerns: 20 min bei Raumtemperatur mit TOTO-3-iodid in Antikörperpuffer (1 % BSA) inkubieren
- (13) Zellen 1 x mit TBS waschen
- (14) 5 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA fixieren
- (15) Zellen 2 x mit TBS waschen
- (16) mit Hilfe des SlowFade[®] Kits (Molecular Probes, Eugene, USA) nach Angaben des Herstellers für die Lagerung behandelt
- (17) Lagerung bis zur Messung bei 4 °C

Die so gefärbten Zellen wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops TCS SP (Leica, Bensheim, Deutschland) mit der Software TCS NT aufgenommen. Die Auswertung wurde mit der Software Adobe Photoshop v. 8.0.1 durchgeführt.

Tab. 2.4: Antikörper und Farbstoffe für die Konfokale Laserscanmikroskopie.

Primärantikörper	Bezugsquelle	eingesetzte Verdünnung
<i>mouse</i> anti human p65	SantaCruz Biotechnology	1:75
<i>rabbit</i> anti human c-rel	Cell Signaling	1:50
<i>mouse</i> anti-human TLR2	Genentech Atlims	1:20
<i>mouse</i> IgG1	BD Biosciences	1:250
Sekundärantikörper		
<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> Alexa488	Molecular Probes Eugene	1:300
<i>goat</i> anti- <i>mouse</i> Alexa546	Molecular Probes Eugene	1:300
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> Alexa488	Molecular Probes Eugene	1:300
<i>goat</i> anti- <i>rabbit</i> Alexa488	Molecular Probes Eugene	1:300
Farbstoffe		
TOTO-3-iodid	Invitrogen	1:500

2.12 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.12.1 Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA)

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus T-Zellen und DCs erfolgte mit dem *Absolutely RNA Miniprep* Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde während der Isolierung ein DNase-Verdau durchgeführt und die RNA-Konzentration mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

2.12.2 Reverse Transkription

- ♦ RNase Inhibitor: RNaseOut (Invitrogen, Leek, Niederlande)
- ♦ dNTP: je 10 mM (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- ♦ Oligo dT₁₂₋₁₈: 10 nM Mischung aus Oligo dT-Primern mit 12, 15 und 18 bp

Die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase Superscript™ III (Invitrogen, Leek, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Die cDNA wurde im Anschluss bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Zur Überprüfung der RNA auf genomische Verunreinigungen wurden zudem RNA-Proben ohne Zugabe von Reverser Transkriptase (RT negativ) mitgeführt. Mit Hilfe dieser Proben kann anhand nicht Intron-überspannender Primer (s. auch Tab. 2.6, Seite 42) die genomische Verunreinigung überprüft werden. In der vorliegend Arbeit wurde diese

Überprüfung mit Hilfe der Primer für GAPDH (s. auch Tab. 2.6, Seite 42) durchgeführt. Dabei wies keine der verwendeten RNA Proben störende Mengen an genomischer DNA auf.

2.12.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Überprüfung der cDNA auf genomische Verunreinigungen erfolgte mit Hilfe der PCR. Hier wird das zu untersuchende Gen unter Zuhilfenahme von bestimmten sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) mit einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfacht. Die PCR zum Nachweis von GAPDH wurde mit dem Promega PCR Mix (vorgefertigter Mix aus Taq DNA-Polymerase und dNTPs, Promega, Madison, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde folgendes Programm im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet, wobei die Schritte 2-4 35-mal wiederholt wurden:

1. Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2. Denaturierung	30 s	94 °C
3. Anlagerung der Primer	40 s	60 °C
4. Elongation	40 s	72 °C
5. Finale Elongation	2 min	72 °C
6. Abkühlen	auf 4 °C	

Die amplifizierte cDNA wurde anschließend mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (s. 2.12.5, Seite 43) charakterisiert.

2.12.4 Quantitative *Real-time*-PCR

Mit Hilfe der quantitativen *Real-time*-PCR kann die relative Menge einer bestimmten mRNA in einer Probe anhand von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zwei unterschiedliche Systeme nach Angaben des Herstellers verwendet: (I) SYBR Green (Light-Cycler[®] Fast Start DNA Master^{Plus} SYBR Green, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei 530 nm emittiert, wenn er in doppelsträngige DNA interkaliert und damit die vorhandene Menge des Produktes anzeigt und (II) sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden (UniversalProbeLibrary Sonden mit LightCycler[®] TaqMan[®] Master), die ebenfalls bei 530 nm emittieren, wenn sie die Zielsequenz gebunden haben.

Alle Experimente wurden am LightCycler[®] 2.0 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in 20 µl Kapillaren (LightCycler[®] Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die dabei verwendeten Oligonukleotide (Primer) und entsprechenden Programme sind in Tab. 2.5 bzw. Tab. 2.6 aufgeführt.

Tab. 2.5: Verwendete LightCycler®-Programme.^A

Primer	Anlagerungs- temperatur	Elongationszeit	Fluoreszenz- aufnahme	Methode
CCL5	65-58	4	80	SYBR Green
GATA3	63-53	4	80	SYBR Green
HPRT	63-53	7	78	SYBR Green
ICAM-1	63-60	5	90	SYBR Green
IFN- β	63-53	6	79	SYBR Green
IFN- γ	65-58	6	75	SYBR Green
IL-12p35	60	30	72	TaqMan
IL-12p40	63-53	7	78	SYBR Green
IL-23p19	63-53	6	82	SYBR Green
TBet	63-53	4	80	SYBR Green
TIM-3	65-58	4	79	SYBR Green
TNF	63-53	8	86	SYBR Green

^A Bei allen Primern wurde eine initiale Denaturierung für 10 min bei 95 °C durchgeführt. Zudem wurde bei allen Primern außer bei IL-12p35 eine *TouchDown PCR* durchgeführt. Hierbei wurde die Anlagerungstemperatur pro Zyklus um 0,5 °C erniedrigt, die Anlagerungszeit betrug 10 s. Die Fluoreszenz wurde bei den angegebenen Temperaturen nach jedem Zyklus (insgesamt 45 Zyklen) aufgenommen. Während der Schmelzkurve, die bei allen Primern durchgeführt wurde, wurde die Temperatur von 65 °C mit einer Geschwindigkeit von 0,1 °C/s auf 95 °C erhöht und dabei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Für IL-12p35 wurde die UniversalProbeLibrary Sonde Nr. 50 (human) verwendet.

Tab. 2.6: Verwendete Primer.^A

Primer		Sequenz	Größe des Produktes (bp)	Intron- überspannend
CCL5	s	ACACCAGTGGCAAGTGCTC	65	Ja
	as	ACACACTTGGCGTTCTTTC		
GAPDH	s	GTCATCATCTCCGCCCTTCTGC	443	Nein
	as	GATGCCTGCTTCACCACCTTCTTG		
GATA3	s	TCAGACCACCACAACCACAC	113	Ja
	as	TCTTCATAGTCAGGGGTCTGTTAAT		
HPRT	s	GTCAGGCAGTATAATCCAAAGA	130	Ja
	as	GGGCATATCCTACAACAAACT		
ICAM-1	s	CCTTCCTCACCGTGTACTGG	90	Ja
	as	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC		
IFN- β	s	AAGCAGCAATTTTCAGTGTGAG	95	Nein
	as	CCTCAGGGATGTCAAAGTTCA		
IFN- γ	s	GTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTA	172	Ja
	as	TTTGGCTCTGCATTATTTTCTGT		
IL-12p35	s	CACTCCCAAACCTGCTGAG	86	Ja
	as	TCTTCAGAAGTGCAAGGGTAAA		
IL-12p40	s	AAAGGAAGATGGAATTTGGTC	161	Ja
	as	TGCTGCTTTTGACACTGAAT		
IL-23p19	s	CAGTGTGGAGATGGCTGTGA	106	Ja
	as	CCGATCCTAGCAGCTTCTCA		
TBet	s	GACTCCCCAACACAGGAG	118	Ja
	as	GGGACTGGAGCACAATCATC		
TIM-3	s	TGTTTTCACATCTTCCCTTGA	89	Ja
	as	GACCTCCGCTCTGTATTCCA		
TNF	s	CCTGTAGCCCATGTTGTAGCA	161	Ja
	as	TTGAAGAGGACCTGGGAGTAGA		

^A Es sind jeweils die Sequenzen der sense (s) und antisense (as) Primer aufgelistet.

Zur Auswertung wurde die LightCycler® Software v. 4.05 verwendet. Dabei wurden alle Proben gegen eine unabhängige Probe (Kalibrator) und gegen das *Housekeeping gene* HPRT, welches in allen Zellen zu gleichen Anteilen exprimiert wird, abgeglichen. Zudem wurden primerspezifische Standardkurven erstellt und damit die unterschiedlichen Effizienzen der Primer berücksichtigt. Die Identität des Produktes wurde mit Hilfe einer Schmelzkurve überprüft, wobei bei einem ersten Test der Primer die Größe des Produktes durch eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.12.5, Seite 43) verifiziert wurde.

2.12.5 Agarosegelelektrophorese

- ♦ TBE Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0
- ♦ 6 x Beladungspuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin in H₂O

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden die amplifizierten cDNAs anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dafür wurde die Agarose in einer Konzentration von 1,5 % (w/v) in TBE Puffer durch Aufkochen gelöst, mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht) versetzt und das Gel gegossen. Die cDNAs wurden 6:1 mit 6 x Beladungspuffer verdünnt, auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von ca. 100 Volt in TBE Puffer aufgetrennt. Zur Überprüfung der Größe wurde zudem ein Größenmarker (GeneRuler 100bp DNA ladder plus, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht (320 nm) mit Hilfe der ChemiDoc 2000 Geldokumentationsanlage (BioRad Laboratories, München, Deutschland) und der QuantityOne Software (BioRad Laboratories, München, Deutschland).

2.13 MICROARRAY

Die Durchführung der Microarray-Analysen fand in Kooperation mit Jörg Mages und Roland Lang am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der TU München statt. Die RNA-Proben (s. 2.12.1, Seite 40) wurden nach Anleitung des Herstellers vorbereitet und auf den Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. Mit Hilfe der Affymetrix GCOS Software wurden die Arrays eingescannt und die Daten in CEL-Dateien umgewandelt. Diese wurden dann mit Hilfe des *R affy* Pakets (bioconductor.org) mit dem RMA (Robusten Multiarray Analyse) Algorithmus normalisiert und in Expressionsdaten umgewandelt.

Die weitere Analyse dieser Expressionsdaten erfolgte mit Microsoft® Excel 2002, Cluster v. 3.0 (EisenLab Software) und TreeView v. 1.60 (EisenLab Software).

2.14 STATISTIK

Soweit nicht anders angegeben, sind Einzeldaten oder Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Im Fall der Mausversuche wurden *One-Way ANOVA* bzw. *Student's unpaired t-test* Analysen durchgeführt, um die Signifikanz zu ermitteln. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 ALLERGIEPRÄVENTIVE EIGENSCHAFTEN DER KUHSTALLBAKTERIEN IN EINEM *IN VIVO*-MAUSMODELL

Die in diesem Kapitel (Kapitel 3.1) aufgeführten Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation von PD Dr. Holger Garn und Dr. Nicole Blümer an der Philipps Universität in Marburg durchgeführt und ausgewertet und wurden bereits in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht (s. Seite 117). Die vorliegenden Ergebnisse stellen eine wichtige Grundlage für meine Arbeit dar, weswegen ich sie hier ebenfalls kurz darstellen möchte.

3.1.1 Reduzierte allergische Parameter nach Behandlung mit den Bakterien *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78

Um den Einfluss der beiden aus dem Kuhstall isolierten Bakterienstämme auf die Entstehung und Entwicklung von Allergien zu untersuchen, wurden Mäuse in einem Akut-Allergiemodell mit OVA sensibilisiert. Dabei wurden die Mäuse beginnend 10 Tage vor der Sensibilisierung und während der gesamten Sensibilisierungsphase alle zwei Tage intranasal mit 10^8 cfu der Bakterien behandelt, um die natürliche Exposition zu imitieren. Das genaue Behandlungsschema ist in Kapitel 2.6.1, Seite 30 aufgeführt. Zwei Tage nach der letzten Provokation wurde eine BAL durchgeführt und die Zellzusammensetzung der BALF analysiert. Die Mäuse zeigten trotz der wiederholten Behandlung mit den Bakterien nur eine sehr geringe entzündliche Reaktion gemessen am Einstrom der Neutrophilen und Lymphozyten in die Lunge (s. Abb. 3.1). So konnte zwar ein Anstieg der Neutrophilenzahl in der BALF bei Behandlung mit *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78 verzeichnet werden, der aber, mit lediglich ca. 2.500 Neutrophilen, sehr gering ausfiel. Die Lymphozytenanzahl in der BALF

war nach Behandlung mit *A. Iwoffii* F78 ebenfalls signifikant erhöht, jedoch war auch hier die Anzahl der Zellen mit ca. 50.000 Lymphozyten eher gering. Eine Behandlung mit *L. lactis* G121 führte nicht zu einem signifikanten Einstrom von Lymphozyten.

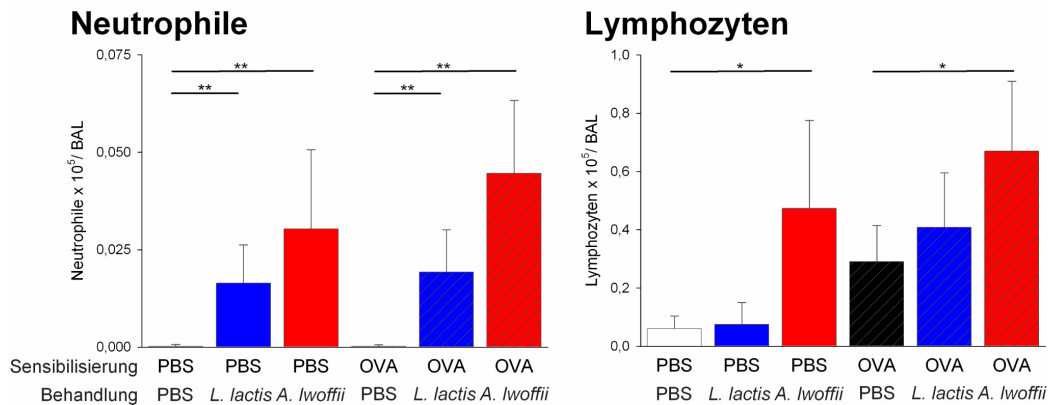


Abb. 3.1: Schwach entzündliche Reaktionen der Lunge bei Behandlung von Mäusen mit *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78.

Die Mäuse (je Gruppe n=6) wurden i.n. mit PBS, *L. lactis* G121 oder *A. Iwoffii* F78 behandelt und mit OVA sensibilisiert und provoziert. Die Zellen der BALF wurden analysiert und gezählt. Signifikante Unterschiede zu der nicht sensibilisierten PBS-Gruppe bzw. der sensibilisierten PBS-Gruppe sind gekennzeichnet bei $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**).

Im Hinblick auf die allergische Reaktion der Mäuse wurden zunächst die OVA-spezifischen Immunglobulinkonzentrationen im Serum bestimmt. Die Analyse ergab, dass die Behandlung mit den Bakterien keinen Effekt auf die OVA-spezifischen IgE- und IgG2a-Titer im Serum hatte (s. Tab. 3.1). Die IgG1-Titer waren dagegen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert.

Tab. 3.1: OVA-spezifische Immunglobulinkonzentrationen im Serum.^A

Sensibilisierung	PBS	OVA	OVA	OVA
Behandlung	PBS	PBS	<i>L. lactis</i>	<i>A. Iwoffii</i>
OVA-IgE [ng/ml]	0	3,5 ± 1,5	3,9 ± 0,7	4,0 ± 1,5
OVA-IgG1 [mg/ml]	0	3,8 ± 1,2	2,2 ± 1,2 *	2,5 ± 1,8 *
OVA-IgG2a [ng/ml]	0	321 ± 265	418 ± 264	245 ± 278

^A Die Mäuse wurden i.n. mit PBS, *L. lactis* G121 oder *A. Iwoffii* F78 behandelt und mit OVA sensibilisiert und provoziert. OVA-spezifische Immunglobulinkonzentrationen im Serum wurden mittels ELISA analysiert und sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede zur PBS-Kontrollgruppe sind gekennzeichnet bei $p < 0,05$ (*).

Diese ersten Anzeichen für einen allergiepräventiven Effekt der Bakterienbehandlung wurden durch die Analyse der Eosinophilen in der BALF bestätigt. So zeigten die mit Bakterien behandelten Mäuse einen signifikanten Rückgang des Eosinophileinstroms auf nahezu das Niveau der Kontrolltiere, wohingegen die Anzahl der Makrophagen unverändert blieb (s. Abb. 3.2).

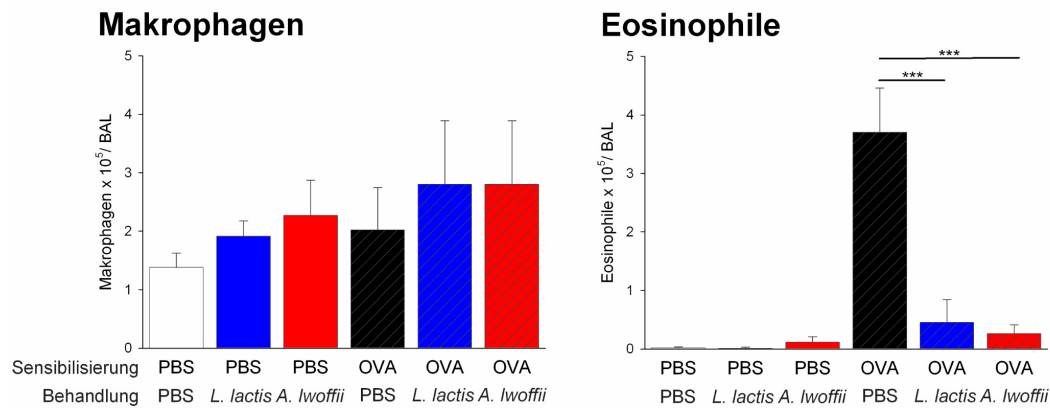


Abb. 3.2: Intranasale Behandlung der Mäuse mit *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78 verhindert den Einstrom von Eosinophilen in die Lunge.

Die Mäuse wurden i.n. mit PBS, *L. lactis* G121 oder *A. Iwoffii* F78 behandelt und mit OVA sensibilisiert und provoziert. Die Zellen der BALF wurden analysiert und gezählt. Signifikante Unterschiede zu der nicht sensibilisierten PBS-Gruppe bzw. der sensibilisierten PBS-Gruppe sind gekennzeichnet bei $p < 0,001$ (***).

Zudem zeigten histologische Untersuchungen in den mit Bakterien-behandelten Mausgruppen eine deutliche Reduktion des peribronchialen und perivaskulären inflammatorischen Zelleinstroms (s. Abb. 3.3, HE Färbung). Die analysierten Gewebe zeichneten sich dabei durch eine stark verminderte Anzahl an Eosinophilen aus (s. Abb. 3.3, Congo Red-Färbung). Auch die Entstehung von Mukus-produzierenden Becherzellen wurde fast vollständig durch die Bakterienbehandlung der Mäuse verhindert (s. Abb. 3.3, PAS Färbung).

3.1.2 Verbesserte Atemwegsreaktivität in den Bakterien-behandelten Mäusen

Neben diesen positiven Einflüssen der Bakterienbehandlung auf die akute allergische Antwort der Lunge konnte auch eine Normalisierung der Atemwegsreaktivität erreicht werden (s. Abb. 3.4). Dies wird angezeigt durch eine, im Vergleich zu den OVA-sensibilisierten Tieren, signifikant höhere Dosis an β -Metacholin, die benötigt wurde, um eine 50 %ige Reduktion des anfänglichen Atemzugvolumens zu erreichen. Diese β -Metacholin-Dosis geht bei Behandlung mit beiden Bakterienstämmen wieder auf die der Kontrolltiere zurück.

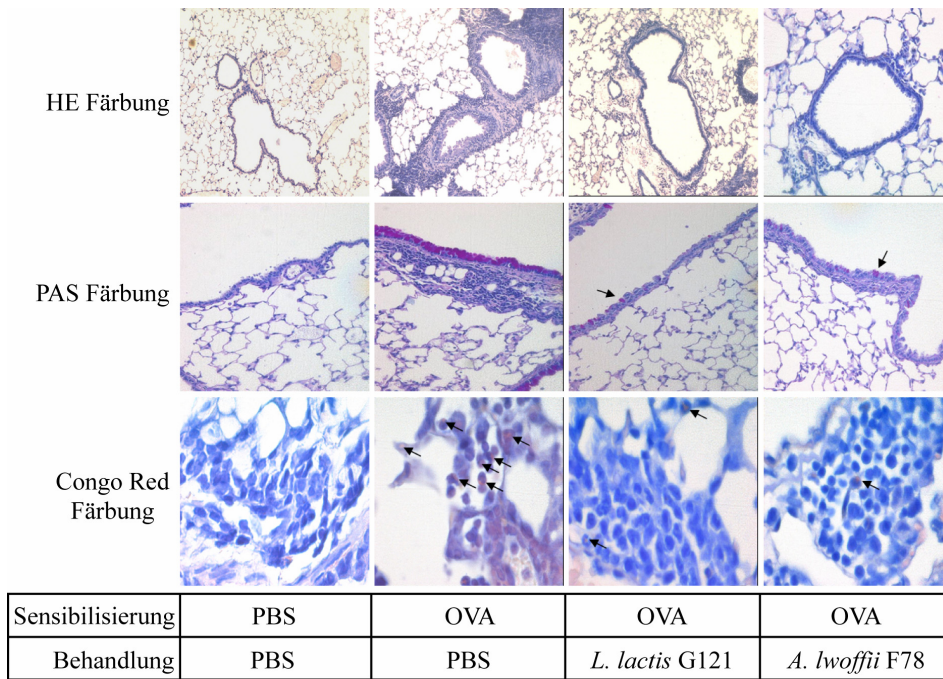


Abb. 3.3: *L. lactis* G121- und *A. lwoffii* F78-Behandlung der Mäuse verhindert die Entstehung einer Atemwegsentzündung und einer Becherzellhyperplasie.

Die Mäuse wurden i.n. mit PBS, *L. lactis* G121 oder *A. lwoffii* F78 behandelt und mit OVA sensibilisiert und provoziert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Atemwege nach HE Färbung, PAS Färbung der Becherzellen (Pfeile zeigen auf einzelne Becherzellen bei den Bakterien-behandelten Mäusen) und Congo Red-Färbung der Eosinophilen (Pfeile).

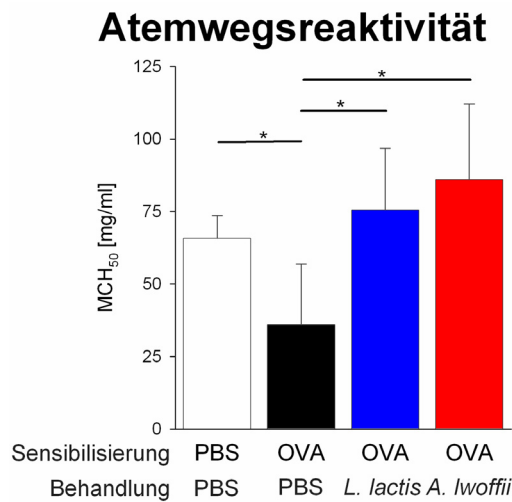


Abb. 3.4: Behandlung mit *L. lactis* G121 und *A. lwoffii* F78 verbessert die Atemwegsreaktivität.

Die Mäuse (je Gruppe n=8) wurden i.n. mit PBS, *L. lactis* G121 oder *A. lwoffii* F78 behandelt und mit OVA sensibilisiert und provoziert. Die Lungenfunktion wurde mit Hilfe eines Ganzkörper-Plethysmographen analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung der Metacholinkonzentration, die eine 50 %ige Reduktion des Ausgangsatemzugvolumens verursachte (MCH₅₀). Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet bei p < 0,05 (*).

3.2 KUHSTALLBAKTERIEN BEGÜNSTIGEN EINE T_H1-ANTWORT

Um den Einfluss der Kuhstallbakterien auf die Allergieentstehung und -entwicklung im humanen System zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Bakterien auf humane dendritische Zellen untersucht. Diese stellen eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar und spielen deshalb eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Polarisierung der Immunantworten. Dendritische Zellen sind auch bei der Ausbildung von Allergien von entscheidender Bedeutung, da sie in der Lage sind, Immunantworten zu modellieren und dementsprechend eine allergische Reaktion hervorrufen, diese aber auch unterdrücken können (siehe auch Kapitel 1.4, Seite 16).

3.2.1 Aktivierung und Reifung humaner dendritischer Zellen durch *L. lactis* G121 und *A. lwoffii* F78

Zunächst wurde anhand der Freisetzung des proinflammatorischen Chemokins IL-8 und des proinflammatorischen Zytokins TNF- α untersucht, ob sich humane DCs generell von *L. lactis* G121 und *A. lwoffii* F78 aktivieren lassen. Als Positivkontrolle diente LPS, von dem bekannt ist, dass es humane DCs zur Freisetzung dieser Mediatoren stimuliert.

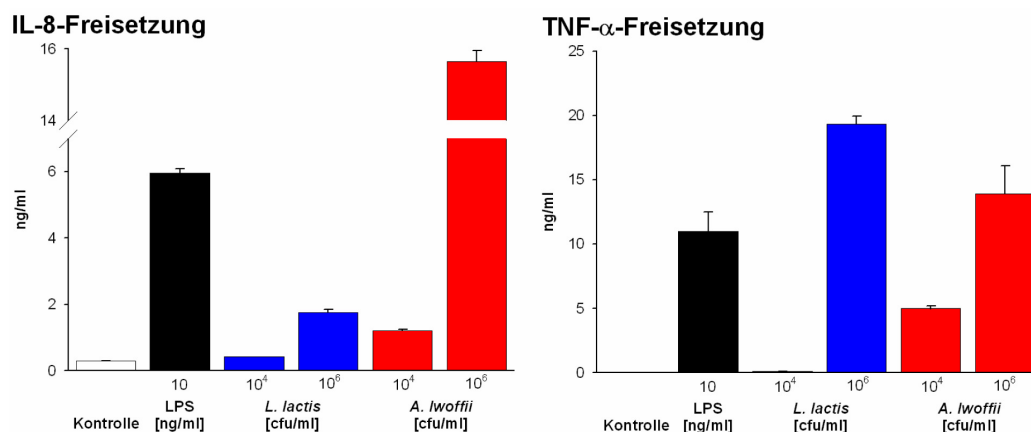


Abb. 3.5: Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121 und *A. lwoffii* F78.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Freisetzung von IL-8 und TNF- α wurde nach 24 h im Überstand bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender ($n \geq 5$).

Wie in Abb. 3.5 gezeigt, induzierten beide Bakterien die Freisetzung von IL-8 und TNF- α . Dabei zeigte *A. lwoffii* F78 im Vergleich zu *L. lactis* G121 eine höhere Aktivität und induzierte bereits mit einer Konzentration von 10⁴ cfu/ml eine moderate IL-8- und TNF- α -Freisetzung. Mit einer Konzentration von 10⁶ cfu/ml stimulierte *A. lwoffii* F78 die DCs zu einer deutlichen Freisetzung von IL-8 und TNF- α . *L. lactis* G121 war ebenfalls in der Lage, die DCs zur Freisetzung von IL-8 und TNF- α anzuregen, jedoch erst in deutlich höheren

Konzentrationen. So reichte eine Konzentration von 10^4 cfu/ml *L. lactis* G121 nicht aus, um eine Zunahme an IL-8 oder TNF- α im Überstand nachzuweisen. Nach Stimulation mit einer Konzentration von 10^6 cfu/ml *L. lactis* G121 hingegen war die induzierte TNF- α -Freisetzung mit der durch eine LPS-Behandlung der Zellen erzielten Freisetzung an TNF- α vergleichbar. IL-8 wurde ebenfalls freigesetzt, allerdings erst ab einer Konzentration von 10^6 cfu/ml *L. lactis* G121 und deutlich weniger als nach einer Stimulation der Zellen mit LPS.

Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Aktivierung dendritischer Zellen ist deren Reifung. Bei diesem Prozess wird unter anderem die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (kostimulatorische Moleküle) hochreguliert, welche die Interaktion mit T-Zellen ermöglichen bzw. erleichtern. Weiterhin werden die aufgenommenen Antigene prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche präsentiert, was ebenfalls über eine Zunahme dieser Moleküle auf der Oberfläche der Zelle charakterisiert ist.

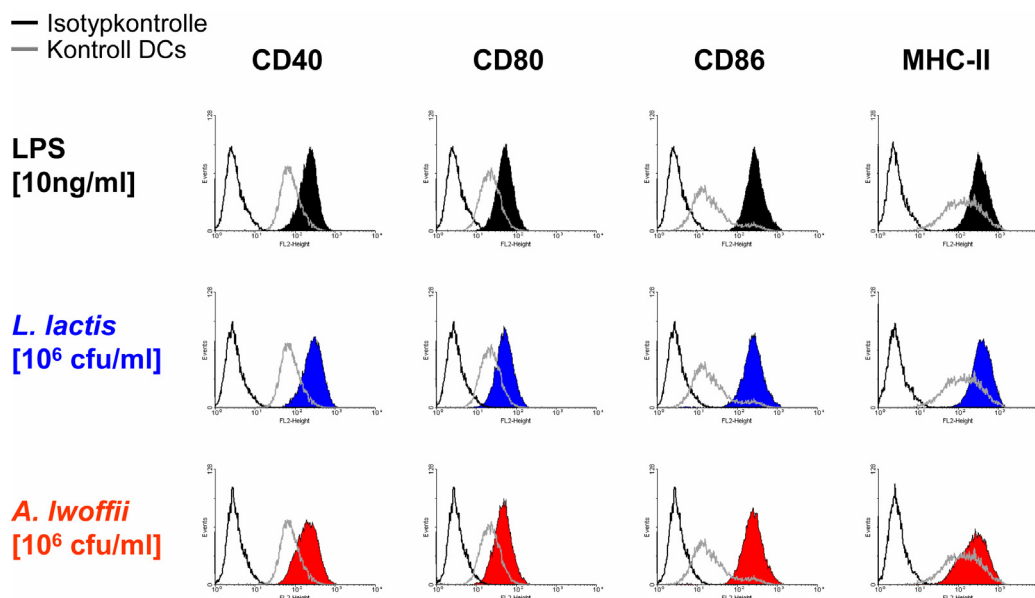


Abb. 3.6: Reifung humaner DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 und der MHC-Klasse-II-Moleküle wurde nach 24 h mittels FACS analysiert. Die grauen offenen Histogramme repräsentieren die Expression des jeweiligen Moleküls auf Kontroll-DCs, die schwarzen offenen Histogramme zeigen die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörpers und die gefüllten Histogramme (schwarz bei LPS, blau bei *L. lactis* G121 und rot bei *A. Iwoffii* F78) zeigen die Expression der Moleküle auf den stimulierten DCs. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n \geq 3).

Eine Analyse der kostimulatorischen Moleküle und der MHC-Klasse-II-Moleküle nach Stimulation der DCs mit den Kuhstallbakterien ergab, dass beide Bakterien die Reifung der DCs bewirken (s. Abb. 3.6). Dabei war die Hochregulation nach Stimulation mit einer Bakterienkonzentration von 10^6 cfu/ml mit der LPS-induzierten Hochregulation dieser Moleküle vergleichbar. Auch hier zeigte sich, dass *A. Iwoffii* F78 bei sehr geringen Konzentrationen aktiv ist und bereits ab $10^2 - 10^3$ cfu/ml eine Reifung der Zellen induzierte

(Daten nicht gezeigt). Von *L. lactis* G121 waren wiederum höhere Konzentrationen nötig (ab 10^4 cfu/ml, Daten nicht gezeigt) um eine Reifung auszulösen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die beiden Bakterien in den folgenden Experimenten mit der Standardkonzentration von 10^6 cfu/ml eingesetzt, da sich bei dieser Konzentration sowohl eine gute Aktivierung als auch die Reifung der DCs beobachten ließ. Weiterhin war die Aktivierung und Reifung der DCs bei dieser Bakterienkonzentration mit der Positivkontrolle (LPS [10 ng/ml]) vergleichbar.

3.2.2 *L. lactis* G121 und *A. lwoffii* F78 induzieren ein T_H1 -polarisierendes Programm in DCs

Die Hygiene-Hypothese besagt, dass bestimmte Umwelteinflüsse in der Lage sind, die Immunantwort eines Kleinkindes zu modulieren und damit eine Allergieentwicklung zu verhindern. Weiterhin ist bekannt, dass Allergien mit einer verstärkten T_H2 -Antwort assoziiert sind. Da dendritische Zellen bei der Polarisierung der T_{Helfer} -Zellantworten eine zentrale Rolle spielen, wurde untersucht, ob die Kuhstallbakterien eine Polarisierung der Immunantwort in Richtung einer T_H1 -Immunantwort bewirken und somit die allergieassoziierte T_H2 -Antwort reprimieren können.

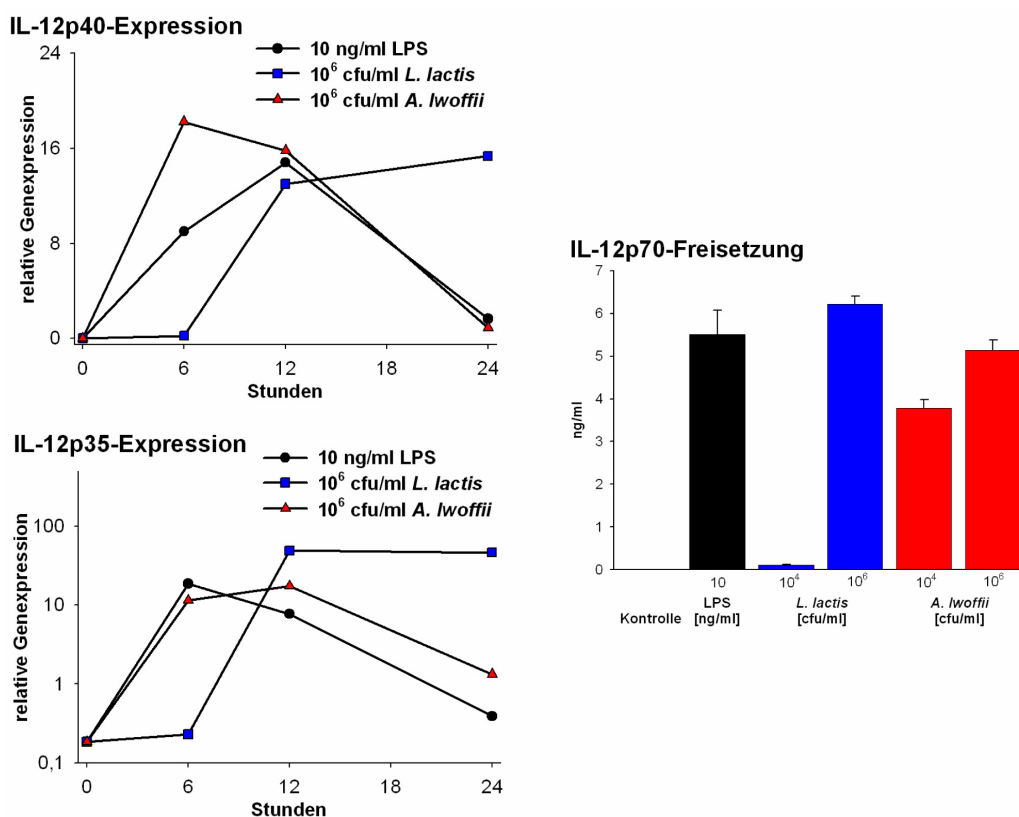


Abb. 3.7: IL-12p70-Expression und -Freisetzung nach Stimulation mit *L. lactis* G121 und *A. lwoffii* F78.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die IL-12p40 und IL-12p35 Expression relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT wurde durch quantitative real-time PCR bestimmt. Die Freisetzung von IL-12p70 wurde nach 24 h im Überstand bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n≥3).

Da das Zytokinprofil der DCs eine entscheidende Rolle bei der Polarisierung der Immunantwort spielt, wurde zunächst die Expression und Freisetzung von IL-12p70, einem der wichtigsten T_H1 -polarisierenden Zytokine, untersucht (s. Abb. 3.7). IL-12p70 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus den beiden Untereinheiten IL-12p40 und IL-12p35 aufgebaut ist. Wie in Abb. 3.7 zu sehen, waren die Kuhstallbakterien in der Lage, die Expression beider Untereinheiten zu induzieren, was auch in der Freisetzung von aktivem IL-12p70 resultierte. Dabei zeigten Expressionslevel und -kinetik bei Stimulation mit *A. Iwoffii* F78 einen ähnlichen Verlauf wie bei der Stimulation mit LPS, mit einem deutlichen Anstieg der Expression nach 6 und 12 h und einem Rückgang der Expression nahezu auf das Niveau der Kontrolle nach 24 h. Der Verlauf der Expression beider Untereinheiten nach Stimulation mit *L. lactis* G121 unterschied sich in der Kinetik hingegen deutlich. So war eine Zunahme der Expression erst nach 12 h zu verzeichnen, erreichte hier aber ein ähnliches Niveau wie bei Stimulation mit LPS und *A. Iwoffii* F78, blieb allerdings, im Gegensatz zur Stimulation mit LPS und *A. Iwoffii* F78, auch nach 24 h noch auf einem vergleichbar hohen Level wie nach 12 h. Die Freisetzung an IL-12p70 war nach Stimulation mit 10^6 cfu/ml der Bakterien vergleichbar mit der durch LPS induzierten Freisetzung. Auch hier zeigte sich die höhere Aktivität von *A. Iwoffii* F78 mit einer Induktion der IL-12p70-Freisetzung bereits nach Stimulation mit 10^4 cfu/ml. Bei dieser Konzentration war *L. lactis* G121 nicht in der Lage, die IL-12p70-Produktion zu aktivieren.

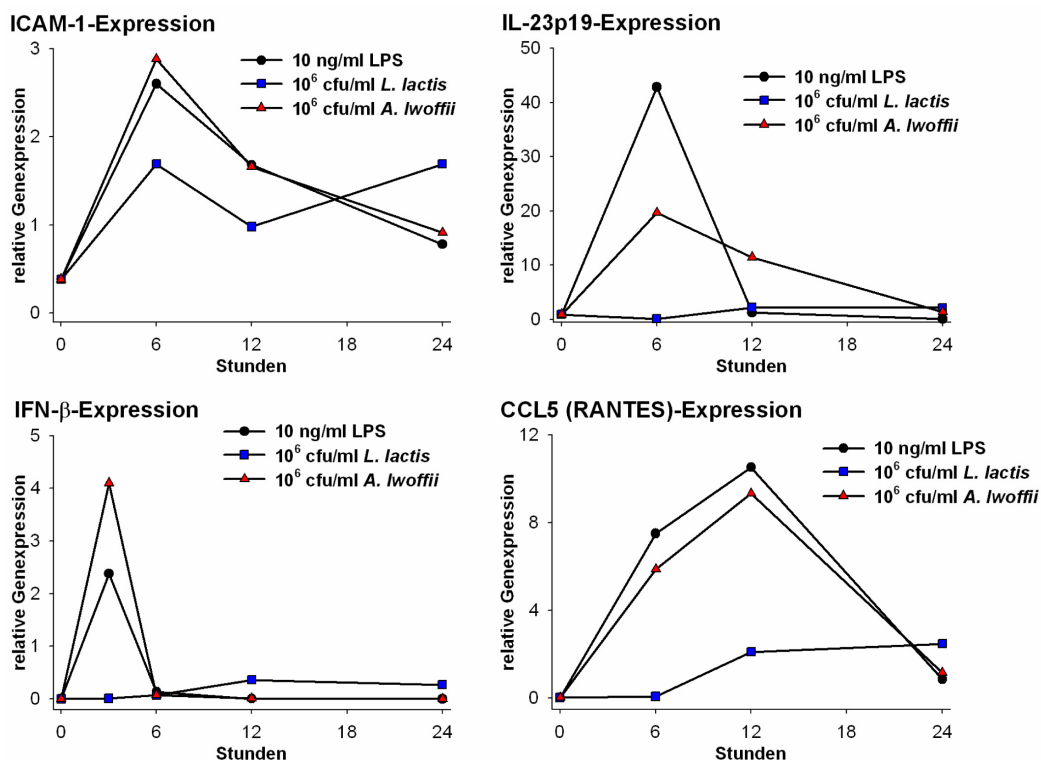


Abb. 3.8: Expression T_H1 -polarisierender Faktoren in DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Expression der angezeigten Gene wurde relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT durch quantitative *Real-time*-PCR bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n≥3).

Um die T_H1-polarisierende Fähigkeit der DCs weiter zu untersuchen, wurde die Expression anderer T_H1-polarisierender Zytokine, Chemokine und Oberflächenmarker untersucht. Wie in Abb. 3.8 gezeigt, war *A. Iwoffii* F78 in der Lage, die Expression von IL-23p19, ICAM-1, CCL5 und IFN- β in einer mit LPS vergleichbaren Weise zu induzieren. Das Gleiche galt auch für weitere T_H1-polarisierende Zytokine wie z.B. IL-6 und MCP-1 (Daten nicht gezeigt). *L. lactis* G121 induzierte ebenfalls die Expression dieser T_H1-polarisierenden Moleküle (s. Abb. 3.8), jedoch oftmals mit einer anderen Kinetik und auch einer anderen Intensität als LPS und *A. Iwoffii* F78. Eine Ausnahme bildete das kostimulatorische Molekül ICAM-1, dessen Expression auf ähnliche Weise induziert wurde. Die Expression von IL-23p19, IFN- β und CCL5 wurde hingegen im Vergleich zur LPS-abhängigen Expression deutlich weniger induziert. Dabei fand hier, wie bei der Induktion der IL-12-Untereinheiten, die Aktivierung der Zellen deutlich später statt, hielt jedoch, wenn auch auf einem niedrigeren Niveau, länger an. In diesem Zusammenhang wurden auch Marker untersucht, die charakteristisch für DCs sind, welche die T_Helfer-Zellantwort in Richtung einer T_H2- (OX40-L) oder regulatorischen T-Zellantwort (ICOS-L) polarisieren. Weder *A. Iwoffii* F78 noch *L. lactis* G121 induzierten die Expression dieser Moleküle (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen der Diplomarbeit von Nina Dickgreber zeigte sich sogar, dass Jagged-1, ein T_H2 Marker, nach Aktivierung der Zellen mit den Bakterien herunter reguliert wurde¹⁵².

Zusammenfassend ließ sich also ein T_H1-polarisierendes Programm in humanen DCs nach Behandlung mit den Kuhstallbakterien nachweisen.

3.2.3 Mit Kuhstallbakterien aktivierte DCs induzieren eine T_H1-Immunantwort

Um die T_H1-polarisierende Wirkung der mit den Bakterien stimulierten DCs weiter zu überprüfen, wurden die so stimulierten DCs mit naiven T-Zellen kokultiviert. Nach 5 Tagen der Kokultur wurden die T-Zellen restimuliert und die Art der T-Zellantwort überprüft (s. auch Kapitel 2.7.7, Seite 34). In Abb. 3.9 ist die IFN- γ -Produktion der T-Zellen nach Kokultur und Restimulation gezeigt. IFN- γ stellt eines der vorherrschenden T_H1-Zytokine dar. Sowohl nach Kokultur der naiven T-Zellen mit LPS-, *L. lactis* G121- sowie *A. Iwoffii* F78-behandelten DCs ist im Vergleich zur Kokultur mit Kontroll-DCs eine deutliche Zunahme der IFN- γ -Produktion zu verzeichnen. Eine Kultur der T-Zellen oder auch der DCs alleine führte zu keiner oder zu einer deutlich geringeren Freisetzung von IFN- γ (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.9 sind Ergebnisse der Kokultur von naiven T-Zellen und DCs desselben Spenders dargestellt. Mit T-Zellen eines heterologen Spenders zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch weniger deutlich (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Freisetzung von IL-4, einem wichtigen T_H2-Zytokin, überprüft (s. Abb. 3.10). Bei einer Kokultur der T-Zellen mit *L. lactis* G121-stimulierten DCs war bei allen drei Spendern eine Abnahme der IL-4-Produktion zu erkennen. Da im Falle von LPS und *A. Iwoffii* F78 jedoch keine eindeutigen Ergebnisse

gezeigt werden konnten, sind in Abb. 3.10 drei unabhängige Experimente dargestellt. Je nach Spender führte die Kokultur von mit LPS- bzw. *A. Iwoffii* F78-stimulierten DCs mit naiven T-Zellen zur Differenzierung von T-Zellen, die im Vergleich zur Kontrollkokultur mehr IL-4 (links), in etwa gleich viel IL-4 (Mitte) oder weniger IL-4 (rechts) produzierten. In allen Experimenten konnte unabhängig von der IL-4-Freisetzung ein ähnliches Bild für die IFN- γ -Freisetzung wie in Abb. 3.9 dargestellt nachgewiesen werden. Zudem war zu beobachten, dass generell sehr wenig IL-4 ausgeschüttet wurde.

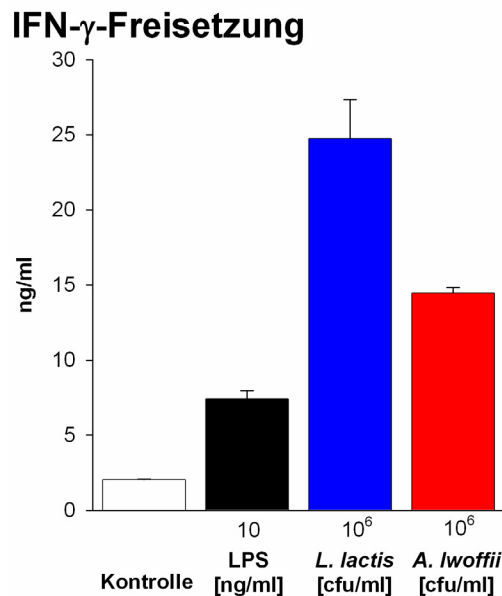


Abb. 3.9: Freisetzung von IFN- γ in einer Kokultur von naiven T-Zellen mit autologen DCs. Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurden diese DCs im Verhältnis 1:10 (DC:TC) mit naiven T-Zellen desselben Spenders kultiviert. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin reaktiviert und die IFN- γ -Konzentration im Überstand gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender ($n \geq 3$).

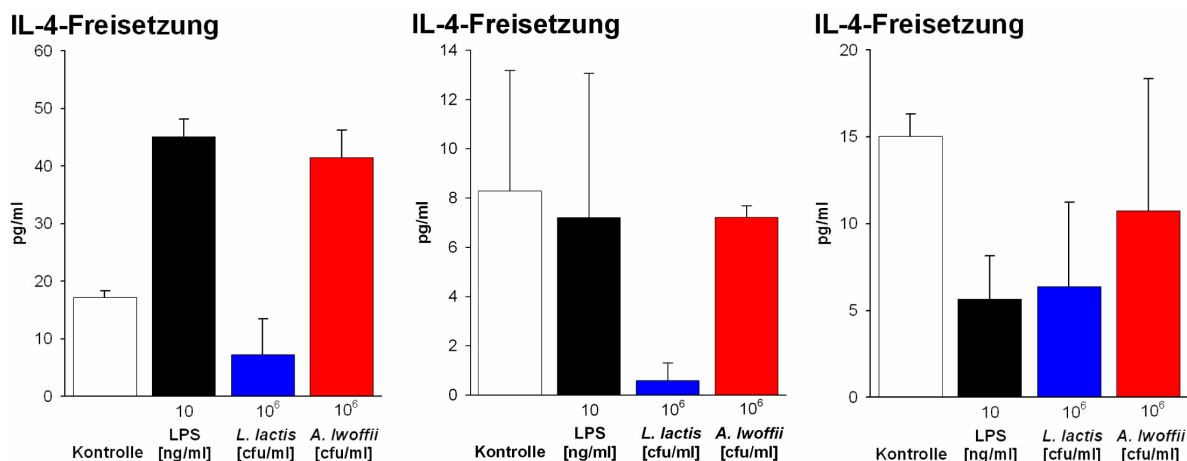


Abb. 3.10: Freisetzung von IL-4 in einer Kokultur von naiven T-Zellen mit autologen DCs. Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurden diese DCs im Verhältnis 1:10 (DC:TC) mit naiven T-Zellen desselben Spenders kultiviert. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin reaktiviert und die IL-4-Konzentration im Überstand gemessen. Dargestellt sind Daten von drei gesunden Spendern.

Zur Beurteilung, inwieweit die naiven T-Zellen nach einer Kokultur mit den LPS- und *A. Iwoffii* F78-behandelten DCs wirklich in Richtung T_H1 differenzierten, wurde bei einem Spender die Freisetzung der Zytokine während der Restimulation durch Zugabe von Brefeldin A verhindert, um so die Zytokine intrazellulär für die FACS Analyse anfärben zu können (s. Abb. 3.11). Diese Methode hat den Vorteil, dass zwischen Zellen, die ausschließlich IL-4 (T_H2 -Zellen) bzw. IFN- γ (T_H1 -Zellen) produzieren, und Zellen, die zur gleichen Zeit beide Zytokine freisetzen (T_H0 -Zellen), unterschieden werden kann.

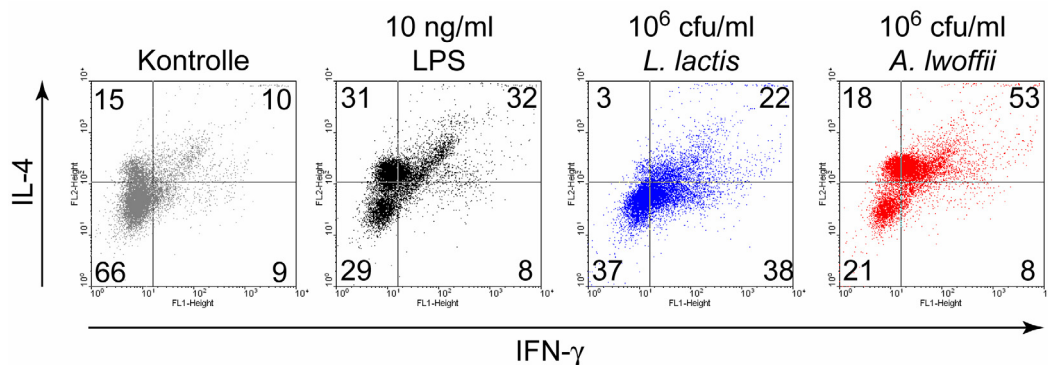


Abb. 3.11: Zytokinproduktion naiver T-Zellen nach Kokultur mit Bakterien-stimulierten autologen DCs.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurden diese DCs im Verhältnis 1:10 (DC:TC) mit naiven T-Zellen desselben Spenders kultiviert. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin in Gegenwart von Brefeldin A reaktiviert und die Produktion von IFN- γ und IL-4 durch intrazelluläre FACS Färbung nachgewiesen. Dargestellt ist das Ergebnis eines gesunden Spenders. Die Zahlen zeigen die Prozentzahlen der Zellen in dem jeweiligen Quadranten an.

Wie in Abb. 3.11 dargestellt, konnten nach der Kokultur mit Kontroll-DCs eine geringe Anzahl von IL-4- (15 %), IFN- γ - (9 %) und doppelt-positiven Zellen (15 %) nachgewiesen werden. Der Hauptteil der Zellen produzierte jedoch keines der beiden untersuchten Zytokine. Nach Stimulation der DCs mit *L. lactis* G121 zeigte sich eine deutliche Zunahme der nur IFN- γ -produzierenden Zellen (38 %). Die Anzahl der nur IL-4-produzierenden Zellen ging deutlich zurück (3 %), was vermutlich auf eine Verschiebung in Richtung doppelt-positiver Zellen (22 %) zurückzuführen ist. Nach Kokultur der naiven T-Zellen mit LPS- und *A. Iwoffii* F78-behandelten DCs nahm die Anzahl der doppelt-positiven Zellen hingegen stark zu (32 bzw. 52 %), während die Zahl der IFN- γ -produzierenden Zellen sich im Vergleich zur Kontrolle nicht veränderte (beide 8 %). Weiterhin war bei der Kokultur mit LPS-behandelten DCs eine starke Zunahme an IL-4-produzierenden Zellen zu verzeichnen (31 %). Dies war bei Stimulation mit *A. Iwoffii* F78 nicht zu beobachten (18 %).

Neben den Zytokinen, die charakteristisch für die unterschiedlichen Subgruppen der T_{Helfer} -Zellen sind, gibt es weitere spezifische Marker, die diese Subgruppen kennzeichnen. Daher wurde in einem weiteren Schritt die Expression verschiedener für die Subgruppen der T_{Helfer} -Zellen spezifischer Marker auf RNA-Ebene untersucht. Dafür wurden naive T-Zellen mit dem

Überstand der entsprechend aktivierten DCs behandelt und nach 24 h die Expression eben erwähnter Marker überprüft. Zunächst wurde die Expression der T_H1-spezifischen Marker IFN- γ und TIM-3 analysiert. Sowohl der Überstand der LPS-behandelten DCs als auch die Überstände der *L. lactis* G121- und *A. lwoffii* F78-behandelten DCs führten zu einer deutlichen Hochregulation der mRNA für diese T_H1-spezifischen Marker (s. Abb. 3.12). Auch die Expression T-Zell-Subgruppen-spezifischer Transkriptionsfaktoren wurde untersucht. Hier zeigte sich, dass die Expression des T_H1-spezifischen Faktors TBet induziert wurde, wohingegen die Expression des T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA3 leicht herunter reguliert wurde. Somit war insgesamt das Expressionsverhältnis der beiden Transkriptionsfaktoren klar in Richtung T_H1 verschoben (s. Abb. 3.12). Die Expression weiterer T_H2- und auch T_{Reg}-spezifischer Zytokine und Marker (wie IL-4, Tim-1, Foxp3) wurde ebenfalls untersucht. Hier war jedoch keine eindeutige Zu- oder Abnahme zu erkennen, wobei die Expression generell auf einem sehr niedrigen Niveau nahe der Nachweisgrenze lag (Daten nicht gezeigt). Da bei allen Experimenten der primäre Stimulus (bspw. LPS) bei der Aktivierung der T-Zellen noch anwesend war, wurde der Effekt dieser Stimuli auf die T-Zellen ebenfalls untersucht. Hier konnte jedoch keine Regulation der Gene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

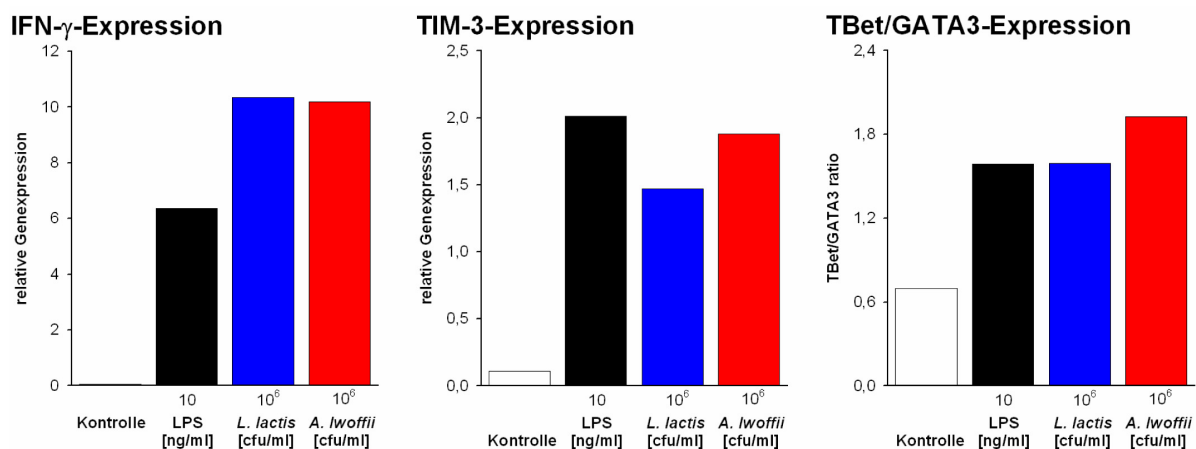


Abb. 3.12: Expression bestimmter, für die Subgruppen der T_H1-Zellen spezifischer, Marker. Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurden der Überstand dieser DCs zu allogenen naiven T-Zellen gegeben. Nach 24 h wurde die Expression der angezeigten Gene relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT durch quantitative real-time PCR bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n \geq 3)

3.3 FÜR DIE ALLERGIEPRÄVENTIVEN EIGENSCHAFTEN VON *A. LWOFFII* F78 VERANTWORTLICHE STRUKTUREN

Ein Ziel des Projektes, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, ist, aus den gewonnenen Einblicken in die Allergieprävention vorbeugende Maßnahmen für Kinder zu entwickeln, die nicht auf einem Bauernhof aufwachsen. Aus diesem Grund sollte in der

vorliegenden Arbeit auch geklärt werden, welche Bakterienbestandteile für die allergieprotektive Wirkung verantwortlich sind, da sich einzelne Strukturen besser für die Entwicklung einer Prophylaxe eignen. Auch sollte auf diesem Wege ein besseres Verständnis für die zu Grunde liegenden Mechanismen gewonnen werden. Die Isolierung und Aufreinigung der Bakterienbestandteile wurde in Kooperation mit der Laborgruppe Strukturbiochemie von Prof. Dr. Otto Holst am Forschungszentrum Borstel von Ania Hanuszkiewicz durchgeführt.

3.3.1 Aktivierung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch *A. Iwoffii* F78

Um die Interaktion der Immunzellen mit *A. Iwoffii* F78 näher zu charakterisieren, wurde in einem HEK293-Überexpressionsystem untersucht, welche Rezeptoren des angeborenen Immunsystems an der Erkennung von *A. Iwoffii* F78 beteiligt sind. Dabei diente die Freisetzung von IL-8 als Aktivierungsmarker.

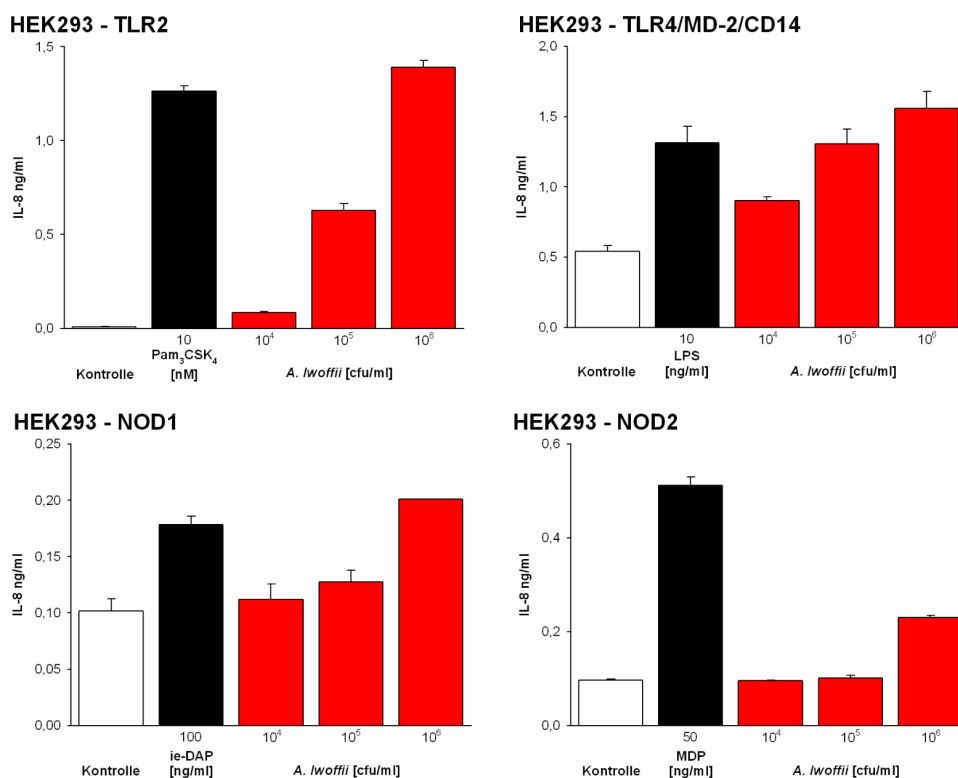


Abb. 3.13: Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch *A. Iwoffii* F78.

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren transient transfiziert und anschließend mit *A. Iwoffii* F78 bzw. entsprechenden Positivkontrollen stimuliert. Nach 18 h wurde die Aktivierung der Zellen anhand der IL-8 Konzentration im Überstand per ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 3.13 dargestellt, konnte eine Aktivierung der Zellen über TLR2, TLR4, NOD1 und NOD2 nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung über TLR4 bereits bei sehr geringen Konzentrationen (10⁴ cfu/ml) von *A. Iwoffii* F78 erfolgte, sich allerdings durch

höhere Konzentrationen auch noch steigern ließ. Ähnliches galt für die Aktivierung der HEK293-Zellen über TLR2, wobei hier erst ab einer Konzentration von 10^5 cfu/ml eine deutliche Aktivierung zu verzeichnen war. Die intrazellulären Rezeptoren NOD1 und NOD2 hingegen wurden erst ab einer Konzentration von 10^6 cfu/ml *A. Iwoffii* F78 aktiviert. Diese Aktivierung ließ sich mit höheren Bakterienkonzentrationen noch steigern (Daten nicht gezeigt). Wie bereits in Kapitel 2.5, Seite 27 beschrieben, zeigten durch Hitze abgetötete Bakterien eine deutlich geringe Induktionskapazität im Hinblick auf die Aktivierung von HEK293-Zellen und humanen DCs als lebende Bakterien. Um dies bezüglich der NOD- und TLR-Liganden näher zu untersuchen, wurden die verschiedenen *A. Iwoffii* F78-Präparationen auch im HEK293-System auf ihre Aktivität hin überprüft (s. Abb. 3.14). Während bei der Aktivierung der Zellen über TLR2, NOD1 und NOD2 eine nahezu unveränderte Aktivität zu beobachten war, wurde die Aktivierung über TLR4 durch die Behandlung stark reduziert. Durch 30-minütiges Erhitzen der Präparation von *A. Iwoffii* F78 auf 95°C ließ sich die Aktivierung der Zellen über TLR4 bereits leicht mindern. Das Autoklavieren der Präparation führte dann zum vollständigen Verlust der Aktivität.

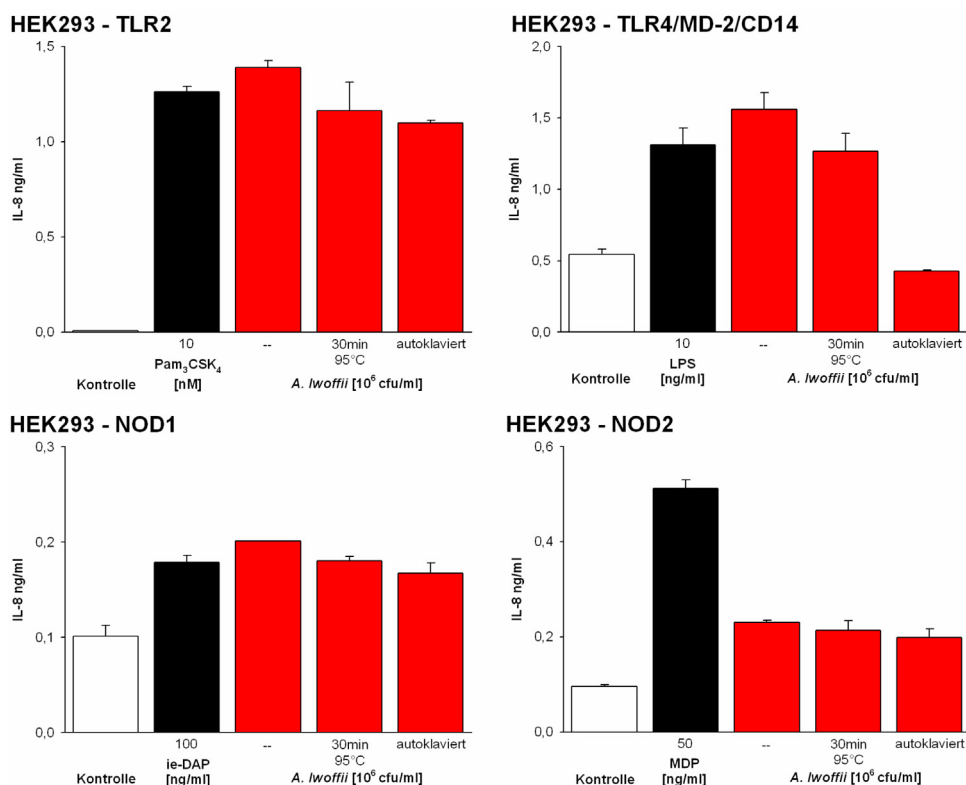


Abb. 3.14: Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch hitzebehandelte *A. Iwoffii* F78-Präparationen.

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren transient transfiziert und anschließend mit *A. Iwoffii* F78 bzw. entsprechenden Positivkontrollen stimuliert. Die *A. Iwoffii* F78 Präparationen wurden zuvor auf die angegebene Weise vorbehandelt. Nach 18 h wurde die Aktivierung der Zellen anhand der IL-8 Konzentration im Überstand per ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem aus zwei unabhängigen Experimenten.

In gleicher Weise behandelte *A. Iwoffii* F78-Präparationen wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung und Polarisierung von DCs untersucht (s. Abb. 3.15). Die hitzebehandelten Präparationen waren, gemessen an der IL-8-Freisetzung, in ähnlicher Weise wie die Kontrollpräparationen in der Lage DCs zu aktivieren. Die Fähigkeit eine IL-12p70-Freisetzung anzuregen, wurde hingegen durch die Hitzebehandlung nahezu vollständig blockiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Rolle der TLR4-Liganden von *A. Iwoffii* F78 bei der Polarisierung von DCs hin.

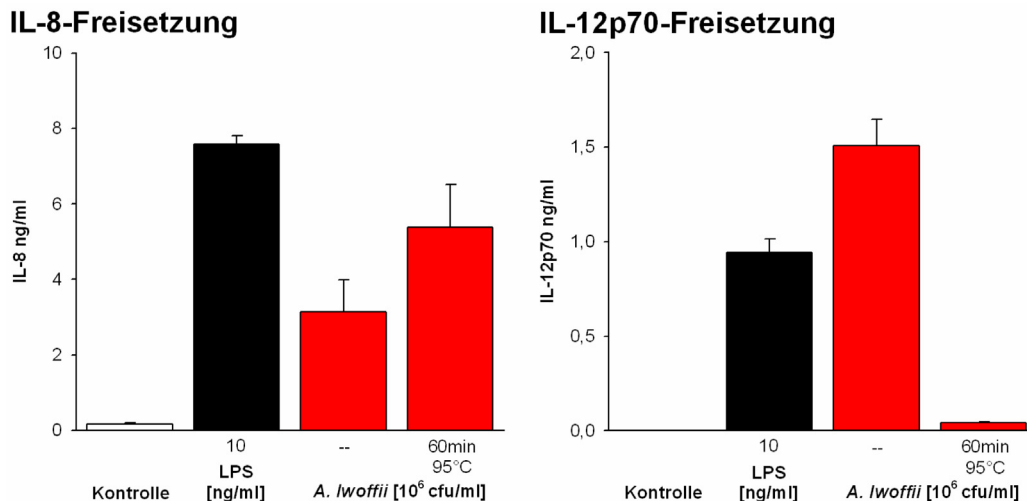


Abb. 3.15: Hitzebehandelte *A. Iwoffii* F78-Präparationen aktivieren humane DCs, induzieren jedoch keine Produktion von IL-12p70.

Humane dendritische Zellen wurden mit den angegebenen Stimuli behandelt. Die *A. Iwoffii* F78 Präparationen wurden zuvor auf die angegebene Weise vorbehandelt. Nach 16 h wurde die Konzentration von IL-8 und IL-12p70 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=2).

3.3.2 Die Bedeutung der TLR2-, NOD1- und NOD2-Liganden von *A. Iwoffii* F78 für die Aktivierung von humanen DCs

Wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben, enthielt die *A. Iwoffii* F78-Präparation einige Liganden, die verschiedene Rezeptoren des angeborenen Immunsystems adressieren. Um die für die Allergieprävention bedeutsamen Strukturen näher einzugrenzen, wurden verschiedene blockierende Antikörper und Substanzen benutzt. Zunächst wurde die Aktivierung der DCs über TLR2 mittels eines blockierenden TLR2-Antikörpers verhindert, um so eine Aussage über die Bedeutung der in der *A. Iwoffii* F78-Präparation vorkommenden TLR2-Liganden treffen zu können. Wie in Abb. 3.16 gezeigt, war der Antikörper in der Lage, die Aktivierung der Zellen durch den synthetischen TLR2-Liganden Pam₃CSK₄ zu verhindern. Gezeigt ist hier die Aktivierung und die damit einhergehende Phosphorylierung der MAP-Kinase p38. Ohne blockierenden Antikörper führte sowohl die Aktivierung der Zellen mit LPS als auch mit Pam₃CSK₄ nach 15 und 30 Minuten zu einer deutlichen

Phosphorylierung der MAP-Kinase (linke Seite der Abbildung). Dahingegen wurde p38 in Gegenwart des anti-TLR2 Antikörpers durch eine Stimulation der Zellen mit Pam₃CSK₄ nicht phosphoryliert, während die Aktivierung durch den TLR4-Liganden LPS nicht beeinflusst wurde (rechte Seite der Abbildung). Der Antikörper zeigte demnach in der verwendeten Konzentration gute, spezifisch blockierende Effekte im Hinblick auf TLR2.

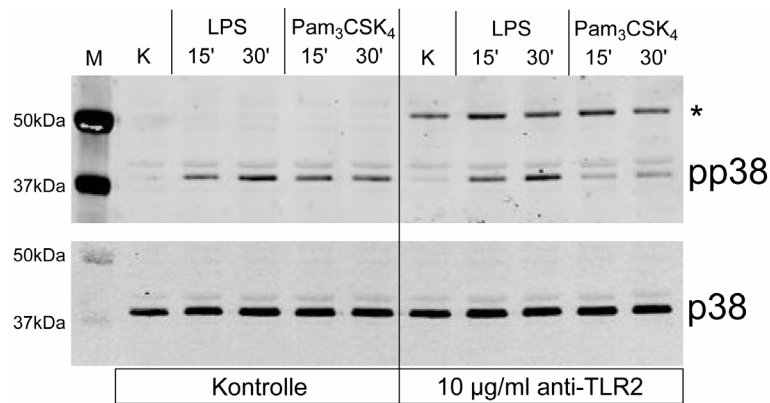


Abb. 3.16: Überprüfung der Aktivität des blockierenden TLR2-Antikörpers.

DCs wurden ohne Antikörper und in Gegenwart des blockierenden anti-TLR2-Antikörpers mit LPS [10 ng/ml] und Pam₃CSK₄ [100 nM] für 15 und 30 Minuten stimuliert. Die Zellen wurden mit Laemmli Puffer lysiert und von den Lysaten wurden Western Blots angefertigt. Die Aktivierung der Zellen wurde anhand der Phosphorylierung (pp38) der MAP-Kinase p38 überprüft. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von unphosphoryliertem p38. Unbehandelte Zellen sind mit K gekennzeichnet. Das Sternchen (*) zeigt die Bande der schweren Ketten des anti-TLR2-Antikörpers an.

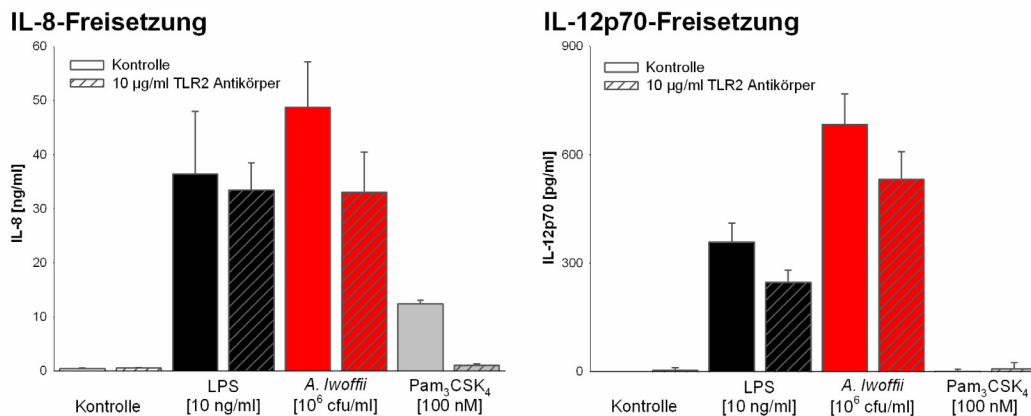


Abb. 3.17: Einfluss des TLR2-blockierenden Antikörpers auf die Aktivierung der DCs durch *A. Iwoffii* F78.

Humane dendritische Zellen wurden ohne Antikörper oder in Gegenwart des blockierenden anti-TLR2-Antikörpers mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurde die Freisetzung von IL-8 und IL-12 im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

Der blockierende Effekt des Antikörpers auf die Aktivierung der Zellen durch Pam₃CSK₄ konnte ebenso im Hinblick auf die IL-8 Freisetzung beobachtet werden (s. Abb. 3.17). Auch hier ließen sich die Zellen in Gegenwart des Antikörpers nicht mehr durch einen reinen TLR2-Liganden (Pam₃CSK₄) aktivieren, wohingegen sowohl die Aktivierung der Zellen mit LPS, als auch mit *A. Iwoffii* F78 nicht oder nur geringfügig beeinflusst war. Die IL-12-

Freisetzung, also die Ausbildung eines T_H1 -polarisierenden Programms, nach Behandlung der Zellen mit LPS und *A. Iwoffii* F78 wurde ebenfalls nicht durch die Blockierung von TLR2 beeinflusst. Der synthetische TLR2-Ligand Pam₃CSK₄ war nicht in der Lage IL-12 zu induzieren.

Für die Rezeptoren NOD1 und NOD2 sind derzeit keine blockierenden Antikörper erhältlich. Da *A. Iwoffii* F78 für die Aktivierung dieser intrazellulären Rezeptoren zunächst von der Zelle aufgenommen werden muss, wurde die Phagozytose in den DCs durch Cytochalasin D gehemmt, um so die Bedeutung der beiden Rezeptoren für die Aktivierung der DCs mit *A. Iwoffii* F78 zu untersuchen. In Abb. 3.18 ist die Wirkung von Cytochalasin D anhand der Phagozytose von FITC-gelabelten Latexbeads dargestellt. In den Kontrollansätzen (0,1 % DMSO) waren die DCs in der Lage, die Beads zu phagozytieren (linke Seite der Abbildung), wobei fast alle DCs einen oder mehrere der Beads aufgenommen hatten. Wurden die Zellen dagegen mit Cytochalasin D behandelt, konnte keine Phagozytose der Beads mehr festgestellt werden (rechte Seite der Abbildung). Die gewählte Konzentration an Cytochalasin D reichte demnach aus, um eine gute Blockierung der Phagozytose zu erzielen.

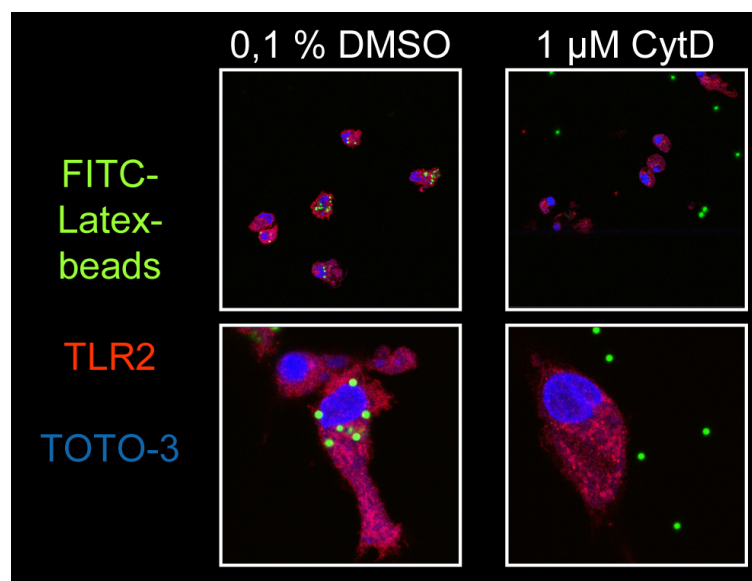


Abb. 3.18: Überprüfung der Aktivität der Phagozytose-hemmenden Substanz Cytochalasin D.

Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 30 min mit 0,1 % DMSO bzw. 1 µM Cytochalasin D vorinkubiert und dann in Gegenwart von 0,1 % DMSO (Kontrolle) bzw. 1 µM Cytochalasin D für 4 h mit 10^6 cfu/ml FITC-gelabelten Latexbeads inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie im Kapitel 2.11 beschrieben gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Konfokalen Laserscannmikroskop. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=2).

Unter denselben Bedingungen wie in Abb. 3.18 gezeigt, wurde im Anschluss untersucht, ob die Blockade der Phagozytose einen Einfluss auf die Aktivierung und T_H1 -Polarisierung der DCs durch *A. Iwoffii* F78 hat (s. Abb. 3.19). Bei einer Konzentration von 1 µM Cytochalasin D wurde die Aktivierung der Zellen nach Stimulation mit *A. Iwoffii* F78 leicht gehemmt (links). Allerdings zeigte sich auch nach einer Stimulation mit LPS, bei der die Zellen

phagozytoseunabhängig über einen extrazellulären Rezeptor (TLR4) aktiviert werden, ein Rückgang in der IL-12-Freisetzung. Um zu untersuchen, ob sich diese leichte Hemmung der IL-12 Freisetzung durch eine Erhöhung der Cytochalasin D Konzentration weiter steigern lässt, wurde der Versuch auch mit einer Konzentration von 3 μM Cytochalasin D durchgeführt (rechts). Hier zeigte sich weder bei der Aktivierung der Zellen mit LPS noch mit *A. Iwoffii* F78 ein Rückgang in der Freisetzung von IL-12.

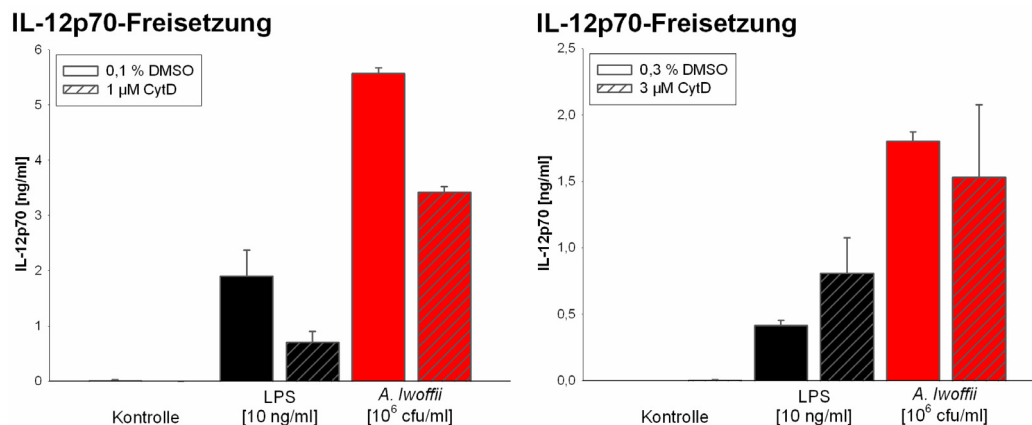


Abb. 3.19: Einfluss der Phagozytose-hemmenden Substanz Cytochalasin D auf die Aktivierung der DCs durch *A. Iwoffii* F78.

Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 30 min mit 0,1 % oder 0,3 % DMSO bzw. 1 μM oder 3 μM Cytochalasin D vorinkubiert und dann in Gegenwart entsprechender DMSO- und Cytochalasin D-Konzentrationen mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurde die Freisetzung von IL-12 im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von jeweils einem gesunden Spender ($n \geq 3$).

3.3.3 Bedeutung von TLR4-Liganden für die Aktivierung und T_H1 -Ausrichtung von humanen DCs mit *A. Iwoffii* F78

Wie bereits in Kapitel 3.3.1, Seite 57 gezeigt, scheint bei der Aktivierung der Zellen durch *A. Iwoffii* F78 ein TLR4-Ligand von Bedeutung zu sein. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde der TLR4-Antagonist C406¹⁵³ eingesetzt, um die Aktivierung der Zellen über TLR4 zu blockieren (s. Abb. 3.20). Die T_H1 -Ausrichtung der DCs durch *A. Iwoffii* F78 (IL-12p70-Freisetzung, linke Seite der Abbildung) wurde durch die Vorbehandlung der Zellen mit C406 vollständig unterdrückt. Die Polarisierung der DCs durch die Positivkontrolle LPS (TLR4-Ligand) konnte ebenfalls durch die Behandlung mit C406 vollständig blockiert werden. Bei der Aktivierung der DCs durch das Gram-positive Bakterium *L. lactis* G121 war, wie erwartet, kein Einfluss von C406 zu beobachten. Die Kokultur der so aktivierten DCs mit naiven T-Zellen bestätigte die fehlende T_H1 -Ausrichtung der DCs (s. Abb. 3.20, rechte Seite) insofern, als dass die in Gegenwart von C406 mit LPS bzw. *A. Iwoffii* F78 behandelten DCs nicht in der Lage waren, eine IFN- γ Freisetzung (T_H1 -Verschiebung) in den naiven T-Zellen zu bewirken. Auf die T_H1 -Polarisierung durch *L. lactis* G121 hatte der TLR4-Antagonist C406 keinen Einfluss.

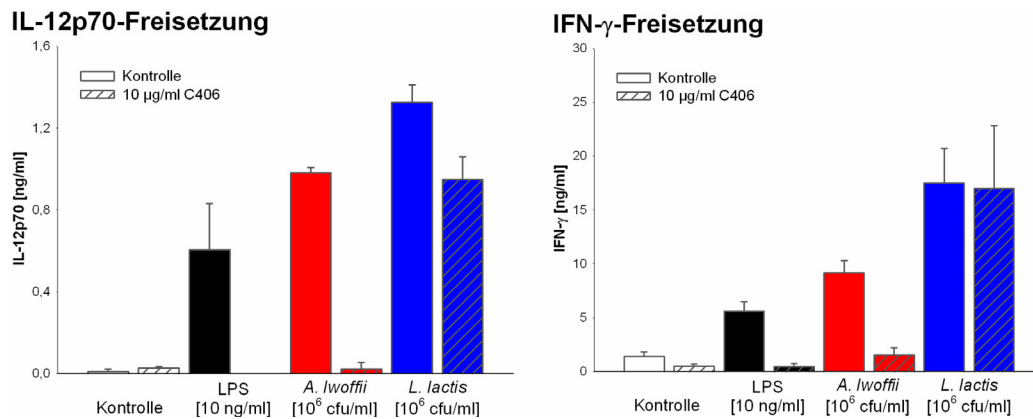


Abb. 3.20: Einfluss des TLR4 Antagonisten C406 auf die Aktivierung und Polarisierung dendritischer Zellen durch *A. Iwoffii* F78.

Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 30 min mit Medium als Kontrolle oder 10 µg/ml C406 vorinkubiert und dann entsprechend ohne oder in Gegenwart von C406 mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurde die Freisetzung von IL-12 im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=4). Für die Kokultur (IFN-γ-Freisetzung, rechts) wurden die DCs ebenso wie für die IL-12p70 Freisetzung behandelt. Nach 16 h wurden diese DCs im Verhältnis 1:10 (DC:TC) mit naiven T-Zellen desselben Spenders kultiviert. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin reaktiviert und die IFN-γ Konzentration im Überstand gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

3.3.4 LPS von *A. Iwoffii* F78 besitzt ebenfalls T_H1-polarisierende Eigenschaften

Um die Bedeutung der TLR4 Liganden von *A. Iwoffii* F78 für die Verschiebung der T_H1-Zellantwort in Richtung T_H1 weiter zu überprüfen, wurde auch die Wirkung des von Ania Hanuszkiewicz aus *A. Iwoffii* F78 isolierten LPS auf DCs untersucht. In Abb. 3.21 ist die Aktivierung der DCs anhand der IL-8- und TNF-α-Freisetzung nach Behandlung der DCs mit *A. Iwoffii* F78-LPS aufgeführt. Bereits geringe Konzentrationen des *A. Iwoffii* F78-LPS (1 ng/ml) reichten für eine deutliche IL-8- und auch TNF-α-Freisetzung aus. Dabei war die Menge an gebildeten Zytokinen mit der nach Stimulation mit 10 ng/ml des Referenz-LPS von *Salmonella enterica* sv. Friedenau freigesetzten Zytokinen vergleichbar. Mit höheren Konzentrationen an *A. Iwoffii* F78-LPS ließ sich die IL-8- und TNF-α-Produktion nicht weiter steigern. Die Aktivierung der DCs durch *A. Iwoffii* F78-LPS ließ sich zudem wie erwartet durch den TLR4-Antagonisten C406 hemmen (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob das *A. Iwoffii* F78-LPS ebenfalls zur Reifung der DCs führt (vergleiche auch Abb. 3.6, Seite 50). Wie die Gesamtbakterienpräparation war auch das *A. Iwoffii* F78-LPS in der Lage, eine Reifung der DCs zu bewirken, was in einer Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 und des antigenpräsentierenden Moleküls MHC-Klasse-II resultierte (s. Abb. 3.22). Dabei war der Grad der resultierenden Reifung nach Stimulation mit 10 ng/ml *A. Iwoffii* F78-LPS mit dem nach Stimulation mit 10 ng/ml des Referenz-LPS vergleichbar.

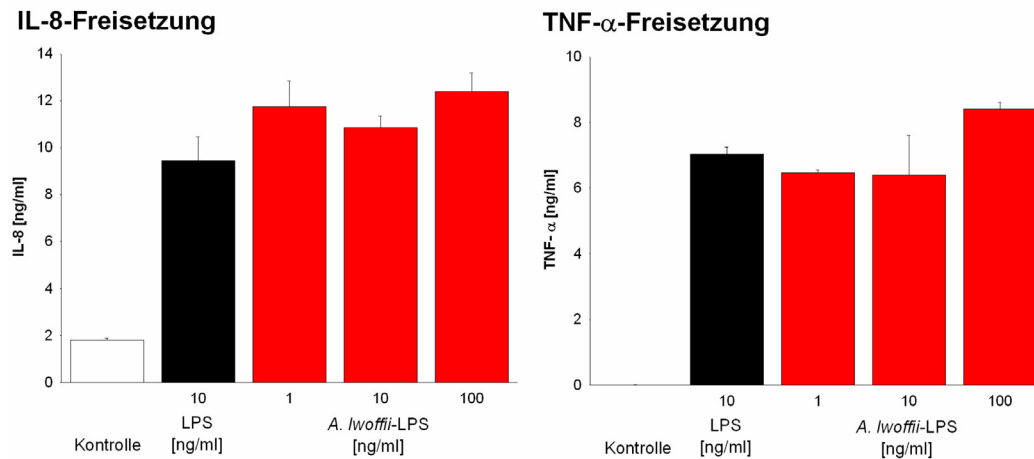


Abb. 3.21: Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit *A. Iwoffii* F78-LPS.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Freisetzung von IL-8 und TNF- α wurde nach 16 h im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

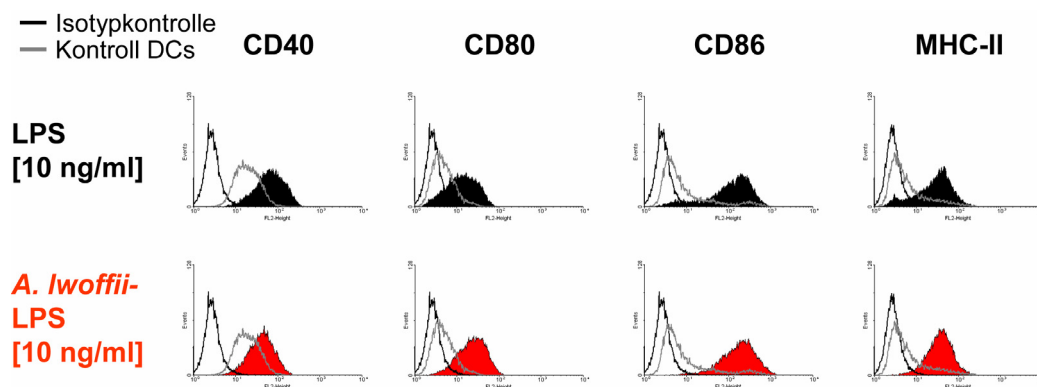


Abb. 3.22: Reifung humaner DCs nach Stimulation mit *A. Iwoffii* F78-LPS.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 und der MHC-Klasse-II-Moleküle wurde nach 24 h mittels FACS analysiert. Die grauen offenen Histogramme repräsentieren die Expression des jeweiligen Moleküls auf Kontroll-DCs, die schwarzen offenen Histogramme zeigen die Bindung des entsprechenden Isotyp-Antikörpers und die gefüllten Histogramme (schwarz bei LPS und rot bei *A. Iwoffii* F78-LPS) zeigen die Expression der Moleküle auf den stimulierten DCs. Dargestellt ist ein Experiment von einem gesunden Spender. Ähnliche Resultate wurden mit der Gesamtfraction der äußeren Membran von *A. Iwoffii* F78 erzielt (n=3).

Weiterhin wurde untersucht, ob das *A. Iwoffii* F78-LPS alleine in der Lage ist eine T_H1-Polarisierung zu induzieren. Wie in Abb. 3.23 gezeigt, induzierte das *A. Iwoffii* F78-LPS bereits in geringen Konzentrationen (1 und 10 ng/ml) eine IL-12p70-Freisetzung in DCs, die mit der Menge an freigesetztem IL-12p70 nach Stimulation mit 10 ng/ml des Referenz-LPS vergleichbar war. Diese IL-12-Produktion ließ sich durch höhere Konzentrationen an *A. Iwoffii* F78-LPS (100 ng/ml) nochmals deutlich steigern. In einer Kokultur der DCs mit naiven T-Zellen wurde außerdem untersucht, ob diese T_H1-Ausrichtung der DCs auch in einer Verschiebung von naiven T-Zellen Richtung T_H1 resultiert. Wie in Abb. 3.23 deutlich zu erkennen, induzierten mit *A. Iwoffii* F78-LPS stimulierte DCs eine deutliche IFN- γ Produktion und somit eine Verschiebung der T_H1-Zellantwort in Richtung T_H1. Hier reichten jedoch

geringe Mengen des *A. Iwoffii* F78-LPS nicht aus, um eine IFN- γ -Freisetzung zu bewirken. Erst eine Behandlung der DCs 100 ng/ml *A. Iwoffii* F78-LPS resultierte in einer deutlichen Zunahme der IFN- γ -Produktion. Die beschriebenen polarisierenden Effekte des *A. Iwoffii* F78-LPS ließen sich zudem mit dem TLR4-Antagonisten C406 hemmen (Daten für IL-12p70-Produktion nicht gezeigt).

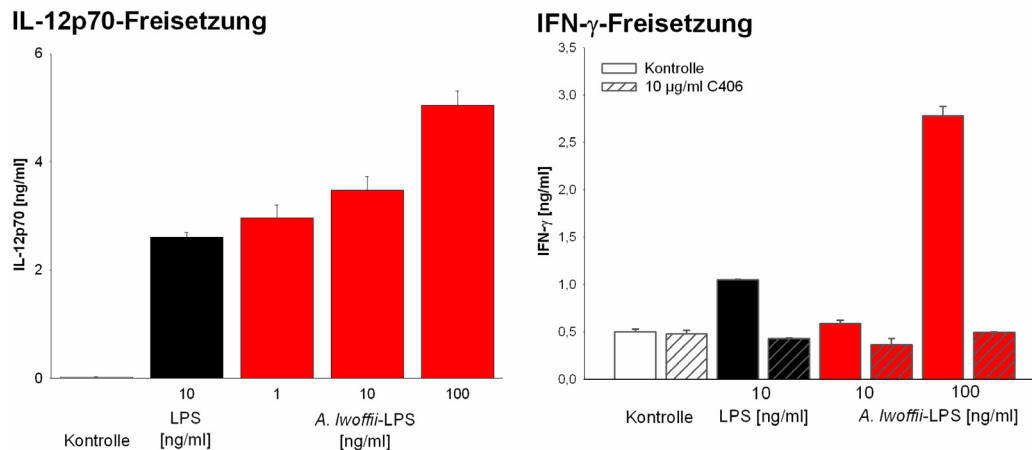


Abb. 3.23: T_H1 Ausrichtung dendritischer Zellen und T_H1 Verschiebung naiver T-Zellen durch *A. Iwoffii* F78-LPS.

Humane dendritische Zellen wurden mit den angegebenen Stimuli behandelt. Nach 16 h wurde die Freisetzung von IL-12 im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3). Für die Kokultur (IFN- γ Freisetzung, rechts) wurden die DCs zunächst für 30 min mit Medium als Kontrolle oder 10 μ g/ml C406 vorinkubiert und dann entsprechend ohne oder in Gegenwart von C406 mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurden diese DCs im Verhältnis 1:10 (DC:TC) mit naiven T-Zellen desselben Spenders kultiviert. Nach 5 Tagen Kokultur wurden die Zellen mit PMA und Ionomycin reaktiviert und die IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die TLR4-Liganden in der Gesamtbakterienpräparation von *A. Iwoffii* F78 eine essentielle Rolle bei der Aktivierung und Polarisierung der DCs zu spielen scheinen. Zudem zeigte das isolierte LPS aus *A. Iwoffii* F78 dieselben aktivierenden Eigenschaften wie die Gesamtbakterienpräparation.

3.4 BEDEUTUNG INTRAZELLULÄRER REZEPTOREN BEI DER AKTIVIERUNG UND POLARISIERUNG VON DCs DURCH *L. LACTIS* G121

Wie bereits in Kapitel 3.3, Seite 56 erläutert, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bakterienbestandteile, die für die allergieprotektive Wirkung verantwortlich sind, näher zu identifizieren, sowie grundlegende Mechanismen der Wirkungsweise aufzudecken. Die Isolierung und Aufreinigung der Bakterienbestandteile von *L. lactis* G121 erfolgte ebenfalls in Kooperation mit der Laborgruppe Strukturbiochemie von Prof. Dr. Otto Holst am Forschungszentrum Borstel und wurde von Ania Hanuszkiewicz durchgeführt.

3.4.1 Aktivierung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch *L. lactis* G121

Wie bereits bei *A. lwoffii* F78 wurde auch im Falle von *L. lactis* G121 das HEK293-Überexpressionsystem genutzt, um die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu identifizieren, die bei der Erkennung von *L. lactis* G121 durch Immunzellen eine Rolle spielen könnten. Hier konnte keine Aktivierung der Zellen über die Rezeptoren NOD1 und TLR4 festgestellt werden (s. Abb. 3.24). Hingegen war sowohl über TLR2 als auch NOD2 eine Aktivierung der HEK293-Zellen zu erkennen (s. Abb. 3.24), wobei hohe *L. lactis* G121-Konzentrationen (10^7 cfu/ml) nötig waren, um eine Aktivierung der Zellen über TLR2 zu erzielen. Auch für die Aktivierung der Zellen über den intrazellulären Rezeptor NOD2 wurden relativ hohe Bakterienkonzentrationen benötigt, die mit 10^6 cfu/ml jedoch geringer waren, als die für die Aktivierung über TLR2 notwendigen Konzentrationen. Diese Aktivierung ließ sich mit 10^7 cfu/ml *L. lactis* G121 nochmals deutlich steigern.

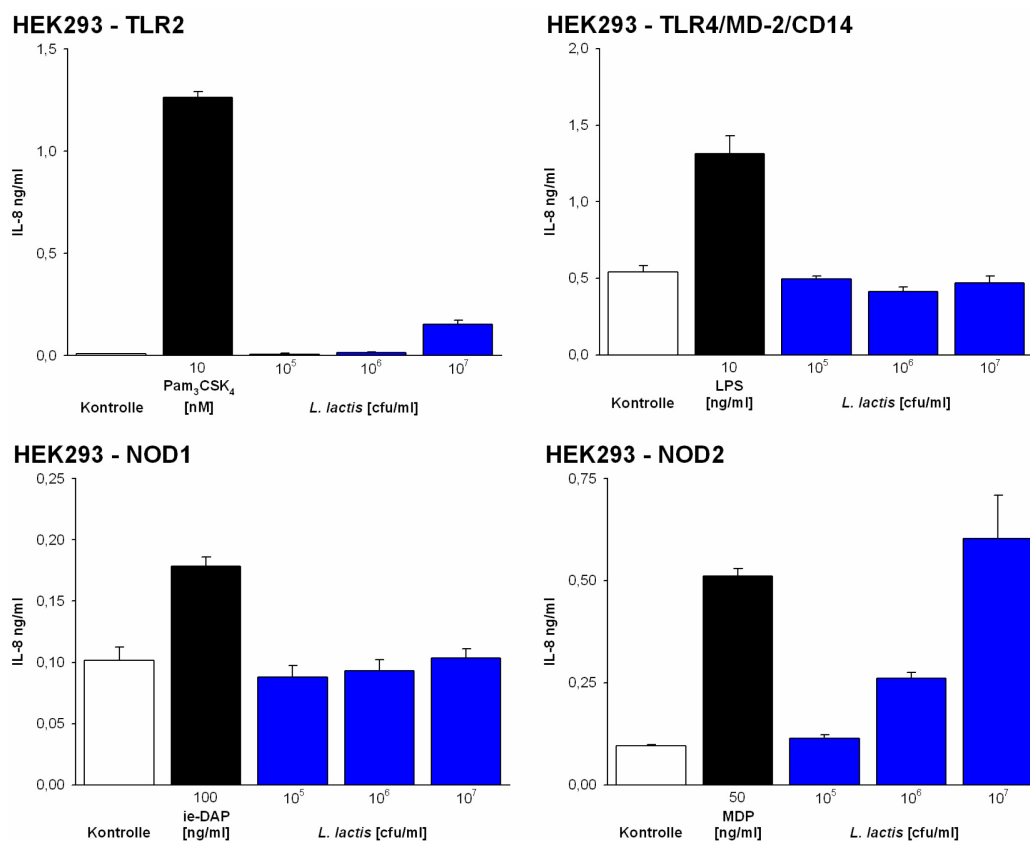


Abb. 3.24: Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch *L. lactis* G121. HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren transient transfiziert und anschließend mit *L. lactis* G121 bzw. entsprechenden Positivkontrollen stimuliert. Nach 18 h wurde die Aktivierung der Zellen anhand der IL-8 Konzentration im Überstand per ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem aus drei unabhängigen Experimenten.

Ähnlich wie schon für *A. lwoffii* F78 gezeigt, wiesen auch hitzebehandelte *L. lactis* G121-Präparationen eine deutlich geringere Aktivität als unbehandelte Bakterien auf (vergleiche

Kapitel 2.5, Seite 27). Daher wurde die Hitzebeständigkeit der TLR2- und NOD2-Liganden in den *L. lactis* G121-Präparationen untersucht. Wie in Abb. 3.25 gezeigt, wurde die Aktivierung der Zellen durch die Behandlung der Bakterienpräparationen stark beeinflusst. Bereits nach 30minütiger Erhitzung der Bakterienpräparationen war weder eine TLR2- noch eine NOD2-Aktivierung nachweisbar.

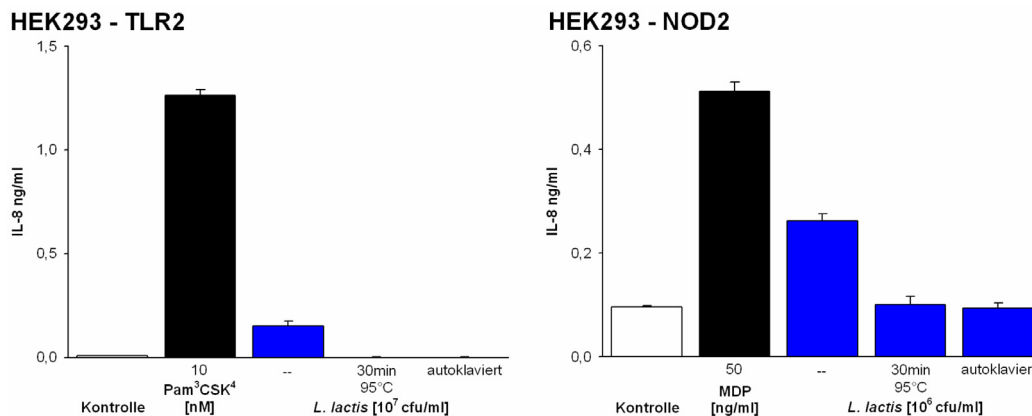


Abb. 3.25: Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch hitzebehandelte *L. lactis* G121-Präparationen.

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren transient transfiziert und anschließend mit *L. lactis* G121 bzw. entsprechenden Positivkontrollen stimuliert. Die *L. lactis* G121-Präparationen wurden zuvor auf die angegebene Weise vorbehandelt. Nach 18 h wurde die Aktivierung der Zellen anhand der IL-8 Konzentration im Überstand per ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem aus zwei unabhängigen Experimenten.

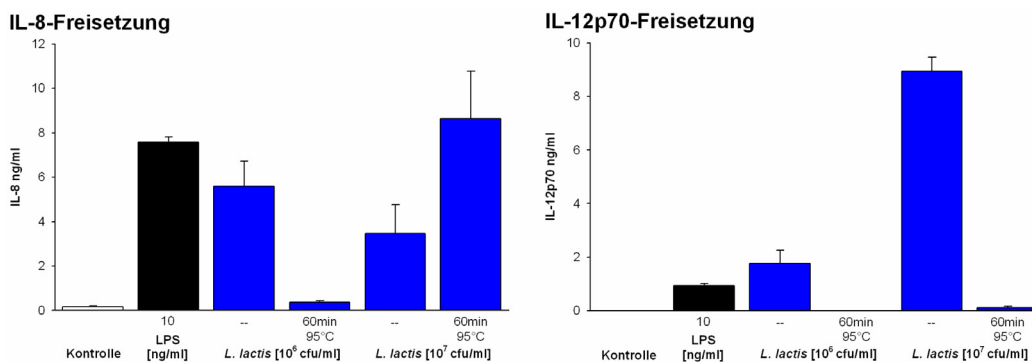


Abb. 3.26: Hitzebehandelte *L. lactis* G121-Präparationen aktivieren humane DCs, induzieren jedoch keine Produktion von IL-12p70.

Humane dendritische Zellen wurden mit den angegebenen Stimuli behandelt. Die *L. lactis* G121 Präparationen wurden zuvor auf die angegebene Weise vorbehandelt. Nach 16 h wurde die Konzentration von IL-8 und IL-12p70 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=2).

Der Effekt der Hitzebehandlung wurde auch im Hinblick auf die Aktivierung und Polarisierung von DCs untersucht (s. Abb. 3.26). Während unbehandelte *L. lactis* G121-Präparationen deutlich die Freisetzung von IL-8 und auch IL-12p70 induzierten, war diese Fähigkeit durch die Hitzebehandlung deutlich reduziert. Dabei zeigte sich, dass hitzebehandelte *L. lactis* G121-Präparationen bei Konzentrationen bis 10⁶ cfu/ml kein IL-8 induzieren konnten, höhere Konzentrationen (10⁷ cfu/ml) jedoch noch zur Produktion von IL-8 in DCs führten. Die

IL-12p70-Freisetzung wurde hingegen durch die Hitzebehandlung bei allen untersuchten Konzentrationen verhindert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Präparationen erzielt, die nur einer 5-minütigen Hitzebehandlung unterzogen wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen eine Bedeutung der TLR2- und vor allem der NOD2-Liganden für die Aktivierung und Polarisierung von DCs vermuten.

3.4.2 Bedeutung der TLR2-Liganden von *L. lactis* G121 für die Aktivierung von humanen DCs

Aus den Versuchen mit *A. lwoffii* F78-Präparationen war bereits bekannt, dass Pam₃CSK₄ (TLR2-Ligand) nicht in der Lage war, die Produktion von IL-12p70 in DCs zu induzieren (vergleiche auch Abb. 3.17, Seite 60). Um dies auch im Zusammenhang mit den ebenfalls in den *L. lactis* G121-Präparationen vorhandenen NOD2-Liganden näher zu untersuchen, wurden DCs mit Pam₃CSK₄ und MDP (NOD2-Ligand) alleine oder mit einer Kombination beider Stimuli behandelt. Wie in Abb. 3.27 dargestellt, konnten sowohl der TLR2-Ligand Pam₃CSK₄ als auch der NOD2-Ligand MDP alleine eine Freisetzung von IL-8 induzieren. Dabei war die Induktion von IL-8 durch MDP mit lediglich einer Verdoppelung der IL-8-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle generell sehr gering. Pam₃CSK₄ hingegen induzierte alleine in ähnlichem Ausmaße wie die *L. lactis* G121-Präparationen eine IL-8-Produktion. Die Kombination aus MDP und TLR2 führte zu einer stärkeren Aktivierung der Zellen. Dies lässt sich nicht durch eine rein additive Wirkung der Stimulantien erklären, sondern deutet eher auf eine synergistische Aktivierung der Zellen hin. Im Gegensatz zur gezeigten IL-8-Freisetzung waren die TLR2- und NOD2-Liganden weder alleine noch in Kombination in der Lage, die DCs zu einer IL-12p70-Produktion anzuregen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben TLR2 und NOD2 noch weitere Rezeptoren durch *L. lactis* G121 aktiviert werden, die möglicherweise ebenfalls zur Aktivierung und Polarisierung der DCs beitragen.

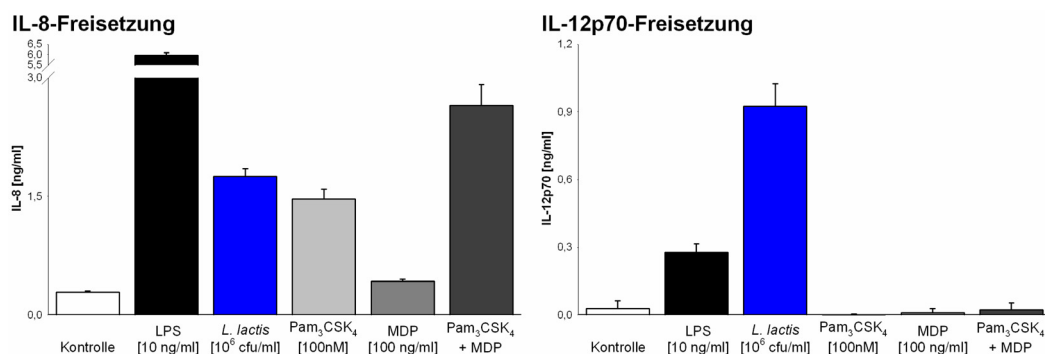


Abb. 3.27: Synthetische TLR2- oder NOD2-Liganden induzieren keine Produktion von IL-12p70. Humane dendritische Zellen wurden mit den angegebenen Stimuli behandelt. Bei der Behandlung der Zellen mit Pam₃CSK₄ und MDP gemeinsam wurden dieselben Konzentrationen verwendet wie bei der Einzelstimulation. Nach 16 h wurde die Konzentration von IL-8 und IL-12p70 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

Um zunächst die Bedeutung der TLR2-Liganden für die Aktivierung der DCs weiter zu untersuchen, wurden Experimente mit einem blockierenden TLR2-Antikörper durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.3.2 gezeigt, war dieser Antikörper in der Lage, die Aktivierung von DCs durch einen TLR2-Liganden (Pam₃CSK₄) zu unterbinden. Unter denselben Bedingungen konnte kein Effekt des Antikörpers auf die durch *L. lactis* G121-induzierte IL-8- und IL-12p70-Produktion nachgewiesen werden (s. Abb. 3.28). Die Blockierung von TLR2 hatte zudem auch keinen Einfluss auf die Produktion von TNF- α (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TLR2-Liganden von *L. lactis* G121 keine Rolle bei der Ausbildung eines T_H1-polarisierenden Programms in humanen DCs spielen.

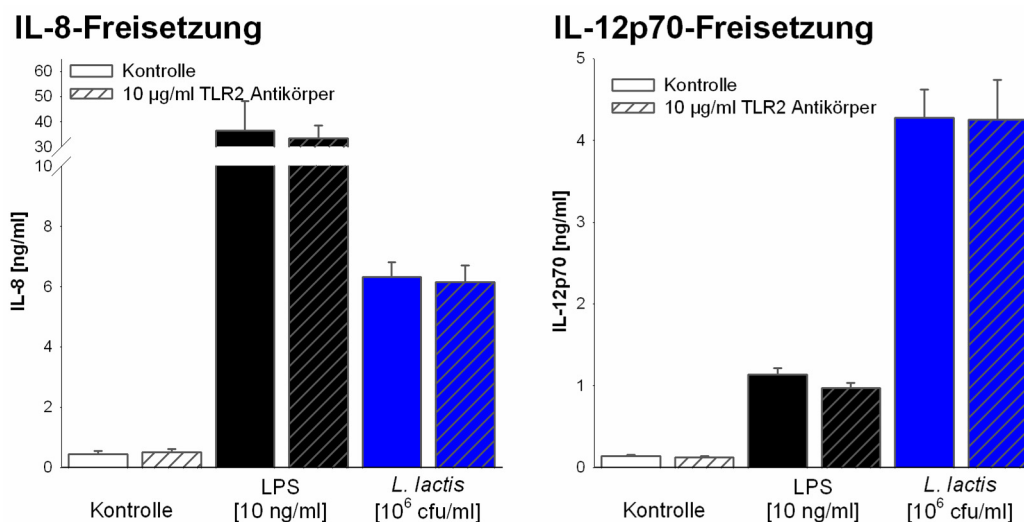


Abb. 3.28: Rolle der TLR2-Liganden von *L. lactis* G121 bei der Induktion von IL-8 und IL-12p70. Humane dendritische Zellen wurden mit den angegebenen Stimuli behandelt. Nach 24 h wurde die Konzentration von IL-8 und IL-12p70 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

3.4.3 Verspätete Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121

Auch wenn ein reiner NOD2-Ligand keine T_H1-polarisierenden Effekte induziert (s. Abb. 3.27, Seite 68), könnte dieser Rezeptor trotzdem eine wichtige Bedeutung bei der Aktivierung der Zellen durch *L. lactis* G121 haben. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von Zellen über intrazelluläre Rezeptoren zu einer späteren Aktivierung der Zellen führt, da der entsprechende Stimulus zuerst von der Zelle aufgenommen werden muss¹⁵⁴. Aus diesem Grund wurde die zeitliche Genregulation einiger wichtiger Polarisierungsmarker näher untersucht (s. Abb. 3.29). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation der Genexpression für TNF- α und beider Untereinheiten des IL-12 nach Stimulation mit *L. lactis* G121 deutlich später erfolgte als nach Stimulation mit LPS oder *A. Iwoffii* F78. Auch weitere Marker wie bspw. CCL5, IFN- β und MCP-1 (vergleiche auch Kapitel 3.2.2, Seite 52) zeigten eine deutlich spätere Regulation nach Behandlung der DCs mit *L. lactis* G121. Bei nahezu

allen untersuchten Genen induzierten LPS und *A. Iwoffii* F78 bereits nach drei bis sechs Stunden eine Zunahme der entsprechenden mRNA. Bei Stimulation mit *L. lactis* G121 war dagegen erst nach 12 h eine Aktivierung nachzuweisen.

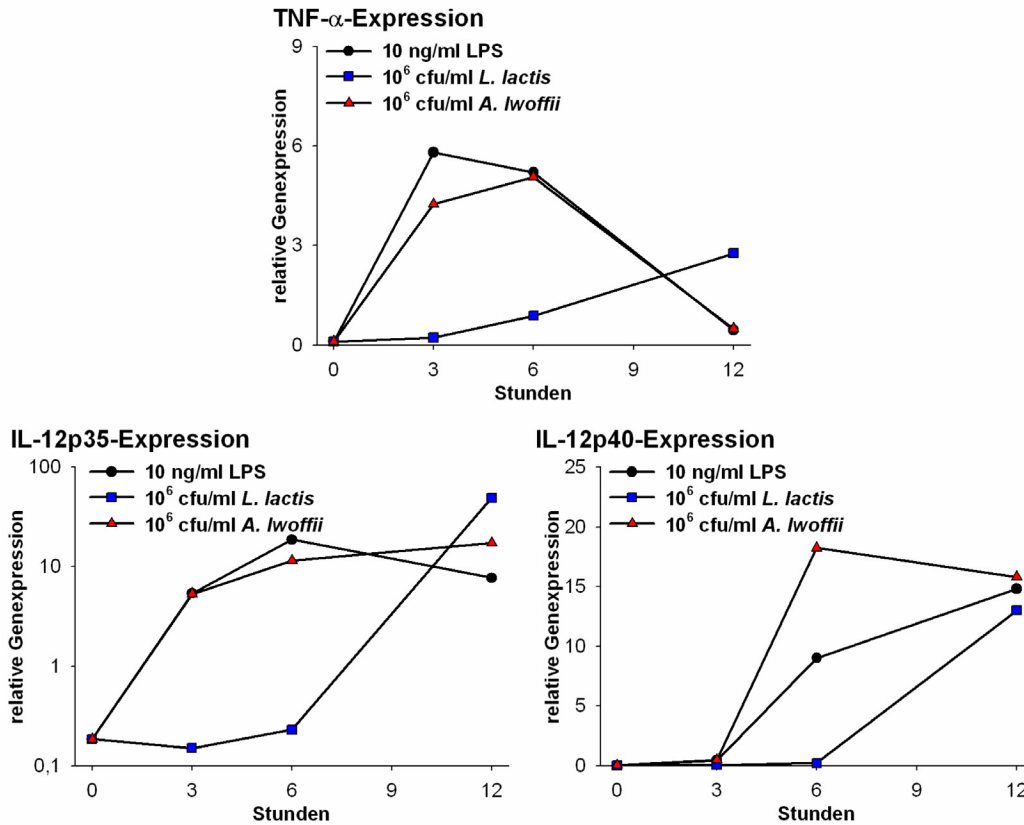


Abb. 3.29: Verspätete Aktivierung der Genexpression nach Stimulation mit *L. lactis* G121.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Expression der angezeigten Gene wurde relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT durch quantitative *real-time* PCR bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n≥3).

Diese auf Genebene beobachtete verspätete Aktivierung zeigte sich auch in der Freisetzung der entsprechenden Zytokine (s. Abb. 3.30). Während sich nach Stimulation mit LPS und *A. Iwoffii* F78 bereits nach 2 bis 4 h IL-8 und TNF- α nachweisen ließen, wurde nach Behandlung der DCs mit *L. lactis* G121 erst nach ca. 10 h TNF- α und nach ca. 14 h IL-8 ausgeschüttet. Auch die IL-12p70-Freisetzung war in den mit *L. lactis* G121 behandelten DCs verzögert (nach 14 h). Nach Stimulation mit LPS und *A. Iwoffii* F78 war IL-12p70 bereits nach 8 bis 10 h im Überstand nachweisbar. Diese Ergebnisse sprechen für die Involvierung eines intrazellulären Rezeptors, der an der Aktivierung der DCs durch *L. lactis* G121 beteiligt ist.

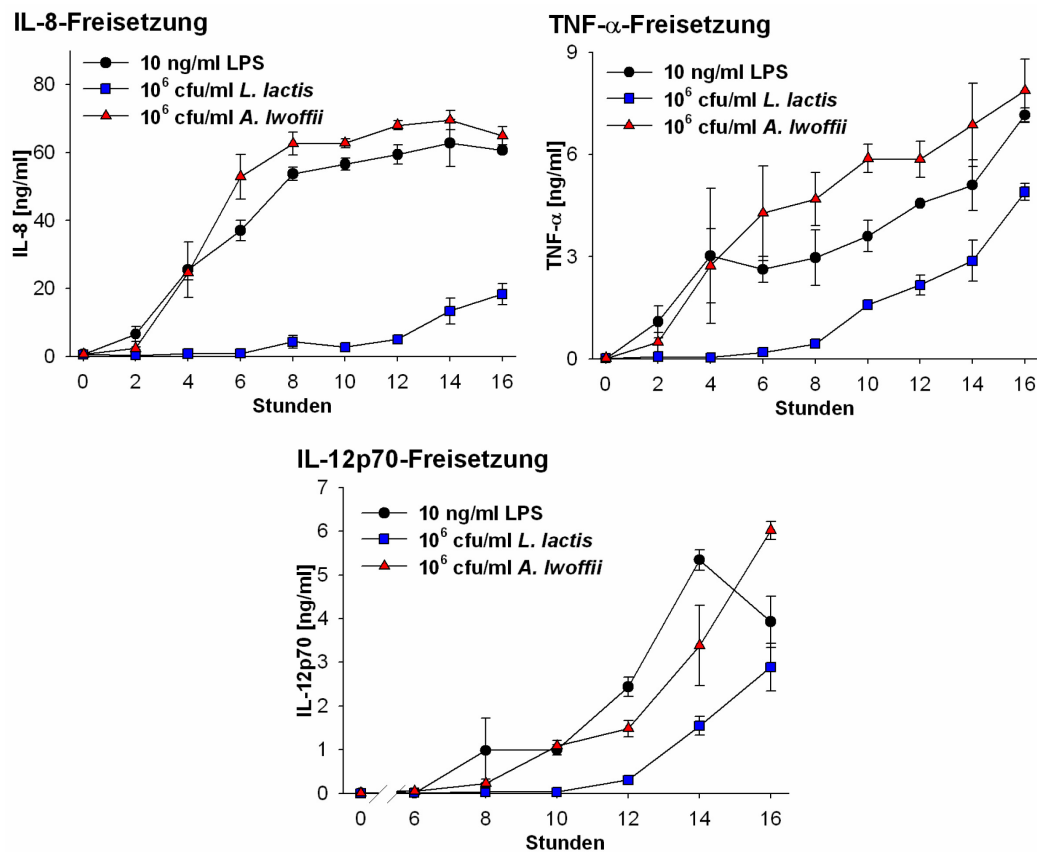


Abb. 3.30: Verspätete Freisetzung von Chemo- und Zytokinen nach Stimulation mit *L. lactis* G121.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Konzentration der angezeigten Chemo- bzw. Zytokine wurde mittels ELISA nach entsprechenden Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender ($n=1$ für die angezeigten Zeitpunkte, für leicht abgewandelte Kinetiken $n\geq 3$).

3.4.4 Ein intrazellulärer Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung humaner DCs durch *L. lactis* G121

Um eine Aktivierung der Zellen über NOD2 zu erreichen, müssten die DCs zunächst die Bakterien oder Bestandteile der Bakterien aufnehmen. Diese Aufnahme wurde mit FITC-markiertem *L. lactis* G121 untersucht. Wie in Abb. 3.31 dargestellt, waren humane DCs in der Lage *L. lactis* G121 zu phagozytieren. Dabei wiesen die Bakterien nach 2 h (Daten nicht gezeigt) und 4 h eine zytoplasmatische Lokalisation auf. Mit Hilfe von Cytochalasin D wurde zudem die Phagozytose blockiert was zu einer Hemmung der Aufnahme von *L. lactis* G121 durch die DCs führte (rechte Seite der Abbildung). Somit konnte Cytochalasin D genutzt werden, um die Aufnahme von *L. lactis* G121 und damit jegliche Aktivierung der Zellen über einen intrazellulären Rezeptor zu verhindern.

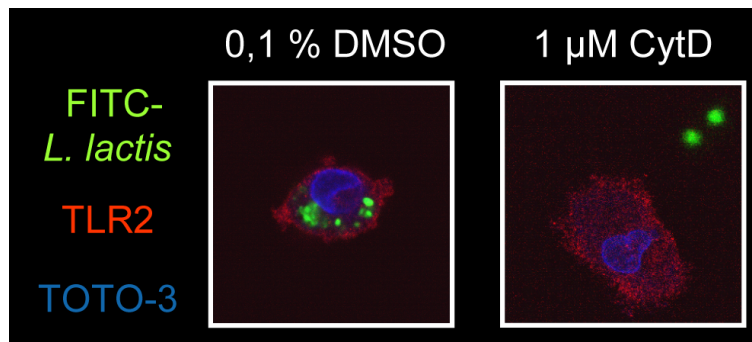


Abb. 3.31: Hemmung der Aufnahme von *L. lactis* G121 durch humane DCs mit Cytochalasin D. Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 30 min mit 0,1 % DMSO bzw. 1 µM Cytochalasin D vorinkubiert und dann in Gegenwart von 0,1 % DMSO (Kontrolle) bzw. 1 µM Cytochalasin D für 4 h mit 10⁶ cfu/ml FITC-gelabeltem *L. lactis* G121 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 2.11 beschrieben gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Konfokalen Lasermikroskop. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=2).

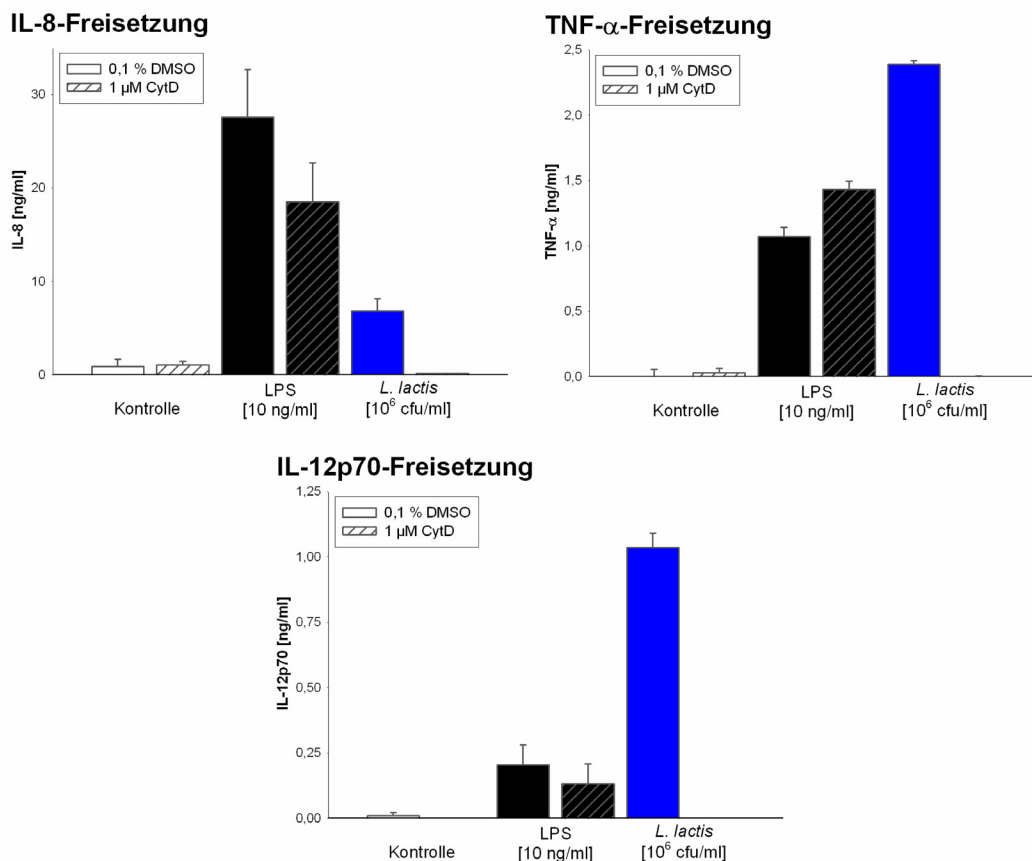


Abb. 3.32: Einfluss der Phagozytose-hemmenden Substanz Cytochalasin D auf die Aktivierung der DCs durch *L. lactis* G121.

Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 30 min mit 0,1 % DMSO bzw. 1 µM Cytochalasin D vorinkubiert und dann in Gegenwart entsprechender DMSO- und Cytochalasin D-Konzentration mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach 16 h wurde die Freisetzung von IL-12 im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von jeweils einem gesunden Spender (n≥3).

Unter denselben Bedingungen wie in dem in Abb. 3.31 dargestellten Experiment wurde ebenfalls der Einfluss von Cytochalasin D auf die Aktivierung und Polarisierung der DCs untersucht (s. Abb. 3.32). Sowohl die Aktivierung der Zellen (IL-8 Freisetzung) als auch die

T_H1-Ausrichtung der DCs (TNF- α - und IL-12p70-Freisetzung) wurde vollständig durch die Hemmung der Phagozytose verhindert. Derselbe inhibierende Effekt ließ sich bereits bei niedrigeren Konzentrationen (0,3 μ M, Daten nicht gezeigt) und auch bei höheren Konzentrationen an Cytochalasin D (3 μ M, Daten nicht gezeigt) nachweisen. Zudem war bereits auf Genebene keine Aktivierung der DCs durch *L. lactis* G121 nach Vorbehandlung mit Cytochalasin D mehr nachzuweisen. Die Hemmung der Phagozytose hatte wie schon in Abb. 3.19, Seite 62 gezeigt, keinen Effekt auf die LPS-induzierte Aktivierung und Polarisierung der DCs.

Diese Ergebnisse sprechen für eine bedeutende Rolle eines intrazellulären Rezeptors bei der Aktivierung und T_H1-Ausrichtung der DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121.

3.5 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN KUHSTALLBAKTERIEN UND REFERENZ-BAKTERIEN

Um einen tieferen Einblick in die möglichen Mechanismen der Allergieprotektion zu erhalten und um die möglichen Unterschiede der Kuhstallbakterien zu anderen Bakterien zu untersuchen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Als Referenz zu den Kuhstallbakterien wurden Bakterien gewählt, mit denen auch Kinder, die nicht auf einem Bauernhof aufwachsen, in Kontakt kommen könnten. Hierfür wurde *E. coli* F1111 9-41 als Gram-negatives und *B. subtilis* DSM 618 als Gram-positives Referenzbakterium ausgewählt.

3.5.1 Microarray-Analysen von Bakterien-behandelten humanen DCs

Für die Microarray-Analysen wurden humane DCs zweier gesunder Spender mit jeweils 10⁶ cfu/ml *A. lwoffii* F78, *L. lactis* G121, *E. coli* F1111 9-41 bzw. *B. subtilis* DSM 618 behandelt und nach entsprechenden Zeitpunkten (Spender 1: nach 3 und 6 h, Spender 2: nach 12 h) die RNA gewonnen. Die Durchführung und Aufbereitung der Rohdaten (Normalisierung, Angleichen der Arrays der unterschiedlichen Spender) wurde in Kooperation mit Jörg Mages und Roland Lang in München am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunology und Hygiene an der TU München durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.13, Seite 43). Der verwendete Array von Affymetrix (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) enthält über 54.000 *Probe Sets*, mit denen 38.500 Gene abgedeckt werden (teilweise mehrere *Probe Sets* für ein Gen). Für eine erste Analyse der Daten wurden zunächst alle *Probe Sets* herausgesucht, bei denen mindestens zwei Proben ein positives Signal auf dem Array zeigten (*Present Call* \geq 2). Von den so erhaltenen 22.149 *Probe Sets* wurden Scatterplots angefertigt, wobei jeweils die Werte der verschiedenen Bakterienbehandlungen gegen die Kontrollwerte aufgetragen wurden (s. Abb. 3.33). Bei dieser Art der Darstellung zeigt die Streuung der als Punkte dargestellten Werte um die

Diagonale die Stärke der Genregulation an: je mehr der dargestellte Punkt sich zum Beispiel von der Diagonale nach oben verschiebt, desto höher ist das Gen (bzw. *Probe Set*) im Vergleich zur Kontrolle exprimiert. Wie in Abb. 3.33 zu sehen, weisen die Scatterplots von *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 große Ähnlichkeit auf. Bereits nach 3 h waren viele *Probe Sets* sowohl positiv als auch negativ reguliert. Die Anzahl der regulierten *Probe Sets* stieg weiterhin bis zum 12 h-Wert kontinuierlich an (s. auch Tab. 3.2, Seite 75). Bei Stimulation der DCs mit *L. lactis* G121 hingegen, wurden nach 3 h kaum und nach 6 h nur wenige *Probe Sets* reguliert. Nach 12 h glich das Bild jedoch dem nach *A. Iwoffii* F78- bzw. *E. coli* F1111 9-41-Stimulation. Einen ähnlichen Verlauf wie bei der *L. lactis* G121-Stimulation zeigte die Genregulation auch nach *B. subtilis* DSM 618-Behandlung. Allerdings wurden zu früheren Zeitpunkten schon mehr *Probe Sets* als bei *L. lactis* G121 reguliert, nach 12 h hingegen weniger. Eine nähere Analyse der Anzahl der regulierten Gene (*Probe Sets*) bestätigte das Ergebnis der Scatterplots (s. Tab. 3.2).

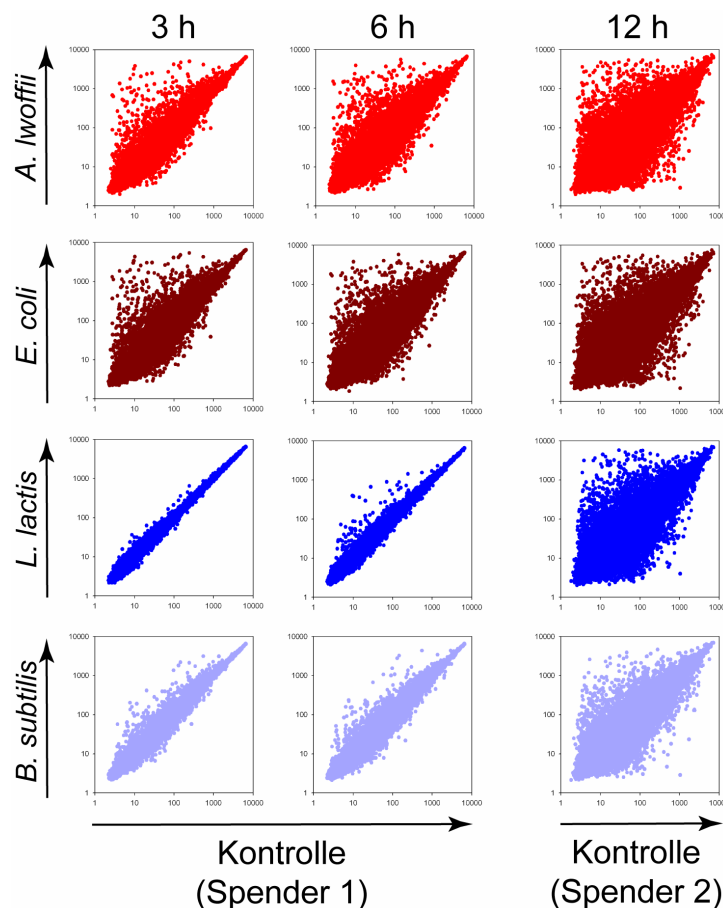


Abb. 3.33: Scatterplot-Analyse der Genregulation in humanen DCs nach Behandlung mit verschiedenen Bakterien.

DCs von zwei gesunden Spendern (Spender 1 für 3 und 6 h, Spender 2 für 12 h) wurden mit den angegebenen Bakterien (10^6 cfu/ml) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA für Microarray-Analysen (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2.0 Array) gewonnen. Nur die normalisierten Genexpressionsdaten mit mind. 2 *Present Calls* wurden für die Scatterplot-Analyse verwendet (22.149 *Probe Sets*). Die Daten der bakterienbehandelten DCs wurden gegen die jeweilige Kontrolle aufgetragen, dabei repräsentiert jeder Punkt die normalisierte Signalstärke eines einzelnen *Probe Sets*.

Tab. 3.2: Anzahl regulierter *Probe Sets* nach Stimulation mit den verschiedenen Bakterien. ^A

		<i>fold induction</i>			
		> 2	> 3	< 0,5	< 0,33
gesamt		4655	2676	6935	3321
<i>A. Iwoffii</i> F78	3 h	916 (108)	445 (60)	862 (149)	174 (31)
	6 h	1555 (259)	812 (144)	2196 (697)	602 (217)
	12 h	2886 (1654)	1700 (1071)	3976 (2624)	1983 (1625)
	gesamt	3383	1974	5055	2280
<i>E. coli</i> F1111 9-41	3 h	1108 (135)	589 (86)	1758 (546)	446 (170)
	6 h	1684 (263)	893 (151)	2405 (634)	742 (257)
	12 h	3032 (1691)	1817 (1106)	3891 (2347)	1963 (1521)
	gesamt	3588	2136	5493	2489
<i>L. lactis</i> G121	3 h	27 (8)	5 (1)	4 (3)	0 (0)
	6 h	137 (11)	54 (1)	21 (10)	0 (0)
	12 h	2733 (2608)	1615 (1563)	4368 (4358)	2005 (2005)
	gesamt	2754	1618	4382	2005
<i>B. subtilis</i> DSM 618	3 h	290 (42)	106 (15)	143 (33)	17 (4)
	6 h	416 (78)	142 (27)	424 (156)	56 (22)
	12 h	2124 (1795)	1040 (919)	2050 (1791)	819 (779)
	gesamt	2294	1093	2273	846

^A DCs von zwei gesunden Spendern (Spender 1 für 3 und 6 h, Spender 2 für 12 h) wurden mit den angegebenen Bakterien (10^6 cfu/ml) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA für Microarray-Analysen (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2.0 Array) gewonnen. Normalisierte Genexpressionsdaten mit mind. 2 *Present Calls* wurden auf die jeweils unbehandelten Kontrollen bezogen (*fold induction*). Angegeben ist die Anzahl der *Probe Sets*, bei denen die *fold induction* größer 2 oder 3 bzw. kleiner 0,5 oder 0,33 war. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der *Probe Sets* an, die nur zu diesem Zeitpunkt reguliert waren.

Um eine Aussage über Analogien bzw. Unterschiede in der Aktivierung der DCs durch die verschiedenen Bakterien machen zu können, wurden die Microarray-Daten mit Hilfe von „Cluster“ (EisenLab Software) analysiert. Zunächst wurden die *Probe Sets* mit mindestens einem *fold induction*-Wert über 5 (5-fache Hochregulation) bzw. unter 0,2 (5-fache Herunterregulation) durch die Software anhand ihrer Ähnlichkeit gruppiert und mit Hilfe von „TreeView v. 1.60“ (EisenLab Software) visualisiert. Die Verwandtschaft zwischen den einzelnen Aktivierungsmustern wird dabei mit Hilfe von Stammbäumen dargestellt, wobei die Länge der jeweiligen Klammern den Grad der Verwandtschaft wiedergibt. Wie in Abb. 3.34 gezeigt, wies die Aktivierung der DCs nach Behandlung mit *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 sehr große Ähnlichkeit auf, wobei die Genexpressionsmuster nach 3, 6 und auch 12 h untereinander jeweils die größte Verwandtschaft aufzeigten. Die Genregulation nach 12 h durch *L. lactis* G121 hatte ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit mit der durch *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 induzierten Expression. Dagegen war die Aktivierung nach 6 h durch *L. lactis* G121 nur entfernt mit der durch *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 verursachten Geninduktion nach 3 und 6 h verwandt. Das durch Stimulation der DCs für 3 h mit *L. lactis* G121 induzierte Expressionsmuster wies die geringste Ähnlichkeit zu einem der anderen

Aktivierungsmuster auf. Die durch *B. subtilis* DSM 618 induzierte Genregulation wich deutlich von der durch die anderen Bakterien verursachten Aktivierung ab. So zeigten die unterschiedlichen Zeitpunkte der *B. subtilis* DSM 618-Stimulation untereinander die höchste Verwandtschaft und waren nur marginal mit der gesamten Gruppe der anderen Stimulationen verwandt. Wie oben beschrieben, wurden vor der Gruppierung der Daten bestimmte Filter verwendet, um zunächst eine Vorauswahl der *Probe Sets* treffen zu können. So wurde für die in Abb. 3.34 gezeigte Gruppierung eine Auswahl an 2686 *Probe Sets* zu Grunde gelegt. Wurden vor der Gruppierung andere Filter benutzt, so veränderte sich dadurch auch jeweils leicht die Einteilung der Daten in die Gruppen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt ergab sich jedoch stets ein ähnliches Bild wie in Abb. 3.34 gezeigt.

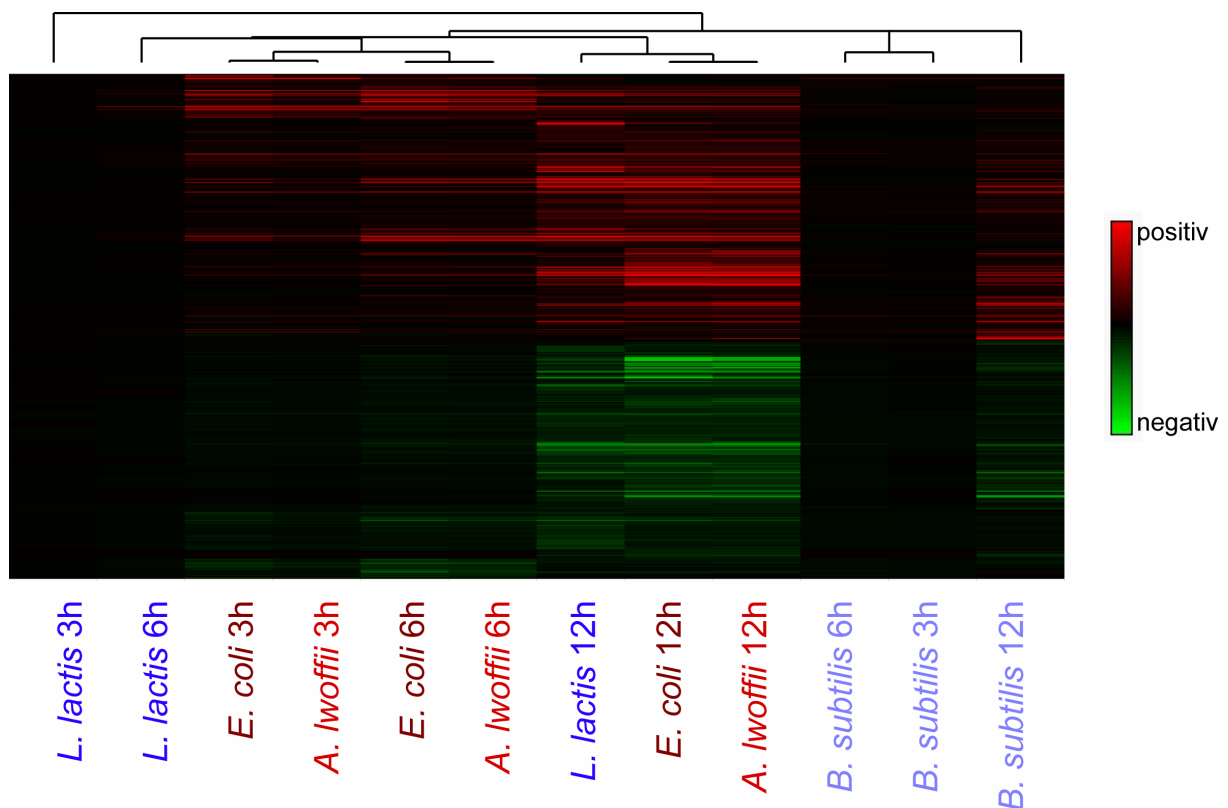


Abb. 3.34: Verwandtschaftsanalyse der Genregulation in humanen DCs nach Behandlung mit verschiedenen Bakterien.

DCs von zwei gesunden Spendern (Spender 1 für 3 und 6 h, Spender 2 für 12 h) wurden mit den angegebenen Bakterien (10^6 cfu/ml) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA für Microarray-Analysen (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2.0 Array) gewonnen. Normalisierte Genexpressionsdaten mit mind. 2 *Present Calls* wurden auf die jeweils unbehandelten Kontrollen bezogen (*fold induction*). Diese Werte wurden anschließend auf die Daten mit einer *fold induction* von mindestens größer als 5 bzw. kleiner als 0,2 gefiltert. Die so erhaltenen 2868 *Probe Sets* wurden mit Cluster v. 3.0 (EisenLab Software) analysiert. *Average linkage clustering* wurde durchgeführt und mit Hilfe von TreeView v. 1.60 (EisenLab Software) visualisiert. Die Klammern (oben) geben die Verwandtschaftsbeziehung zwischen den einzelnen Behandlungen an.

3.5.2 Polarisierung dendritischer Zellen durch Kuhstallbakterien und entsprechende Referenzbakterien

Da die Verwandtschaftsanalysen eine hohe Ähnlichkeit der Genregulation nach Stimulation mit *A. Iwoffii* F78, *E. coli* F1111 9-41 und auch *L. lactis* G121 nach 12 h zeigten, wurden die Arraydaten zunächst im Hinblick auf die mit den Kuhstallbakterien bereits untersuchten Marker für die T_H1-Zellpolarisierung näher analysiert (vergleiche auch Kapitel 3.2.2, Seite 51). Wie in Abb. 3.35 dargestellt, belegten auch die Arraydaten die T_H1-polarisierende Wirkung der beiden Kuhstallbakterien (Induktion von z.B. IL-12 und ICAM-1). Dabei zeigte sich auch hier zum einen die verspätete Aktivierung der Zellen durch *L. lactis* G121 (CCL5, IFN-β) im Vergleich zur Aktivierung mit *A. Iwoffii* F78. Zum anderen wurden die leichten Unterschiede in der Regulation einzelner Gene, wie bspw. IL-23p19, das durch *L. lactis* G121 nicht induziert wurde, bestätigt. Außer ICAM-1 wurde keiner der T_H1-polarisierenden Marker durch *B. subtilis* DSM 618 induziert. Dieses Ergebnis konnte für IL-12p70 auch auf Proteinebene bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Während *E. coli* F1111 9-41 wie die beiden Kuhstallbakterien die Freisetzung von IL-12p70 in humanen DCs induzierte, war *B. subtilis* DSM 618 dazu nicht in der Lage.

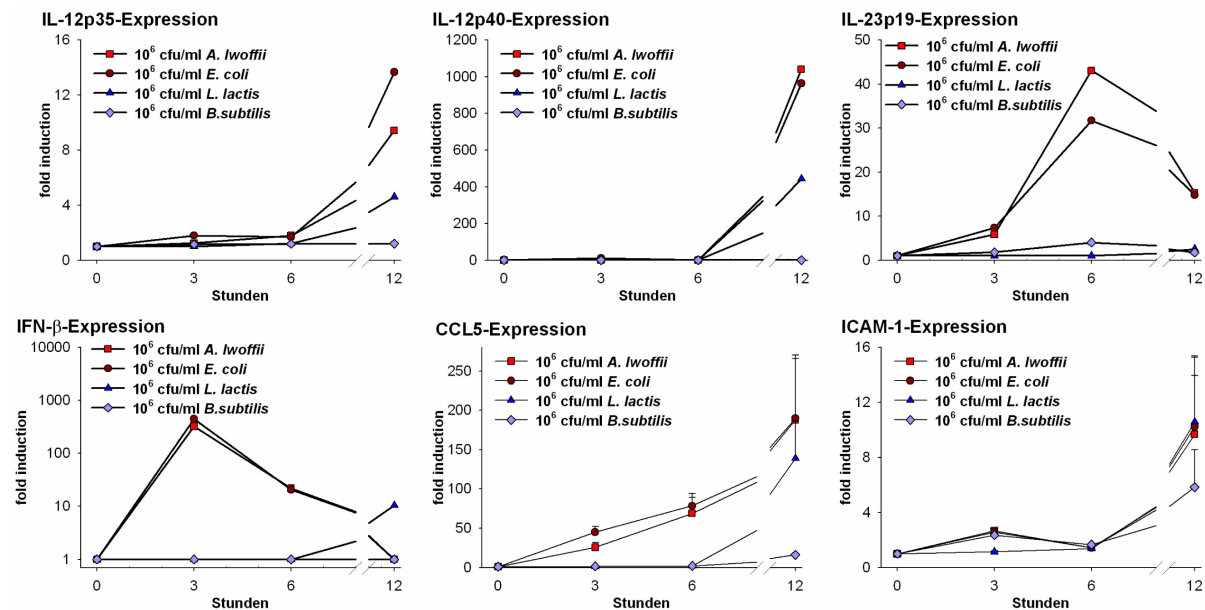


Abb. 3.35: Microarray-Daten für T_H1-polarisierende Marker auf humanen DCs nach Bakterienbehandlung.

DCs von zwei gesunden Spendern (Spender 1 für 3 und 6 h, Spender 2 für 12 h) wurden mit den angegebenen Bakterien (10⁶ cfu/ml) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA für Microarray-Analysen (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2.0 Array) gewonnen. Normalisierte Genexpressionsdaten mit mind. 2 *Present Calls* wurden auf die jeweils unbehandelten Kontrollen bezogen (*fold induction*) und für die angegebenen Gene dargestellt. Dabei wurden Daten ohne *Present Call* 1 gesetzt. Bei den Genen mit mehr als einem *Probe Set* sind die Mittelwerte + Standardabweichung aller *Probe Sets* dargestellt.

Eine weitere Analyse von T_H2- bzw. T_{Reg}-polarisierenden Markern ergab, dass die Kuhstallbakterien, wie bereits in Kapitel 3.2.2, Seite 51 erwähnt, weder Marker für die T_H2-

Polarisierung noch für die Polarisation der T-Zellen in Richtung regulatorischer Immunantwort induzierten (s. Abb. 3.36). Auch die beiden Referenzbakterien zeigten keine Polarisation der DCs in eine der beiden Richtungen.

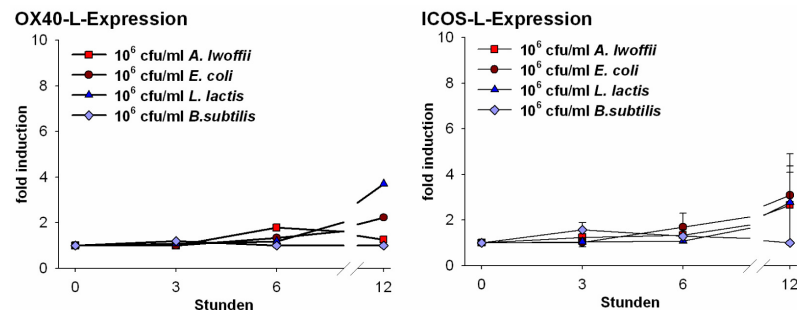


Abb. 3.36: Microarray-Daten für T_H2- bzw. T_{Reg}-polarisierende Marker auf humanen DCs nach Bakterienbehandlung.

DCs von zwei gesunden Spendern (Spender 1 für 3 und 6 h, Spender 2 für 12 h) wurden mit den angegebenen Bakterien (10⁶ cfu/ml) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA für Microarray-Analysen (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2.0 Array) gewonnen. Normalisierte Genexpressionsdaten mit mind. 2 *Present Calls* wurden auf die jeweils unbehandelten Kontrollen bezogen (*fold induction*) und für die angegebenen Gene dargestellt. Dabei wurden Daten ohne *Present Call* 1 gesetzt. Bei den Genen mit mehr als einem *Probe Set* sind die Mittelwerte + Standardabweichung aller *Probe Sets* dargestellt.

Durch die bisher beschriebenen Analysen der Microarray-Daten konnten bereits deutliche Unterschiede zwischen der Aktivierung der DCs durch die Kuhstallbakterien und *B. subtilis* DSM 618 gezeigt werden, wohingegen die Aktivierung der DCs mit *E. coli* F1111 9-41 Analogien zu der Aktivierung durch die Kuhstallbakterien aufwies. Um diese Unterschiede und Analogien weiter zu untersuchen, sind eine Reihe weiterer Analysen in Bearbeitung (s. auch Kapitel 3.6.1). Der Großteil der Analysen wird jedoch nicht mehr in der vorliegenden Arbeit sondern im Rahmen eines Anschlussprojektes durchgeführt.

3.6 MÖGLICHE MECHANISMEN DER ALLERGIEPRÄVENTION

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, sollten die möglichen Mechanismen der Allergieprävention durch die Kuhstallbakterien aufgedeckt werden. Daher wurden die im Microarray beobachteten Unterschiede zwischen den Referenz- und den Kuhstallbakterien im Detail analysiert. Zudem wurden aber auch zentrale Signalwege der angeborenen Immunantwort näher untersucht.

3.6.1 Aktivierung verschiedener IRFs durch *L. lactis* G121

Bei der Analyse der im Microarray durch *L. lactis* G121 regulierten Gene stachen unter den am höchsten regulierten Genen u.a. viele Interferon-abhängige Gene hervor (siehe Abb. 3.37), wobei eine vergleichbare Regulation dieser Gene auch nach Stimulation mit *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 beobachtet wurde. Für den Interferon-Signalweg sind

neben NF-κB auch die *Interferon regulatory factors* (IRFs) entscheidend^{155;156}. Daher wurde im HEK293-System die Aktivierung von IRF3 und des IFN-β-Promotors näher untersucht. Für die mit TLR3-transfizierten Zellen konnte bei Stimulation mit dem TLR3-Liganden PolyI:C wie erwartet eine deutliche Aktivierung sowohl von IRF3 als auch des IFN-β-Promotors gezeigt werden (s. Abb. 3.38). Dahingegen war in den NOD2-transfizierten Zellen weder eine Aktivierung von IRF3 oder des IFN-β-Promotors nach Behandlung der Zellen mit MDP sowie *L. lactis* G121 nachweisbar, wobei eine generelle Aktivierung der Zelle durch die beiden Stimuli anhand der IL-8-Freisetzung messbar war. Dementsprechend konnte die im Microarray beobachtete Induktion des IFN-Signalweges bisher nicht bestätigt werden.

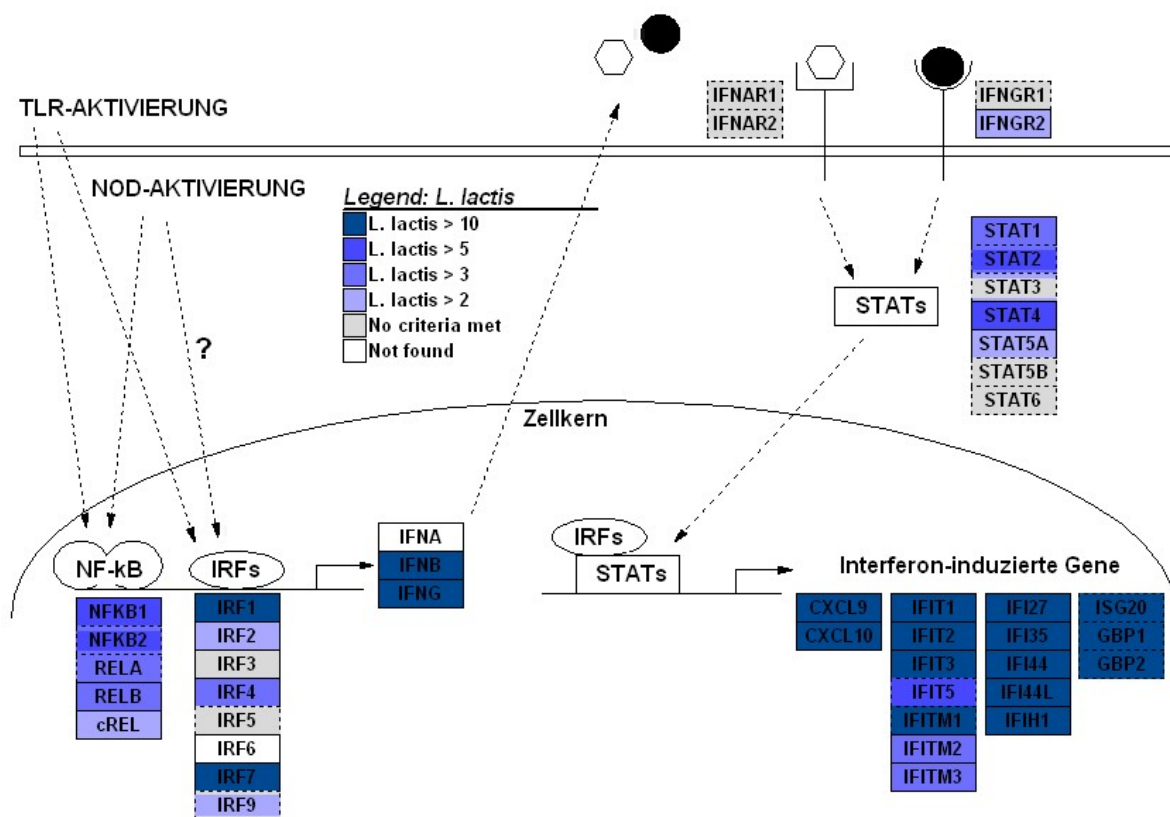
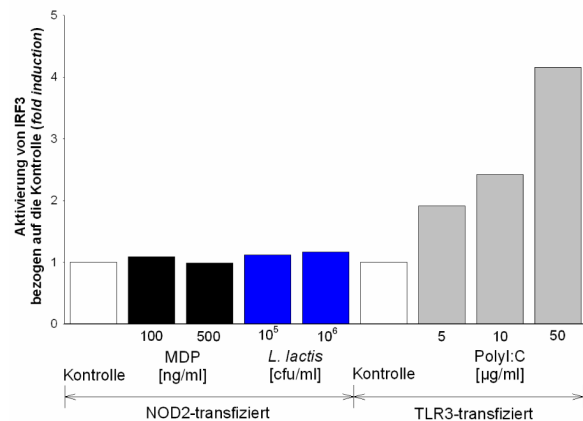
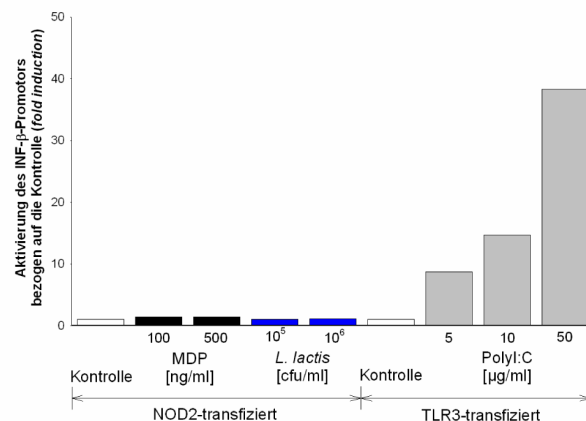


Abb. 3.37: Induktion verschiedener Gene im Interferon-Signalweg durch *L. lactis* G121.

DCs von zwei gesunden Spendern (Spender 1 für 3 und 6 h, Spender 2 für 12 h) wurden mit den angegebenen Bakterien (10^6 cfu/ml) behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA für Microarray-Analysen (Affymetrix, Human Genome U133 Plus 2.0 Array) gewonnen. Mit Hilfe der Software GenMapp v. 2.1 wurden die Gene des Interferon-Weges in einer Mappe zusammengestellt und die Regulation der Genexpression nach Bakterienbehandlung, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen (fold induction), visualisiert (siehe Legende).

IFNAR1, *Interferon-alpha/beta receptor alpha chain*; IFNAR2, *Interferon-alpha/beta receptor beta chain*; IFNGR1, *Interferon-gamma receptor alpha chain*; IFNGR2, *Interferon-gamma receptor beta chain*; CXCL, *chemokine (C-X-C motif) ligand*; IFIT, *Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*; IFITM, *Interferon-induced transmembrane protein*; IFI, *Interferon induced protein*; IFI44L, *Interferon induced protein 44-like*; IFIH1, *Interferon induced with helicase C domain protein 1*; ISG20, *Interferon-stimulated gene 20 kDa protein*; GBP, *Interferon-induced guanylate-binding protein*

Aktivierung von IRF3

Aktivierung des INF- β -Promotors**Abb. 3.38: Aktivierung von IRF3 und des INF- β -Promotors.**

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Rezeptoren und den Luciferase-gekoppelten Reporterplasmiden transient transfiziert und anschließend mit den angegebenen Stimuli behandelt. Nach 16 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase-gekoppelten Reporterplasmide mittels Chemilumineszenz bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.6.2 Aktivierung von NF- κ B-Untereinheiten durch *L. lactis* G121

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere wichtige Signalwege der angeborenen Immunantwort untersucht. Nina Dickgreber konnte in ihrer Diplomarbeit bereits zeigen, dass sich die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden in DCs nach Behandlung mit *L. lactis* G121 von der Aktivierung durch *A. lwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 unterscheidet¹⁵². So wurde nachgewiesen, dass verschiedene MAP-Kinasen und STAT-Proteine verspätet aktiviert wurden und sich auch die Intensität der Aktivierung unterschied. Während zum Beispiel nach Stimulation mit *A. lwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 eine deutliche Phosphorylierung und damit einhergehende Degradierung von I- κ B beobachtet werden konnte, war nach Behandlung der DCs mit *L. lactis* G121 nur eine schwache Phosphorylierung und Degradierung von I- κ B nachweisbar. Da die Phosphorylierung und damit einhergehende Degradierung von I- κ B einen wichtigen Schritt für den NF- κ B-Signalweg darstellt, wurde dieser Signalweg in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung verschiedener NF- κ B-Untereinheiten nach Stimulation der DCs mit *L. lactis* G121 mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie untersucht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (s. Kapitel 1.5, Seite 19) werden im humanen System 5 verschiedene NF- κ B-Untereinheiten exprimiert. Zunächst wurde die Translokation der häufig aktivierten Untereinheit p65 untersucht (s. Abb. 3.39). Bei Stimulation der DCs mit *E. coli* F1111 9-41 ließ sich nach 30 min eine deutliche Kernlokalisierung der p65-Untereinheit feststellen, die bis zu 120 min anhielt. Nach 180 min war keine Kernlokalisierung von p65 mehr nachweisbar. Bei der Behandlung der DCs mit *L. lactis* G121 hingegen ließ sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern

nachweisen. Die Stimulation der DCs mit *A. lwoffii* F78 führte, vergleichbar mit den nach *E. coli* F1111 9-41-Stimulation erzielten Ergebnissen, zu einer Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern (Daten nicht gezeigt)

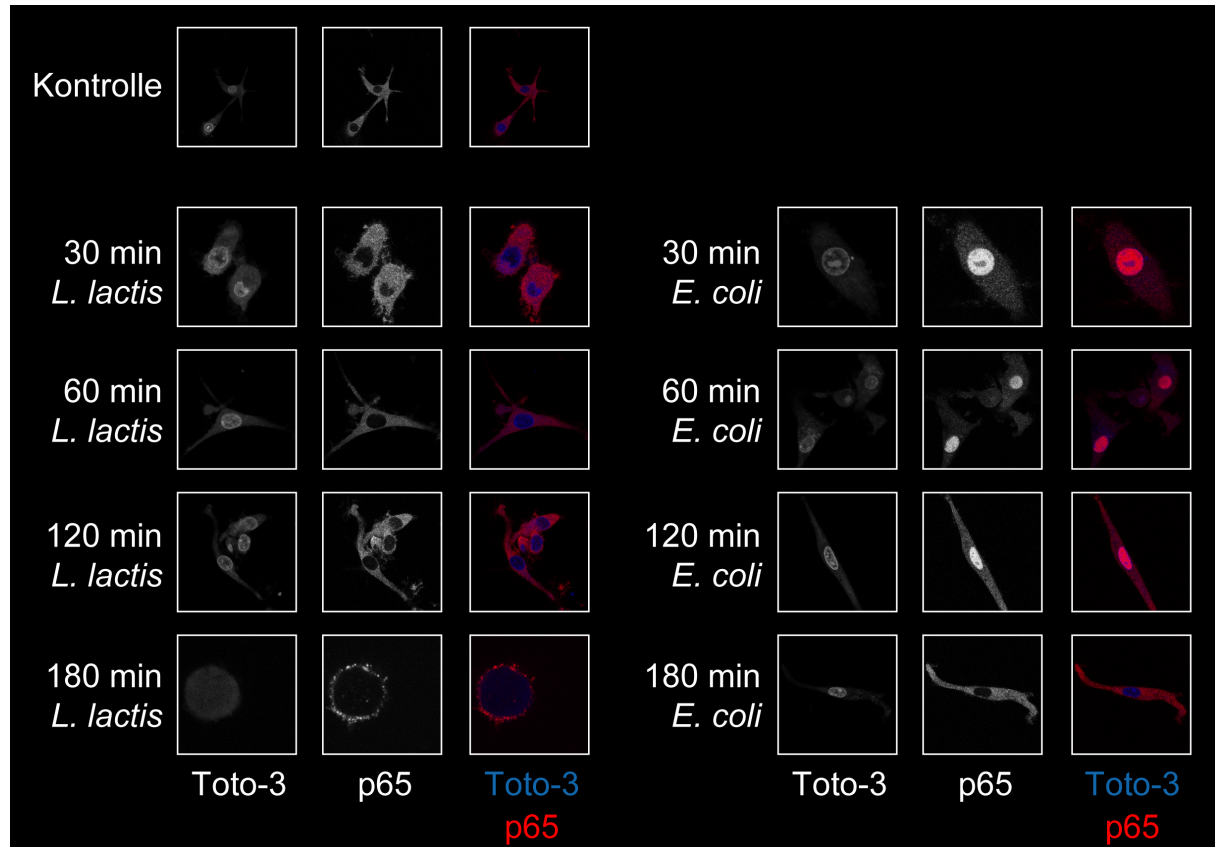


Abb. 3.39: Lokalisation der p65-Untereinheit in humanen DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121 bzw. *E. coli* F1111 9-41.

Humane dendritische Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit *L. lactis* G121 bzw. *E. coli* F1111 9-41 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen wie im Kapitel 2.11 beschrieben gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Konfokalen Lasermikroskop. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

Im Weiteren wurde die Translokation der c-Rel-Untereinheit untersucht (s. Abb. 3.40). Hier war bereits in den Kontrollen ein geringer Anteil des c-Rel der Zelle im Zellkern lokalisiert, der Großteil lag jedoch im Zytosol vor. Nach 30-minütiger Inkubation mit *E. coli* F1111 9-41 stieg die Konzentration von c-Rel im Zellkern leicht an, was nach 60 min noch deutlicher zu beobachten war. Nach 120- und 180-minütiger Stimulation der Zellen mit *E. coli* F1111 9-41 ließ sich in vielen Zellen eine Translokation von c-Rel in den Zellkern eindeutig nachweisen, wohingegen in einigen Zellen keine Translokation zu verzeichnen war. Bei Behandlung der Zellen mit *L. lactis* G121 kam es in einem Großteil der Zellen ebenfalls zu einer Translokation der c-Rel-Untereinheit in den Zellkern, jedoch erst nach 120 min und damit deutlich später als dies nach einer Stimulation der Zellen mit *E. coli* F1111 9-41 zu verzeichnen war. Die beobachtete Translokation von c-Rel in den Zellkern war auch noch nach 180 min zu beobachten.

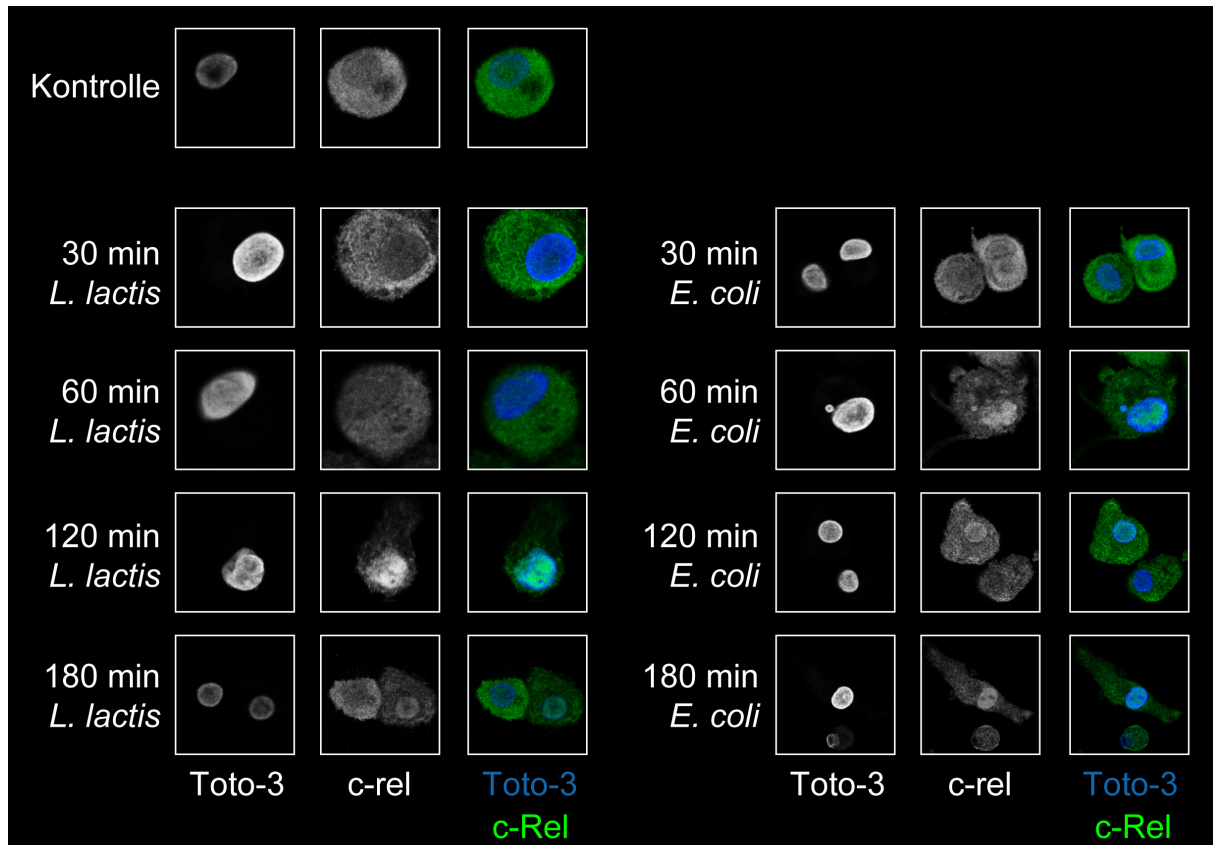


Abb. 3.40: Translokation der c-Rel-Untereinheit in den Zellkern humaner DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121 bzw. *E. coli* F1111 9-41.

Humane dendritische Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit *L. lactis* G121 bzw. *E. coli* F1111 9-41 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen wie im Kapitel 2.11 beschrieben gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Konfokalen Lasermikroskop. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=3).

3.6.3 Langanhaltende Aktivierung humaner DCs durch *L. lactis* G121

Wie bereits in Kapitel 3.4.3, Seite 69 beschrieben, aktiviert *L. lactis* G121 humane DCs deutlich später als die anderen untersuchten Bakterien. Um die Aktivierungskinetik weiter zu untersuchen, wurden humane DCs für bis zu 48 h mit den Bakterien behandelt. Nach jeweils 6, 12, 24 und 48 Stunden Stimulation wurde RNA gewonnen und die Expression des T_H1-polarisierenden Zytokins IL-12p70 gemessen. Wie in Abb. 3.41 deutlich zu erkennen, lag das Maximum der Induktion der Genexpression nach Stimulation mit *E. coli* F1111 9-41 bei 12 h. Die IL-12p40 Untereinheit wurde nach Behandlung der Zellen mit *E. coli* F1111 9-41 auch noch nach 24 h in geringen Mengen exprimiert, wohingegen die IL-12p35 Untereinheit nach 24 h nicht mehr nachzuweisen war. Bei Stimulation der DCs mit *L. lactis* G121 hingegen, lag das Maximum bei 24 h, jedoch war auch nach 48 h noch eine deutliche Expression beider Untereinheiten zu sehen.

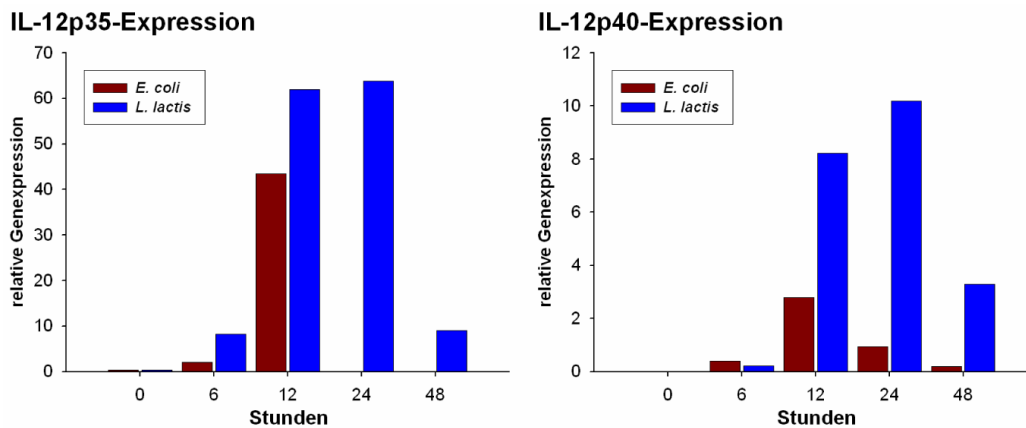


Abb. 3.41: Länger anhaltende Aktivierung von DCs auf Genebene nach Stimulation mit *L. lactis* G121.

Humane DCs wurden mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Die Expression der angezeigten Gene wurde relativ zu dem *Housekeeping*-Gen HPRT durch quantitative *real-time* PCR bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n=1 für gezeigte Kinetik, für leicht abgeänderte Kinetiken n≥2).

Um beurteilen zu können, ob diese länger anhaltende Expression auch zu einer andauernden Freisetzung der Zytokine führt, wurden humane DCs nach 16 h Stimulation gewaschen und nochmals für 20 h in Kultur genommen. Nach beiden Zeitpunkten wurde die Konzentration der freigesetzten Zytokine bestimmt (s. Abb. 3.42). Während die mit *L. lactis* G121 behandelten DCs auch nach 16 h noch IL-12p70 produzierten, war das bei den mit *A. Iwoffii* F78 oder *E. coli* F1111 9-41 behandelten Zellen nicht der Fall. Hier wurde nach 16 h kein oder nur noch sehr wenig IL-12p70 gebildet und freigesetzt. Bei den mit *L. lactis* G121 behandelten DCs konnte auch nach längerer Inkubation (24 h Kultur vor der Rekultur) noch eine Zytokinfreisetzung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

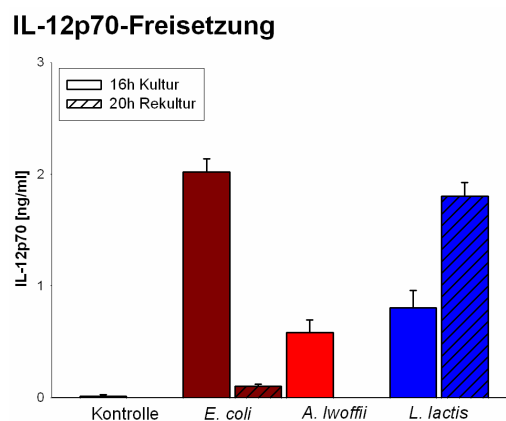


Abb. 3.42: Länger anhaltende T_H1-Polarisierung von DCs nach Stimulation mit *L. lactis* G121.

Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 16 h mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die DCs gewaschen und erneut in Kultur genommen. Nach weiteren 20 h wurde erneut der Überstand gewonnen und die Freisetzung von IL-12 im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender (n≥3).

Insgesamt konnte demnach durch eine Stimulation mit *L. lactis* G121 eine sehr lang andauernde Aktivierung und T_H1-Polarisierung der DCs hervorgerufen werden, wohingegen

diese Aktivierung und Polarisierung der Zellen durch Stimulation mit *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 zumindest im Hinblick auf die IL-12-Freisetzung nur bis zu 16 h anhielt.

3.6.4 Synergistische Effekte von *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121

Da Kinder, die auf Bauernhöfen groß werden, nicht nur mit einem der beiden Bakterien in Kontakt kommen, sondern immer mit einem ganzen Spektrum an verschiedenen Mikroorganismen, wurde untersucht, ob die Kombination verschiedener Bakterien einen Einfluss auf die Aktivierung und Polarisierung der DCs hat. Wie in Abb. 3.43 dargestellt, führte die Behandlung der DCs mit *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 zusammen nicht nur zu einer additiven Zunahme der IL-12p70 Produktion, sondern zu einer deutlich synergistischen Zunahme, welche sich durch eine um ein Vielfaches gesteigerte IL-12p70 Konzentration auszeichnete. Gleiches galt auch für andere untersuchte Zytokine (zum Beispiel TNF- α , Daten nicht gezeigt). Eine Kombination von *L. lactis* G121 mit *E. coli* F1111 9-41 führte ebenfalls zu einer synergistischen Aktivierung der DCs, während die Aktivierung durch *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* gemeinsam lediglich additive Effekte aufwies (Daten nicht gezeigt). In vorläufigen Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass die Kombination von *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121, genau wie bei einer Behandlung der Zellen mit *L. lactis* G121 alleine (s. Kapitel 3.6.3, Seite 83), zu einer lang anhaltenden T_H1-Polarisierung der DCs (IL-12-Freisetzung) führt.

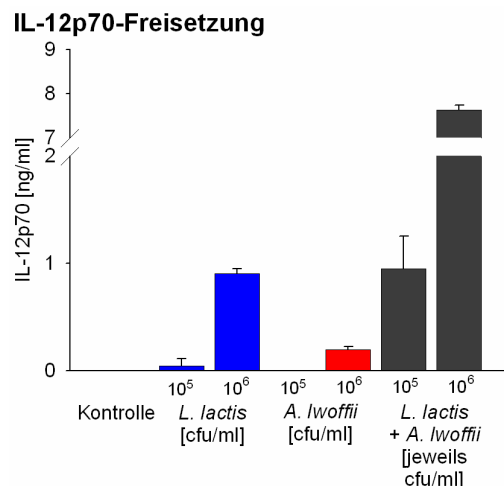


Abb. 3.43: Synergistische Effekte von *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78.

Humane dendritische Zellen wurden zunächst für 16 h mit den angegebenen Stimulantien behandelt. Nach der Inkubation wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung von IL-12 mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind repräsentative Daten von einem gesunden Spender ($n \geq 2$).

4 DISKUSSION

Eine Reihe epidemiologischer Studien zeigt, dass ein regelmäßiger Aufenthalt in einer Bauernhofumgebung in früher Kindheit das Risiko, im späteren Leben an atopischen Krankheiten und Asthma zu erkranken, reduziert (siehe auch Kapitel 1.3, Seite 13)^{58;63}. Über die zu Grunde liegenden Mechanismen ist jedoch wenig bekannt. In diesem Zusammenhang wird die erhöhte mikrobielle Belastung in der Bauernhofumgebung als wesentlicher Faktor diskutiert und vermutet, dass die Mikroorganismen oder deren Bestandteile das noch nicht vollständig gereifte Immunsystem beeinflussen und prägen^{36;37}. Dabei wird dem angeborenen Immunsystem eine zentrale Bedeutung beigemessen, was durch verschiedene Publikationen gestützt wird, in denen eine allergieprotektive Wirkung für mikrobielle Bestandteile wie LPS nachgewiesen wurde^{65;68;69}. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die allergieprotektive Wirkung zweier aus dem Kuhstall isolierter Bakterienstämme, *L. lactis* G121 und *A. Iwoffii* F78, hinsichtlich der zu Grunde liegenden Mechanismen untersucht.

4.1 ALLERGIEPRÄVENTIVE EIGENSCHAFTEN DER KUHSTALLBAKTERIEN

In Kooperation mit PD Dr. Holger Garn und Dr. Nicole Blümer an der Philipps Universität in Marburg wurde untersucht, ob durch eine Applikation der Kuhstallbakterien in einem *in vivo*-Mausmodell des allergischen Asthmas die Immunantwort moduliert werden kann. Um dabei den natürlichen Kontakt zur Bauernhofumgebung zu imitieren, wurden die Mäuse regelmäßig intranasal mit den Bakterien behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 die allergische Immunantwort der Atemwege signifikant reduzierte und eine deutliche Verbesserung der Atemwegsreaktivität bewirkte. Hingegen konnte kein Einfluss auf die systemische allergische Reaktion (OVA-spezifische IgE-Konzentrationen im Serum) nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die immunmodulatorischen Effekte der Kuhstallbakterien zum einen auf die T-Zellantwort

beschränkt sind und zum anderen lokale Mechanismen der Allergiereaktion direkt durch die Bakterien beeinflusst werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit Befunden anderer Gruppen, die ebenfalls allergieprotektive Effekte durch Bakterien oder mikrobielle Bestandteile wie LPS nachweisen konnten^{68;157-160}. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass der Zeitpunkt der LPS- oder auch Bakterien-Behandlung eine große Rolle spielte. So wurde die allergische Antwort unterdrückt, wenn die Behandlung vor der Sensibilisierung der Tiere erfolgte, jedoch verstärkt, wenn die Behandlung erst während der Provokation mit dem Allergen stattfand^{68;69;160;161}. Das Aufwachsen auf einem Bauernhof ist mit einem frühen und langfristigen Kontakt zu Mikroorganismen sowie mikrobiellen Komponenten verbunden und bietet daher günstige Rahmenbedingungen für eine effektive Allergieprotektion.

Interessanterweise waren trotz der wiederholten intranasalen Behandlungen der Mäuse mit relativ hohen Dosen an Bakterien kaum Anzeichen für eine T_H1 -gesteuerte inflammatorische Antwort, gemessen am geringen Einstrom von Neutrophilen und Lymphozyten, nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass das gewählte Behandlungsprotokoll entweder Toleranz gegen die nicht-pathogenen Kuhstallbakterien in den Mäusen induziert oder generell eine sehr geringe Immunantwort gegen diese Bakterien ausgebildet wird. Diese Befunde sprechen dafür, dass diese Kuhstallbakterien auch im humanen System für neue immuntherapeutische Behandlungsstrategien eingesetzt werden können, welche auf diesen Resultaten basierend entwickelt werden sollen.

4.2 IMMUNMODULATORISCHE FÄHIGKEITEN DER KUHSTALLBAKTERIEN

Um die im *in vivo*-Mausmodell gezeigten allergieprotektiven Fähigkeiten von *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 im Hinblick auf die zu Grunde liegenden Mechanismen näher zu untersuchen, wurden humane dendritische Zellen als Modellsystem gewählt, da diese sowohl an der bereits erwähnten Prägung des Immunsystems als auch an der Entwicklung von Allergien maßgeblich beteiligt sind^{74;78;113}.

Nach Stimulation der DCs mit den Kuhstallbakterien kam es zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine und zur Reifung der Zellen, was die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 beinhaltet (s. auch Abb. 1.3, Seite 18, Signal 2)¹⁶²⁻¹⁶⁴. Diese Moleküle sind im Kontext der Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle (Signal 1) notwendig für die Aktivierung der T_{Helfer} -Zellen. Abhängig vom Stimulus werden die nachfolgenden Antworten der T_{Helfer} -Zellen mit Hilfe freigesetzter Mediatoren oder Oberflächenmolekülen in Richtung T_H1 , T_H2 , T_{Reg} bzw. T_H17 polarisiert (Signal 3)¹⁶⁵. Die Behandlung der DCs mit den Kuhstallbakterien führte zur Freisetzung des zentralen T_H1 -polarisierenden Zytokins IL-12¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, was eine T_H1 -Polarisierung der Immunantworten durch die Kuhstallbakterien vermuten lässt. Dies wurde durch die Hochregulation weiterer T_H1 -polarisierender Faktoren wie ICAM-1 und CCL-5 bestätigt. Die im Rahmen der Diplomarbeit

von Nina Dickgreber gezeigten Resultate hinsichtlich der Expression verschiedener Notch-Liganden sprechen ebenfalls für eine T_H1 -Polarisierung der Immunantwort durch *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121^{109;152;169;170}. Im Gegensatz zu *A. Iwoffii* F78 war *L. lactis* G121 nicht in der Lage die Expression von IL-23p19 zu induzieren. Dieses Zytokin wird nach neuesten Erkenntnissen jedoch eher im Zusammenhang mit der Polarisation von T_H17 -Zellen diskutiert³⁰ und ist für die T_H1 -Polarisierung nicht von entscheidender Bedeutung. Auch die Expression von IFN- β wurde durch *L. lactis* G121 in geringerem Maße induziert, jedoch zeigten die Microarray-Daten eine deutliche Regulation der IFN- γ -Produktion. Dies könnte im Falle von *L. lactis* G121 die deutliche T_H1 -Polarisierung erklären, da ein autokriner Mechanismus für IFN- γ mit einer daraus resultierenden, optimalen IL-12-Produktion gezeigt werden konnte¹⁷¹. Die T_H1 -polarisierenden Eigenschaften der mit den Kuhstallbakterien behandelten DCs wurden in einer Kokultur dieser DCs mit naiven T-Zellen bestätigt. Sowohl *A. Iwoffii* F78 als auch *L. lactis* G121 induzierten in den T-Zellen die Produktion von IFN- γ , dem zentralen T_H1 -Zytokin. Das durch die Kuhstallbakterien freigesetzte IL-12 ist dabei von entscheidender Bedeutung, da das Binden von IL-12 an den IL-12R auf T-Zellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-4 und damit zur IFN- γ -Produktion führt¹⁰⁰. Auch die Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD40 trägt zur Polarisation bei, da die Produktion von IL-12 durch das Binden von CD40 an den CD40L auf der T-Zelle positiv beeinflusst wird¹⁷². Insgesamt sprechen diese Daten für eine deutliche T_H1 -Polarisierung der Immunantwort durch die Kuhstallbakterien. Für *L. lactis* G121 konnte zudem eine Reduktion des T_H2 -Zytokins IL-4 gezeigt werden. Die Behandlung der DCs mit *A. Iwoffii* F78 führte hingegen in verschiedenen Spendern zu sehr unterschiedlichen Resultaten im Hinblick auf die IL-4-Produktion, wobei bei allen Spendern eine starke Zunahme der IFN- γ -Produktion zu verzeichnen war. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich mit einer Induktion von T_H0 -Zellen durch *A. Iwoffii* F78 erklären, was bei einem Spender mit Hilfe der intrazellulären Färbung der Zytokine IL-4 und IFN- γ auch gezeigt werden konnte. T_H0 -Zellen werden als noch nicht vollständig polarisierte T-Zellen diskutiert, die sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zytokine produzieren²¹. Diese Zellen können nachweislich über einen längeren Zeitraum in diesem Zustand existieren und durch weitere Polarisierungssignale dann in Richtung T_H1 oder T_H2 weiter differenzieren^{21;22}, was vermuten lässt, dass für eine vollständige T_H1 -Polarisierung ein weiterer Kontakt mit *A. Iwoffii* F78 nötig ist. Allerdings zeigte sich in weiteren Analysen, dass nicht nur *L. lactis* G121 sondern auch *A. Iwoffii* F78 die Expression T_H1 -assoziierte Oberflächenmoleküle (TIM-3) und Transkriptionsfaktoren (TBet) induzierte und die Expression T_H2 -assoziiierter Faktoren (GATA3) herunter reguliert wurde. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine T_H1 -Polarisierung der Immunantwort durch beide Kuhstallbakterien.

Derzeit werden zwei Theorien zur Erklärung der Hygiene-Hypothese diskutiert. Die schon lange verbreitete Hypothese der „fehlenden Immunpolarisierung“ (*lack of immune deviation*) basiert auf der Annahme, dass z.B. die Bauernhofumgebung T_H1 -Antworten unterstützt und damit die Allergie-assoziierte T_H2 -Antwort unterdrückt¹⁷³. In den letzten Jahren wurde im Gegensatz dazu die Hypothese der „fehlenden Immunsuppression“ (*reduced immune suppression*) entwickelt, die den regulatorischen T-Zellen eine große Bedeutung in der Allergieentstehung beimisst³³. Für beide Hypothesen gibt es eine Reihe von Argumenten, die für oder auch gegen die jeweilige Hypothese sprechen (siehe Tab. 4.1)¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

Tab. 4.1: Epidemiologische und experimentelle Befunde für und gegen eine fehlende Immunpolarisierung oder fehlende Immunsuppression.

Befunde	
Fehlende Immunpolarisierung	
Argumente dafür:	Argumente dagegen:
<ul style="list-style-type: none"> - Atopische Patienten haben geringeren TBet- und höheren GATA3-Spiegel^{177,178} - Eine Vakzinierung mit <i>Mycobacterium bovis Bacillus-Calmette-Guerin</i>, die eine starke T_H1-Antwort hervorruft, ist mit einer geringeren Anfälligkeit für atopische Erkrankungen verbunden¹⁷⁹ - Aktivierung von PRRs <i>in vivo</i> führt zu einem Shift von T_H2- zu T_H1-Antworten und zu einem Rückgang der atopischen Erkrankungen^{180,181} - Kinder aus dem Osten Deutschlands bilden eher eine T_H1/T_H0-Antwort aus, wohingegen Kinder aus dem stärker urbanisierten Westdeutschland eher eine T_H2-Antwort ausbilden (unabhängig von einer Atopie)¹⁸² - Patienten mit Multiple Sklerose, die einen erhöhten IL-12-Spiegel aufweisen, haben weniger atopische Erkrankungen⁹⁵ - Für mikrobielle Strukturen wie CpG und LPS, die eine T_H1-Antwort induzieren, konnten allergieprotektive Wirkungen nachgewiesen werden^{5,7,66} 	<ul style="list-style-type: none"> - In Ländern mit hoher Inzidenz für chronische Helmintheninfektionen, die eine starke T_H2-Antwort hervorrufen, findet sich eine geringe Inzidenz für atopische Erkrankungen¹⁷⁵ - In den letzten Jahren konnte nicht nur ein Anstieg an atopischen Erkrankungen sondern auch an T_H1-polarisierten Autoimmunkrankheiten beobachtet werden⁶
Fehlende Immunsuppression	
Argumente dafür:	Argumente dagegen:
<ul style="list-style-type: none"> - Die chronischen Helmintheninfektionen, rufen neben der starken T_H2-Antwort auch eine T_{Reg}^--Antwort hervor¹⁷⁵ - Immuntherapie atopischer Patienten mit IL-10, einem T_{Reg}-Zytokin, unterdrückt T_H2-Antworten⁶ - Transferierte TR1-Zellen inhibieren T_H2-, aber nicht T_H1-Antworten durch IL-10¹⁸³ - $CD4^+CD25^+$-T-Zellen schützen im Mausmodell vor der Entwicklung von Asthma¹⁸⁴ - Verschiebung der Balance zwischen TR1- und T_H2-Zellen in atopischen Patienten²⁷ 	<ul style="list-style-type: none"> - Patienten mit T_H1-polarisierten Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose haben auch weniger atopische Erkrankungen⁹⁵ - Depletierung der T_{Regs} führt zu verstärkten T_H1-Antworten und abgeschwächten T_H2-Antworten¹⁸⁵ - IL-10 kann T_H2-Antworten auch verstärken und T_H1-Antworten unterdrücken¹⁸⁶

Aufgrund dieser Datenlage wird zunehmend eine Mischung aus beiden Hypothesen diskutiert^{34,174}. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch die mögliche Induktion von

regulatorischen T-Zellen durch *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 untersucht. Allerdings konnte weder ein Anstieg an T_{Reg}-induzierenden Oberflächenmolekülen auf DCs noch ein gravierender Anstieg in der IL-10-Produktion verzeichnet werden. Auch spricht die hohe IL-12-Konzentration gegen die Induktion einer T_{Reg}-Antwort, da IL-10 die Produktion von IL-12 unterdrückt⁹⁸. Entgegen den gezeigten Ergebnissen für die Kuhstallbakterien konnten Peters *et al.* allergieprotektive Effekte für Stallstaub zeigen, die vornehmlich auf einer Suppression der Immunantworten zu beruhen scheinen⁶⁷.

Zusammengenommen konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche T_H1-Polarisierung der Immunantworten durch die allergieprotektiven Kuhstallbakterien gezeigt werden, was eher die Hypothese der „fehlenden Immunpolarisierung“ als Basis der Hygiene-Hypothese unterstützt. Dies und die oben erwähnten Ergebnisse von Peters *et al.*⁶⁷ lassen vermuten, dass eine Vielzahl an verschiedenen Faktoren in der Bauernhofumgebung sowohl die Immunpolarisierung fördern, wie auch in gewissem Maße die Immunsuppression unterstützen, was schließlich im Zusammenspiel im allergieprotektiven Effekt der Bauernhofumgebung resultiert.

4.3 DAS LPS IST DIE ZENTRALE T_H1-POLARISIERENDE STRUKTUR VON *A. LWOFFII* F78

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die für die allergieprotektiven Eigenschaften verantwortlichen Strukturen der Bakterien zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Da das angeborene Immunsystem einen wesentlichen Anteil an der Immunaktivierung hat und die nachfolgenden Antworten des erworbenen Immunsystems gerade im Hinblick auf die T_H1-Polarisierung beeinflussen kann^{118;187;188}, wurde die Aktivierung verschiedener PRRs durch *A. Iwoffii* F78 untersucht. Wie erwartet aktivierte das Gram-negative Bakterium die Zellen über TLR4. Darüber hinaus fand eine Aktivierung über TLR2, NOD1 und NOD2 statt. Bei vergleichenden Experimenten mit lebenden und hitzebehandelten *A. Iwoffii* F78-Präparationen fiel eine deutlich geringere Aktivität der hitzebehandelten Präparationen auf. Interessanterweise schien die Hitzebehandlung vornehmlich den TLR4-Liganden von *A. Iwoffii* F78 zu beeinflussen, die aufgrund ihrer Struktur eher als hitzestabil angesehen werden. Möglicherweise kommt es aber in einer Gesamt-Bakterien-Präparation zur Degradierung des TLR4-Liganden aufgrund der räumlichen Nähe zu Hitze-instabilen Proteinen. Zusätzlich zur verminderten Aktivierung der Zellen über TLR4 kam es zu einer deutlich geringeren IL-12-Induktion durch die hitzebehandelten *A. Iwoffii* F78-Präparationen. Dabei blieb die Aktivierung der Zellen, gemessen an der IL-8-Freisetzung, unbeeinträchtigt. Dies lässt auf eine zentrale Bedeutung der TLR4-Liganden von *A. Iwoffii* F78 im Hinblick auf die T_H1-Polarisierung schließen. Zur näheren Betrachtung wurden weiterführende Experimente durchgeführt. Diese hatten zum einen das Ziel, die weiteren PRR-Liganden von

A. Iwoffii F78 für die T_H1-Polarisierung auszuschließen und zum anderen sollte die Bedeutung des TLR4-Liganden bestätigt werden. Ein blockierender TLR2-Antikörper hatte keinen oder nur einen sehr geringfügigen Einfluss auf die Aktivierung (IL-8-Freisetzung) und T_H1-Polarisierung (IL-12-Freisetzung) von DCs durch *A. Iwoffii* F78, wohingegen die Aktivierung der Zellen durch einen reinen TLR2-Liganden (Pam₃CSK₄) deutlich gehemmt wurde. Auch eine Hemmung der Phagozytose, was eine Aufnahme von *A. Iwoffii* F78 und damit einen Kontakt mit den intrazellulären Rezeptoren NOD1 und NOD2 verhindert, wies keinen hemmenden Effekt auf die IL-12-Freisetzung auf. Die bei dem Einsatz niedriger Konzentrationen der Phagozytose-hemmenden Substanz auftretende leichte Hemmung der IL-12-Freisetzung scheint unspezifisch zu sein, da sich zum einen die Hemmung durch steigende Konzentrationen der Substanz nicht weiter erhöhen ließ und zum anderen war auch die LPS-induzierte IL-12-Freisetzung bei diesen Konzentrationen leicht beeinträchtigt. Von LPS ist jedoch bekannt, dass es phagozytoseunabhängig über einen extrazellulären Rezeptor die DCs aktiviert und polarisiert. Im Gegensatz dazu ließ sich die T_H1-Polarisierung der DCs durch *A. Iwoffii* F78 mit Hilfe des TLR4-Antagonisten C406 vollständig unterdrücken. Sowohl die IL-12-Freisetzung der DCs als auch die IFN- γ -Produktion von naiven T-Zellen in der Kokultur mit *A. Iwoffii* F78-behandelten DCs wurde durch C406 vollständig gehemmt. Da es sich bei C406 um eine nicht aktive, synthetische Lipid A-Struktur handelt, die durch das Besetzen der Rezeptoren antagonistisch wirkt, könnte durch diese Struktur auch eine Aktivierung über TLR2 gehemmt werden, da C406 auch den Korezeptor CD14 blockiert¹⁸⁹. Dieser unterstützt sowohl die Aktivierung von Zellen über TLR4 als auch über TLR2^{127;190}. Da jedoch die TLR2-Liganden von *A. Iwoffii* F78 als Auslöser der T_H1-Polarisierung mit Hilfe der oben erwähnten Experimente ausgeschlossen wurden, kann dieser Nebeneffekt an dieser Stelle vernachlässigt werden. Zudem lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass der TLR4-Ligand von *A. Iwoffii* F78 eine zentrale Funktion bei der T_H1-Polarisierung hat. Davon ableitend wurde mit aufgereinigtem *A. Iwoffii* F78-LPS (zur Verfügung gestellt von Ania Hanuszkiewicz) untersucht, ob dieser TLR4-Ligand alleine ebenfalls T_H1-polarisierende Eigenschaften hat. Neben einer Aktivierung und Reifung der DCs ließ sich für das *A. Iwoffii* F78-LPS auch eine starke T_H1-polarisierende Wirkung nachweisen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das LPS von *A. Iwoffii* F78 den Einsatz des gesamten Bakteriums im Hinblick auf eine Allergieprotektion ersetzen könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen müssen nun *in vivo*-Mausversuche mit dem *A. Iwoffii* F78-LPS folgen.

Dass TLR4 in der Entwicklung von atopischen Erkrankungen eine Rolle spielt zeigen epidemiologische Studien, die einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TLR4-Gen und einer geringeren Inzidenz für atopische Erkrankungen zeigen konnten⁷². Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind noch nicht genau bekannt, aber erste Untersuchungen weisen zumindest im adulten System auf eine LPS-Hyporeaktivität, also verringerte Reaktion

auf LPS, hin¹⁹¹. Die oben erwähnte T_H2-verstärkende Wirkung von LPS auf bereits etablierte Allergenantworten könnte diesen zunächst paradox scheinenden Zusammenhang erklären¹⁶¹. Diverse Studien zeigten aber auch T_H1-polarisierende und allergieprotektive Effekte für LPS^{65;68;192}, wobei sowohl die Konzentration als auch der Zeitpunkt des LPS-Kontaktes für eine T_H1- oder T_H2-polarisierende Wirkung von entscheidender Bedeutung ist^{187;193}. Ebenso ist die biologische Aktivität des LPS ein wesentliches Kriterium für die Polarisierung¹⁹⁴, weswegen die bereits erwähnten *in vivo*-Mausversuche mit dem *A. Iwoffii* F78-LPS unerlässlich sind. Zudem besteht ein bedeutender Unterschied zwischen den gezeigten allergieprotektiven Effekten von *A. Iwoffii* F78 und vielen Studien mit LPS. Während für die *A. Iwoffii* F78-Behandlung der Mäuse neben den reduzierten allergischen Parametern auch eine deutliche Verbesserung der Atemwegsreaktivität zu verzeichnen war, zeigten Studien mit LPS lediglich verbesserte Allergieparameter aber keinen positiven Einfluss auf die Atemwegsreaktivität^{64;65}. Von Ania Hanuszkiewicz durchgeführte Strukturanalysen (unveröffentlichte Daten) zeigten zudem, dass das *A. Iwoffii* F78-LPS eine besondere Struktur und damit möglicherweise auch eine besondere biologische Aktivität aufweist. Sollten die *in vivo*-Mausversuche mit dem *A. Iwoffii* F78-LPS die *in vitro*-Daten bestätigen, wären für dieses LPS auch entsprechende prophylaktische Ansätze im humanen System denkbar.

4.4 INTRAZELLULÄRE REZEPTOREN SPIELTEN BEI DER T_H1-POLARISIERENDEN WIRKUNG VON *L. LACTIS* G121 EINE ENTSCHEIDENDE ROLLE

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, sollten die PRRs identifiziert werden, die für eine Aktivierung der Zellen durch die Kuhstallbakterien eine Rolle spielen. Im HEK293-Überexpressionssystem konnte eine Aktivierung der Zellen über TLR2 und NOD2 durch *L. lactis* G121 nachgewiesen werden. Da die *L. lactis* G121-Präparationen ebenso wie die *A. Iwoffii* F78-Präparationen durch eine Hitzebehandlung generell an Aktivität verlieren, wurde auch hier die Hitzebeständigkeit der TLR2- und NOD2-Liganden überprüft. Es zeigte sich, dass beide Liganden bereits durch eine 5-minütige Hitzebehandlung zerstört wurden, was für einen hohen Protein- bzw. Peptidanteil spricht. Die Hitzebehandlung hatte zudem auch Auswirkungen auf die Aktivierung und Polarisierung von DCs durch die *L. lactis* G121-Präparationen. So fand eine Aktivierung der Zellen (IL-8-Freisetzung) erst mit einer 10-fach höheren Konzentration an *L. lactis* G121 statt und die T_H1-Polarisierung der DCs (IL-12-Produktion) wurde gänzlich unterdrückt. Diese Befunde lassen auf eine Involvement der TLR2- und NOD2-Liganden von *L. lactis* G121 im Hinblick auf die Aktivierung und Polarisierung von DCs schließen. Dass sowohl TLR2 als auch NOD2 im Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen und Asthma zu stehen scheinen, zeigen auch epidemiologische Studien, die Polymorphismen im TLR2- und NOD2-Gen mit der Entwicklung von atopischen

Erkrankungen in Zusammenhang bringen¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Dabei sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht genau bekannt. Im Falle von NOD2 weiß man jedoch, dass es je nach Art des Polymorphismus zu einer verringerten oder erhöhten Anfälligkeit für atopische Erkrankungen kommen kann¹⁹⁶. Zudem stehen Polymorphismen im NOD2-Gen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, mit der T_H1-assoziierten Erkrankung Morbus Crohn in Verbindung¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Diese Befunde legen nahe, dass Polymorphismen im NOD2-Gen zu einer generellen Fehlregulation oder auch -modulation des Immunsystems führen, die je nach Art des Polymorphismus zu T_H1- oder T_H2-assoziierten Krankheiten führen kann¹⁹⁷. Neben diesen genetischen Studien ist im Hinblick auf die Immunmodulation durch NOD2-Liganden sehr wenig bekannt. Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen der Belastung mit Muramylsäure, einem Bestandteil des Peptidoglykans, und damit potentiellen NOD2-Liganden und einer geringeren Inzidenz für Asthma gezeigt werden²⁰¹. Für TLR2-Liganden gibt es im Hinblick auf die Immunmodulation eine Reihe widersprüchlicher Studien. So konnten sowohl T_H1-polarisierende und allergieprotektive²⁰²⁻²⁰⁴ als auch T_H2-polarisierende und damit allergieunterstützende Eigenschaften für TLR2-Liganden nachgewiesen werden²⁰⁵⁻²⁰⁸. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese widersprüchlichen Daten, ähnlich wie beim LPS, durch den Zeitpunkt und die Dosis der Behandlung zu erklären sind. Um zu überprüfen, ob reine TLR2- bzw. NOD2-Liganden in unserem System eine T_H1-polarisierende Wirkung aufweisen, wurde die Wirkung von Pam₃CSK₄ (TLR2-Ligand) und MDP (NOD2-Ligand) auf humane DCs untersucht. Beide Liganden waren in der Lage die DCs zu aktivieren, wiesen jedoch keine T_H1-polarisierenden Eigenschaften auf. Da synergistische Effekte für TLR2- und NOD2-Liganden im Hinblick auf die T_H1-Polarisierung beschrieben wurden^{209;210}, wurde zudem die T_H1-polarisierende Wirkung der Kombination beider Liganden untersucht. Jedoch konnte auch hierfür keine T_H1-Polarisierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine alleinige Rolle der TLR2- oder auch NOD2-Liganden in der allergieprotektiven Wirkung von *L. lactis* G121 und implizieren die Beteiligung weiterer PRR-Liganden. Da die oben diskutierte Hitzebehandlung der *L. lactis* G121-Präparationen jedoch zumindest eine Beteiligung der NOD2- und TLR2-Liganden vermuten lässt, wurde die Bedeutung dieser PRR-Liganden weiter untersucht. Ein blockierender TLR2-Antikörper hatte wie schon bei *A. lwoffii* F78 keinen oder nur einen sehr geringfügigen Einfluss auf die Aktivierung (IL-8-Freisetzung) und T_H1-Polarisierung (IL-12-Freisetzung) von DCs durch *L. lactis* G121, womit eine Beteiligung der TLR2-Liganden von *L. lactis* G121 an der T_H1-Polarisierung sehr unwahrscheinlich ist. Für intrazelluläre Rezeptoren wie NOD2 ist bekannt, dass die Aktivierung der Zellen verzögert eintritt, da der entsprechende Ligand zunächst von der Zelle aufgenommen werden muss¹⁵⁴. Die beobachtete verzögerte Aktivierungskinetik durch *L. lactis* G121 ließ daher eine Bedeutung von NOD2 oder auch anderer intrazellulärer Rezeptoren an der T_H1-Polarisierung vermuten.

Da derzeit keine blockierenden Antikörper für NOD2 erhältlich sind, wurde die Beteiligung intrazellulärer Rezeptoren im Allgemeinen durch eine Blockade der Phagozytose näher untersucht. Die resultierende vollständige Hemmung der *L. lactis* G121-induzierten Aktivierung und auch T_H1-Polarisierung der DCs bestätigte die Teilnahme intrazellulärer Rezeptoren bei der Aktivierung der Zellen durch *L. lactis* G121. Da ähnliche Ergebnisse von Kapetanovic *et al.* auch für einen *Staphylococcus aureus*-Stamm gezeigt werden konnten, der TLR2- und TLR4-unabhängig die Zellen über NOD2 aktivierte²¹¹, scheinen diese Ergebnisse die Bedeutung der NOD2-Liganden von *L. lactis* G121 an der T_H1-Polarisierung zu bestätigen. Vorläufige Ergebnisse mit DCs von Patienten mit einem Polymorphismus im NOD2-Gen, der zu einer inaktiven Variante des NOD2 führt, deuten zudem auf eine zentrale Rolle von NOD2 bei der Aktivierung der DCs durch *L. lactis* G121, allerdings müssen hier weitere Untersuchungen folgen.

Die Tatsache, dass außer uns auch weitere Gruppen allergieprotektive Effekte für Milchfermentierende Bakterien (*lactic acid bacteria*, LAB)^{52;157;212} und unter anderem auch für weitere *L. lactis*-Stämme zeigen konnten^{158;213}, macht *L. lactis* G121 zu einem interessanten Kandidaten für eine mögliche allergieprotektive Anwendung. Zudem konnten Pochard *et al.* sogar eine allergietherapeutische Wirkung für LABs zeigen²¹⁴. Bei diesen Studien zeigte sich eine zentrale Bedeutung der IL-12-Induktion durch die LABs^{145;215}, über weitere zu Grunde liegende Mechanismen der Allergieprotektion ist bisher jedoch wenig bekannt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die für die allergieprotektive Wirkung verantwortlichen Strukturen, bieten daher erste Einblicke in diese Mechanismen und einen guten Ansatzpunkt für weitere Studien.

4.5 ALLERGIEPROTEKTIVE BAKTERIEN INDUZIEREN T_H1-POLARISIERENDE GENPROGRAMME

Um einen Überblick über die der Allergieprotektion zu Grunde liegenden Mechanismen zu gewinnen, wurden Microarray-Analysen mit Kuhstallbakterien-behandelten DCs durchgeführt. Zudem wurden zwei Referenzbakterien ausgewählt, um so mögliche Unterschiede zwischen diesen und den Kuhstallbakterien zu identifizieren und damit einen tieferen Einblick in die allergieprotektiven Mechanismen zu erhalten. Es zeigte sich jedoch in dem *in vivo*-Mausmodell, dass neben den Kuhstallbakterien auch das Referenzbakterium *E. coli* F1111 9-41 allergieprotektive Eigenschaften besitzt (Daten nicht gezeigt). Dies stellt die Idee der „good old friends“ von Rook and Brunet in Frage (siehe auch Kapitel 1.6, Seite 22) und befürwortet eher die Theorie, dass ein häufiger Kontakt mit mikrobiellen Bestandteilen in früher Kindheit und damit die regelmäßige Aktivierung des angeborenen Immunsystems über die PRRs allergieprotektive Effekte hat^{37;48;61;123;144;216;217}. Ob auch *Bacillus subtilis* DSM 618 eine allergieprotektive Wirkung hat ist bisher nicht geklärt. Es sind

aber derzeit entsprechende Mausversuche in Planung. Aus *in vitro*-Versuchen ist allerdings bekannt, dass *B. subtilis* DSM 618 sich in seiner Wirkung deutlich von den anderen drei Bakterien unterscheidet (fehlende T_H1-Polarisierung). Die Microarray-Daten bestätigten diese Befunde. So konnte gezeigt werden, dass sich die gestarteten Genprogramme in den mit den nachweislich allergieprotektiven Bakterien behandelten DCs sehr ähneln, auch wenn sich für *L. lactis* G121 eine verzögerte Aktivierung der Zellen bestätigte. Die nach 12 h detektierten Expressionsmuster wiesen jedoch zwischen *A. lwoffii* F78, *E. coli* F1111 9-41 und *L. lactis* G121 eine nahe Verwandtschaft auf. Dies wurde auch durch die Analyse einer Auswahl von T_H1-polarisierenden Zytokinen und Oberflächenmolekülen bestätigt, die alle in ähnlicher Weise durch die drei Bakterien induziert wurden. Ausnahme bildete hier wiederum nur das IL-23p19, welches nach *L. lactis* G121-Behandlung nicht reguliert wurde, aber wie bereits erwähnt auch eher ein T_H17-polarisierendes Molekül darstellt. Dagegen war *B. subtilis* DSM 618 nicht in der Lage T_H1-polarisierende Moleküle zu induzieren, und auch die Verwandtschaftsanalyse ergab deutliche Unterschiede zwischen den von *B. subtilis* DSM 618 bzw. den anderen drei Bakterien induzierten Genen. Ein von den drei allergieprotektiven Bakterien induziertes Genprogramm war beispielsweise der IFN-Signalweg. Interessanterweise werden die Typ-I- bzw. Typ-II-Interferone IFN- β und IFN- γ ebenfalls als entscheidende Zytokine für eine optimale T_H1-Polarisierung diskutiert²¹⁸. Die Aktivierung dieses Signalweges durch *L. lactis* G121 konnte allerdings bisher im HEK293-System nicht bestätigt werden. Es ist denkbar, dass eine alleinige Aktivierung über NOD2 nicht ausreicht, um die IRFs zu aktivieren und Interferone zu induzieren. Dies würde die Beteiligung eines weiteren PRR-Liganden bei der T_H1-Polarisierung durch *L. lactis* G121 belegen, was bereits durch die fehlende T_H1-Polarisierung des reinen NOD2-Liganden MDP impliziert wird. Weiterhin spricht dafür, dass bisher kein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NOD2 und einer daraus resultierenden Aktivierung von IRFs gezeigt werden konnte. Es wäre allerdings auch möglich, dass nicht alle für eine NOD2-induzierte Aktivierung der IRFs benötigten Adaptermoleküle in den HEK293-Zellen funktionell exprimiert werden. Für die parallel in den HEK293-Zellen getestete Aktivierung der IRFs über TLR3 scheinen hingegen alle notwendigen Adaptermoleküle exprimiert zu sein, da hier eine Aktivierung nachweisbar war. Insgesamt bestätigten die Microarray-Analysen die T_H1-polarisierenden Effekte der Kuhstallbakterien und zeigten deutliche Korrelationen zum ebenfalls allergieprotektiven und T_H1-polarisierenden Bakterium *E. coli* F1111 9-41. Zudem lieferten auch diese Daten keine Hinweise für eine Immunsuppression und stützen daher unsere Hypothese der Immunpolarisierung durch die Kuhstallbakterien.

4.6 MÖGLICHE MECHANISMEN DER ALLERGIEPRÄVENTION DURCH DIE KUHSTALLBAKTERIEN

Neben der Aktivierung der IRFs ist die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ein wesentlicher Bestandteil der Induktion vieler T_H1-polarisierender Mediatoren²¹⁹. Da in der Diplomarbeit von Nina Dickgreber nur eine schwache Aktivierung dieses Signalweges nach Stimulation mit *L. lactis* G121 detektiert werden konnte¹⁵², wurde die Aktivierung und damit einhergehende Translokation wichtiger Untereinheiten des NF- κ B in den Zellkern näher untersucht. Interessanterweise konnte nach einer Stimulation mit *L. lactis* G121 keine Translokation der p65-Untereinheit in den Zellkern nachgewiesen werden, wohingegen sowohl bei *E. coli* F1111 9-41 als auch *A. Iwoffii* F78 (Daten nicht gezeigt) eine deutliche Translokation zu verzeichnen war. In nachfolgenden Studien wäre es von großem Interesse die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) in die Untersuchungen einzubeziehen, da diese Kinase unerlässlich für eine Aktivierung der Zellen über NOD2 ist²²⁰. Für die NF- κ B-Untereinheit c-Rel wurde eine entscheidende Rolle bei der Induktion von IL-12 belegt^{143;221;222}, weswegen man aufgrund der IL-12-Induktion durch *L. lactis* G121 auch eine c-Rel-Translokation erwarten würde. Tatsächlich konnte im Gegensatz zur p65-Untereinheit für die c-Rel-Untereinheit auch eine Translokation nach der *L. lactis* G121-Behandlung gezeigt werden. Diese war im Vergleich zur Aktivierung mit *E. coli* F1111 9-41 zwar wiederum verzögert, aber deutlich nachweisbar. Da für eine lang anhaltende Aktivierung von NF- κ B-abhängigen Genen ein Austausch der NF- κ B-Untereinheiten (bspw. p50/p65 gegen p52/RelB) im Promotorbereich gezeigt werden konnte²²³, sollte dieser Austausch in folgenden Studien ebenfalls näher untersucht werden, da eine solche lang anhaltende Aktivierung der DCs (bis zu 20 h) für eine effektive Aktivierung und Polarisierung von naiven T-Zellen gewährleistet sein muss²²⁴⁻²²⁶. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits die Dauer der Aktivierung der DCs nach Stimulation mit den Bakterien näher untersucht. Während *A. Iwoffii* F78, *E. coli* F1111 9-41 und auch LPS die DCs nur bis zu 16 h zu einer aktiven IL-12-Freisetzung anregten, war nach einer Stimulation mit *L. lactis* G121 eine sehr lang anhaltende Aktivierung der Zellen nachweisbar. Dies könnte möglicherweise auch die *in vitro* beobachtete vollständige T_H1-Polarisierung durch *L. lactis* G121 und eher T_H0-Polarisierung durch *A. Iwoffii* F78 erklären. In dem *in vivo*-Modell hingegen würde die kürzer andauernde T_H1-Polarisierung durch *A. Iwoffii* F78 und *E. coli* F1111 9-41 durch die häufigen Behandlungen und damit immer neu induzierten T_H1-Polarisierung nicht ins Gewicht fallen.

Ein weiterer entscheidender Grund für die allergieprotektive Wirkung der Bauernhofumgebung könnte nicht nur die häufige Aktivierung von einzelnen PRRs sondern auch die gleichzeitige Aktivierung verschiedenster PRRs durch die diversen mikrobiellen Strukturen sein. Da diverse Synergien zwischen der Aktivierung einzelner PRRs und ins-

besondere zwischen NLRs und TLRs bekannt sind^{108;209}, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Aktivierung von DCs nach gleichzeitiger Stimulation mit *A. Iwoffii* F78 und *L. lactis* G121 untersucht und ein starker Synergismus festgestellt. Dabei war neben einer deutlich verstärkten T_H1-polarisierenden Wirkung auch die bereits für *L. lactis* G121 festgestellte lang anhaltende T_H1-Polarisierung nachweisbar. Ob die beiden Bakterien zusammen auch *in vivo* effektiver zu einer Allergieprotektion führen, soll in nachfolgenden Studien überprüft werden. Dies wäre im Hinblick auf neue Therapieansätze mit diesen Bakterien ein interessanter Aspekt, da auf diese Weise eine Reduktion der nötigen Bakterienanzahl für eine erfolgreiche Allergieprotektion zu erreichen wäre und damit potentielle unerwünschte Nebeneffekte minimiert werden könnten.

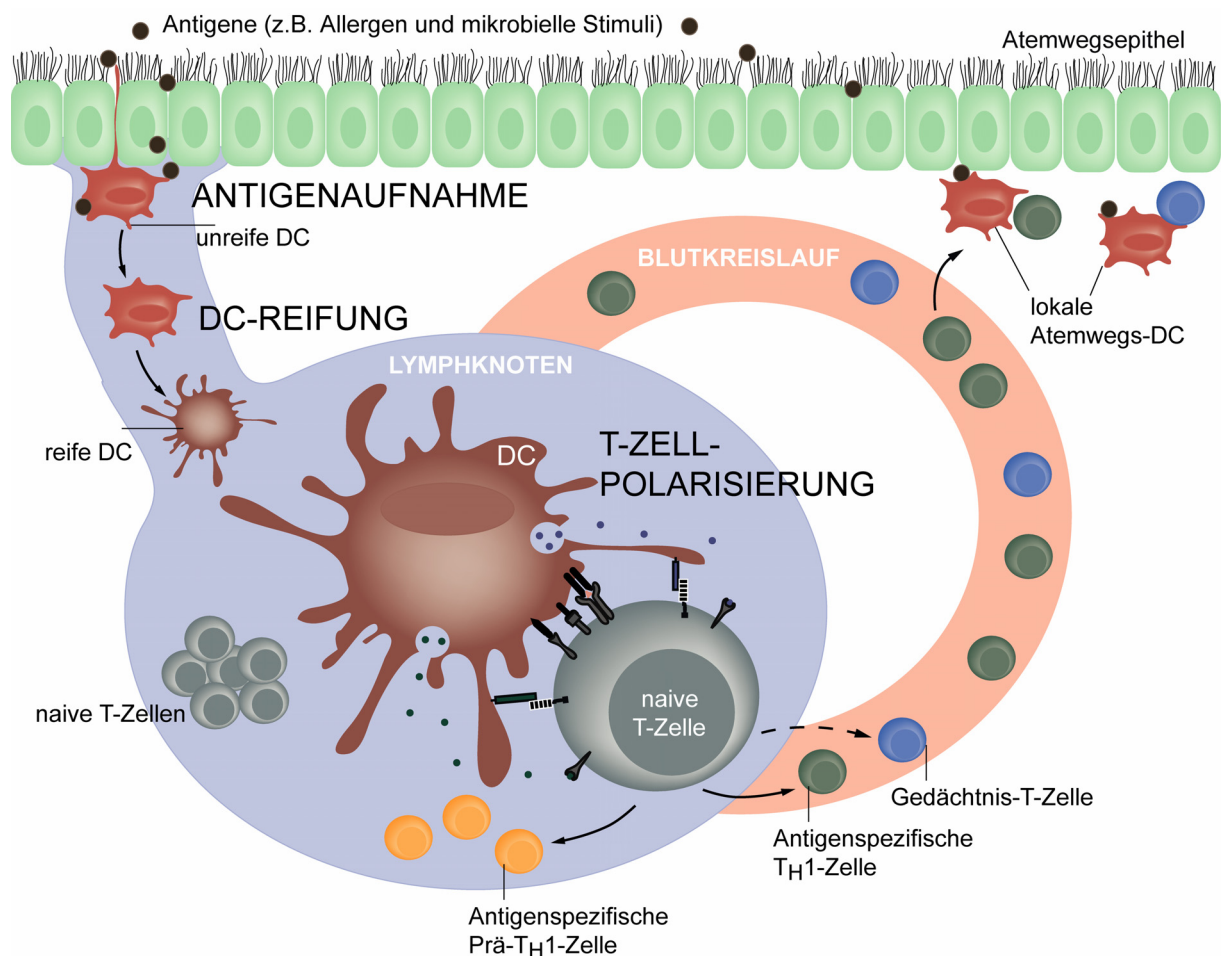


Abb. 4.1: Mögliche Mechanismen der Allergieprävention.

Erläuterungen siehe Text.

Bisher ist ungeklärt, wie sich eine beim ersten Allergenkontakt bspw. durch den positiven Einfluss anderer Stimuli hervorgerufene allergenspezifische T_H1-Antwort etabliert. Derzeit werden in diesem Zusammenhang drei Hypothesen diskutiert¹¹⁷: (1) Die Entscheidung über die Richtung der T_H1-Polarisierung wird bei jedem Allergenkontakt neu getroffen, und durch den Einfluss der DCs entsteht jedes Mal dieselbe Polarisation. (2) Bei den ersten

Allergenkontakten entstehen sogenannte Prä- T_H1 -Zellen, die in den Lymphknoten verbleiben und bei erneutem Allergenkontakt schnell in reife T_H1 -Zellen differenzieren und (3) neben den Effektorzellen entstehen auch Gedächtniszellen, die bei einem späteren Allergenkontakt durch eine schnelle $IFN-\gamma$ -Produktion wiederum Einfluss auf die Polarisierung der Immunantwort nehmen können, da $IFN-\gamma$ die T_H1 -Polarisierung positiv beeinflusst^{66,171}. Diese drei Hypothesen ergeben gerade im Hinblick auf die Hygiene-Hypothese interessante Möglichkeiten einer langfristigen T_H1 -Polarisierung der allergenspezifischen Immunantwort (siehe auch Abb. 4.1). So könnte man sich vorstellen, dass durch den gleichzeitigen bzw. zeitnahen Kontakt von Allergen und den stark T_H1 -polarisierend wirkenden Kuhstallbakterien zunächst eine allergenspezifische T_H1 -Antwort entsteht. Bei späterem Allergenkontakt auch ohne gleichzeitigen Kontakt mit den Kuhstallbakterien könnten dann zum einen die Prä- T_H1 -Zellen die Immunantwort bestimmen und zum anderen auch die zuvor gebildeten Gedächtniszellen eine erneute T_H1 -Immunantwort hervorrufen.

4.7 FAZIT

Bei zusammenfassender Betrachtung untermauern die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse die Hygiene-Hypothese, die der Bauernhofumgebung aufgrund ihrer hohen mikrobiellen Belastung einen allergieprotektiven Effekt zuschreibt. Dabei scheinen die untersuchten Bakterien eher durch eine T_H1 -Polarisierung der Immunantwort als durch eine verstärkte Suppression bzw. Induktion einer regulatorischen Immunantwort zu wirken. Die Bedeutung der verschiedenen Strukturen der Bakterien für die T_H1 -Polarisierung und Allergieprotektion sowie die ersten Einblicke in die zu Grunde liegenden Mechanismen bieten viele Ansatzpunkte für weiterführende Studien und für die Entwicklung von allergieprotektiven Behandlungen und Therapiestrategien.

LITERATUR

- 1 **Kay, A. B.** Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 344(1):30-37, 2001.
- 2 **Busse, W. W. and Lemanske, R. F., Jr.** Asthma. *N.Engl.J.Med.* 344(5):350-362, 2001.
- 3 **Romagnani, S.** Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol.Today* 12(8):256-257, 1991.
- 4 **Robinson, D. S.** The Th1 and Th2 concept in atopic allergic disease. *Chem.Immunol.* 78:50-61, 2000.
- 5 **Kon, O. M. and Kay, A. B.** T cells and chronic asthma. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 118(2-4):133-135, 1999.
- 6 **Hawrylowicz, C. M. and O'Garra, A.** Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat.Rev.Immunol.* 5(4):271-283, 2005.
- 7 **Romagnani, S.** The role of lymphocytes in allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* 105(3):399-408, 2000.
- 8 **Taylor, A., Verhagen, J., Akdis, C. A., and Akdis, M.** T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 135(1):73-82, 2004.
- 9 **Kemeny, D. M., Urbanek, R., Ewan, P., McHugh, S., Richards, D., Patel, S., and Lessof, M. H.** The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin.Exp.Allergy* 19(5):545-549, 1989.
- 10 **Ebner, C., Siemann, U., Najafian, N., Scheiner, O., and Kraft, D.** Characterization of allergen (Bet v 1)-specific T cell lines and clones from non-allergic individuals. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 107(1-3):183-185, 1995.
- 11 **Liew, F. Y.** T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat.Rev.Immunol.* 2(1):55-60, 2002.
- 12 **Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H.** A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100(6):655-669, 2000.
- 13 **Khademi, M., Illes, Z., Gielen, A. W., Marta, M., Takazawa, N., Baecher-Allan, C., Brundin, L., Hannerz, J., Martin, C., Harris, R. A., Hafler, D. A., Kuchroo, V. K., Olsson, T., Piehl, F., and Wallstrom, E.** T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J.Immunol.* 172(11):7169-7176, 2004.
- 14 **Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D. H., Gubler, U., and Sinigaglia, F.** Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J.Exp.Med.* 185(5):825-831, 1997.
- 15 **Murphy, K. M. and Reiner, S. L.** The lineage decisions of helper T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2(12):933-944, 2002.
- 16 **Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y.** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4(4):330-336, 2003.
- 17 **Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., and Cua, D. J.** IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* 201(2):233-240, 2005.
- 18 **Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T.** Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat.Immunol.* 6(11):1123-1132, 2005.
- 19 **Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., and Littman, D. R.** The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126(6):1121-1133, 2006.

- 20 **Cua, D. J. and Kastelein, R. A.** TGF-beta, a 'double agent' in the immune pathology war. *Nat.Immunol.* 7(6):557-559, 2006.
- 21 **Nakamura, T., Lee, R. K., Nam, S. Y., Podack, E. R., Bottomly, K., and Flavell, R. A.** Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J.Immunol.* 158(6):2648-2653, 1997.
- 22 **Miner, K. T. and Croft, M.** Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J.Immunol.* 160(11):5280-5287, 1998.
- 23 **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136(7):2348-2357, 1986.
- 24 **Parronchi, P., De Carli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Sampognaro, S., Piccinni, M. P., Macchia, D., Maggi, E., Del Prete, G., and Romagnani, S.** IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J.Immunol.* 149(9):2977-2983, 1992.
- 25 **Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Rugeu, F. S., De Carli, M., Ricci, M., and Romagnani, S.** Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J.Immunol.* 148(7):2142-2147, 1992.
- 26 **Kidd, P.** Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern.Med.Rev.* 8(3):223-246, 2003.
- 27 **Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., and Akdis, C. A.** Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J.Exp.Med.* 199(11):1567-1575, 2004.
- 28 **Maloy, K. J. and Powrie, F.** Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat.Immunol.* 2(9):816-822, 2001.
- 29 **Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G.** A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737-742, 1997.
- 30 **Steinman, L.** A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat.Med.* 13(2):139-145, 2007.
- 31 **Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C.** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat.Immunol.* 6(11):1133-1141, 2005.
- 32 **Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Sedgwick, J. D., and Cua, D. J.** Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J.Exp.Med.* 198(12):1951-1957, 2003.
- 33 **Bach, J. F.** The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347(12):911-920, 2002.
- 34 **Herrick, C. A. and Bottomly, K.** To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat.Rev.Immunol.* 3(5):405-412, 2003.
- 35 **Schaub, B., Lauener, R., and von Mutius, E.** The many faces of the hygiene hypothesis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117(5):969-977, 2006.
- 36 **Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Nickel, R., Niggemann, B., Sommerfeld, C., and Wahn, U.** The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *J.Allergy Clin.Immunol.* 108(5):709-714, 2001.
- 37 **Weiss, S. T.** Eat dirt--the hygiene hypothesis and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347(12):930-931, 2002.
- 38 **Noverr, M. C., Noggle, R. M., Toews, G. B., and Huffnagle, G. B.** Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. *Infect.Immun.* 72(9):4996-5003, 2004.
- 39 **Adkins, B.** Development of neonatal Th1/Th2 function. *Int.Rev.Immunol.* 19(2-3):157-171, 2000.

- 40 **Adkins, B., Leclerc, C., and Marshall-Clarke, S.** Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat.Rev.Immunol.* 4(7):553-564, 2004.
- 41 **Prescott, S. L., Macaubas, C., Holt, B. J., Smallacombe, T. B., Loh, R., Sly, P. D., and Holt, P. G.** Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J.Immunol.* 160(10):4730-4737, 1998.
- 42 **Levy, O.** Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat.Rev.Immunol.* 7(5):379-390, 2007.
- 43 **Saxon, A. and Diaz-Sanchez, D.** Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat.Immunol.* 6(3):223-226, 2005.
- 44 **Heinrich, J. and Wichmann, H. E.** Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 4(5):341-348, 2004.
- 45 **Gern, J. E., Lemanske, R. F., Jr., and Busse, W. W.** Early life origins of asthma. *J.Clin.Invest* 104(7):837-843, 1999.
- 46 **Platts-Mills, T. A., Erwin, E., Heymann, P., and Woodfolk, J.** Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma? *Allergy* 60 Suppl 79:25-31, 2005.
- 47 **Beuther, D. A. and Sutherland, E. R.** Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 175(7):661-666, 2007.
- 48 **Liu, A. H. and Leung, D. Y.** Renaissance of the hygiene hypothesis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117(5):1063-1066, 2006.
- 49 **von Mutius, E.** Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma? The epidemiological evidence. *Eur.Respir.J.* 18(5):872-881, 2001.
- 50 **von Mutius, E.** Paediatric origins of adult lung disease. *Thorax* 56(2):153-157, 2001.
- 51 **Prescott, S. L., Dunstan, J. A., Hale, J., Breckler, L., Lehmann, H., Weston, S., and Richmond, P.** Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin.Exp.Allergy* 35(12):1557-1564, 2005.
- 52 **Pochard, P., Gosset, P., Grangette, C., Andre, C., Tonnel, A. B., Pestel, J., and Mercenier, A.** Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110(4):617-623, 2002.
- 53 **Maizels, R. M.** Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr.Opin.Immunol.* 17(6):656-661, 2005.
- 54 **Kilpelainen, M., Terho, E. O., Helenius, H., and Koskenvuo, M.** Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy* 57(12):1130-1135, 2002.
- 55 **Ege, M. J., Frei, R., Bieli, C., Schram-Bijkerk, D., Waser, M., Benz, M. R., Weiss, G., Nyberg, F., van Hage, M., Pershagen, G., Brunekreef, B., Riedler, J., Lauener, R., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., and The Parsifal Study Team.** Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 2007.
- 56 **Von Ehrenstein, O. S., von Mutius, E., Illi, S., Baumann, L., Bohm, O., and von Kries, R.** Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin.Exp.Allergy* 30(2):187-193, 2000.
- 57 **Remes, S. T., Iivanainen, K., Koskela, H., and Pekkanen, J.** Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children? *Clin.Exp.Allergy* 33(4):427-434, 2003.
- 58 **Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., and von Mutius, E.** Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358(9288):1129-1133, 2001.
- 59 **Viinanen, A., Munhbayarlah, S., Zevgee, T., Narantsetseg, L., Naidansuren, Ts, Koskenvuo, M., Helenius, H., and Terho, E. O.** Prevalence of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and allergic sensitization in Mongolia. *Allergy* 60(11):1370-1377, 2005.

- 60 **Nicolaou, N., Siddique, N., and Custovic, A.** Allergic disease in urban and rural populations: increasing prevalence with increasing urbanization. *Allergy* 60(11):1357-1360, 2005.
- 61 **Racila, D. M. and Kline, J. N.** Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116(6):1202-1205, 2005.
- 62 **Roy, S. R., Schiltz, A. M., Marotta, A., Shen, Y., and Liu, A. H.** Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112(3):571-578, 2003.
- 63 **Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., and von Mutius, E.** Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N.Engl.J.Med.* 347(12):869-877, 2002.
- 64 **Blumer, N., Herz, U., Wegmann, M., and Renz, H.** Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin.Exp.Allergy* 35(3):397-402, 2005.
- 65 **Gerhold, K., Blumchen, K., Bock, A., Seib, C., Stock, P., Kallinich, T., Lohning, M., Wahn, U., and Hamelmann, E.** Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110(1):110-116, 2002.
- 66 **Klinman, D. M.** Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat.Rev.Immunol.* 4(4):249-258, 2004.
- 67 **Peters, M., Kauth, M., Schwarze, J., Korner-Rettberg, C., Riedler, J., Nowak, D., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., Bufe, A., and Holst, O.** Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax* 61(2):134-139, 2006.
- 68 **Delayre-Orthez, C., Becker, J., de Blay, F., Frossard, N., and Pons, F.** Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int.Arch Allergy Immunol* 138(4):298-304, 2005.
- 69 **Renz, H. and Herz, U.** The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma. *Eur.Respir.J.* 19(1):158-171, 2002.
- 70 **Ober, C. and Thompson, E. E.** Rethinking genetic models of asthma: the role of environmental modifiers. *Curr.Opin.Immunol.* 17(6):670-678, 2005.
- 71 **Morahan, G., Huang, D., Wu, M., Holt, B. J., White, G. P., Kendall, G. E., Sly, P. D., and Holt, P. G.** Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet* 360(9331):455-459, 2002.
- 72 **Werner, M., Topp, R., Wimmer, K., Richter, K., Bischof, W., Wjst, M., and Heinrich, J.** TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 112(2):323-330, 2003.
- 73 **Banchereau, J. and Steinman, R. M.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-252, 1998.
- 74 **Lambrecht, B. N.** Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy* 60(3):271-282, 2005.
- 75 **Jahnsen, F. L., Moloney, E. D., Hogan, T., Upham, J. W., Burke, C. M., and Holt, P. G.** Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* 56(11):823-826, 2001.
- 76 **Lambrecht, B. N., De Veerman, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Thielemans, K., and Pauwels, R. A.** Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J.Clin.Invest* 106(4):551-559, 2000.
- 77 **Lambrecht, B. N. and Hammad, H.** Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat.Rev.Immunol.* 3(12):994-1003, 2003.
- 78 **van Rijt, L. S. and Lambrecht, B. N.** Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin.Exp.Allergy* 35(9):1125-1134, 2005.

- 79 **Lambrecht, B. N., Salomon, B., Klatzmann, D., and Pauwels, R. A.** Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J.Immunol.* 160(8):4090-4097, 1998.
- 80 **van Rijt, L. S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N.** In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J.Exp.Med.* 201(6):981-991, 2005.
- 81 **Hammad, H., Charbonnier, A. S., Duez, C., Jacquet, A., Stewart, G. A., Tonnel, A. B., and Pestel, J.** Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 98(4):1135-1141, 2001.
- 82 **Chen, X. Q., Yang, J., Hu, S. P., Nie, H. X., Mao, G. Y., and Chen, H. B.** Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1- and Th2-type cytokine balance. *Respiration* 73(1):34-40, 2006.
- 83 **Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S., and Holt, P. G.** Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J.Exp.Med.* 188(11):2019-2031, 1998.
- 84 **Colonna, M., Pulendran, B., and Iwasaki, A.** Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat.Immunol.* 7(2):117-120, 2006.
- 85 **Wu, L. and Dakic, A.** Development of dendritic cell system. *Cell Mol.Immunol.* 1(2):112-118, 2004.
- 86 **Iwasaki, A. and Medzhitov, R.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 5(10):987-995, 2004.
- 87 **Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M.** Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat.Med.* 5(8):919-923, 1999.
- 88 **Reis e Sousa.** Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin.Immunol.* 16(1):27-34, 2004.
- 89 **Kapsenberg, M. L.** Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat.Rev.Immunol.* 3(12):984-993, 2003.
- 90 **Hochweller, K. and Anderton, S. M.** Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo. *Eur.J.Immunol.* 35(4):1086-1096, 2005.
- 91 **Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L.** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol.Today* 20(12):561-567, 1999.
- 92 **Borriello, F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, A. N., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H.** B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 6(3):303-313, 1997.
- 93 **Cayabyab, M., Phillips, J. H., and Lanier, L. L.** CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 152(4):1523-1531, 1994.
- 94 **Somoza, C. and Lanier, L. L.** T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions. *Res.Immunol.* 146(3):171-176, 1995.
- 95 **Tang, L., Benjaponpitak, S., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T.** Reduced prevalence of allergic disease in patients with multiple sclerosis is associated with enhanced IL-12 production. *J.Allergy Clin.Immunol.* 102(3):428-435, 1998.
- 96 **Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G.** Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J.Exp.Med.* 170(3):827-845, 1989.

- 97 **Hunter, C. A.** New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat.Rev.Immunol.* 5(7):521-531, 2005.
- 98 **Trinchieri, G.** Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 3(2):133-146, 2003.
- 99 **Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A.** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13(5):715-725, 2000.
- 100 **Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell, J. E., Jr., and Murphy, K. M.** Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J.Exp.Med.* 181(5):1755-1762, 1995.
- 101 **Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., and Grusby, M. J.** Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 4(3):313-319, 1996.
- 102 **De Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M., and Kapsenberg, M. L.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J.Immunol.* 168(4):1704-1709, 2002.
- 103 **Smits, H. H., De Jong, E. C., Schuitemaker, J. H., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y., Kapsenberg, M. L., and Wierenga, E. A.** Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J.Immunol.* 168(4):1710-1716, 2002.
- 104 **Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O'Garra, A.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J.Immunol.* 154(10):5071-5079, 1995.
- 105 **Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M.** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260(5107):547-549, 1993.
- 106 **Hammad, H. and Lambrecht, B. N.** Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 118(2):331-336, 2006.
- 107 **Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., Kishihara, K., and Yasutomo, K.** Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity.* 19(4):549-559, 2003.
- 108 **Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A.** Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat.Immunol.*, 2005.
- 109 **Rutz, S., Mordmuller, B., Sakano, S., and Scheffold, A.** Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur.J.Immunol.*, 2005.
- 110 **Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S.** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J.Exp.Med.* 177(4):1199-1204, 1993.
- 111 **Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S.** Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J.Immunol.* 172(7):4253-4259, 2004.
- 112 **Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R. A.** Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117(4):515-526, 2004.
- 113 **De Jong, E. C., Smits, H. H., and Kapsenberg, M. L.** Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin.Immunopathol.* 26(3):289-307, 2005.

- 114 **Beutler, B. and Rietschel, E. T.** Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat.Rev.Immunol.* 3(2):169-176, 2003.
- 115 **Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R.** Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216, 2002.
- 116 **Muller, C. A., Autenrieth, I. B., and Peschel, A.** Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol.Life Sci.* 62(12):1297-1307, 2005.
- 117 **Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A.** Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu.Rev.Immunol.* 22:745-763, 2004.
- 118 **Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T.** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2(8):675-680, 2001.
- 119 **Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B.** The interface between innate and adaptive immunity. *Nat.Immunol.* 5(10):971-974, 2004.
- 120 **Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R.** Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 2(10):947-950, 2001.
- 121 **Sansonetti, P. J. and Di Santo, J. P.** Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity.* 26(2):149-161, 2007.
- 122 **Creagh, E. M. and O'Neill, L. A.** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27(8):352-357, 2006.
- 123 **Vandenbulcke, L., Bachert, C., Van Cauwenberge, P., and Claeys, S.** The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 139(2):159-165, 2006.
- 124 **Anderson, K. V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C.** Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42(3):791-798, 1985.
- 125 **Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A.** The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86(6):973-983, 1996.
- 126 **Armant, M. A. and Fenton, M. J.** Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 3(8):REVIEWS3011, 2002.
- 127 **Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801, 2006.
- 128 **Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282(5396):2085-2088, 1998.
- 129 **Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C., and Boneca, I. G.** Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5(10):1000-1006, 2004.
- 130 **Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmuller, K. H., Jung, G., Brock, R., and Ulmer, A. J.** Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. *FEBS J.* 272(24):6354-6364, 2005.
- 131 **Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmuller, K. H., Jung, G., Brock, R., Akira, S., and Ulmer, A. J.** Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur.J.Immunol.* 35(1):282-289, 2005.
- 132 **Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 13(7):933-940, 2001.
- 133 **Franchi, L., McDonald, C., Kanneganti, T. D., Amer, A., and Nunez, G.** Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J.Immunol.* 177(6):3507-3513, 2006.
- 134 **Inohara, N. and Nunez, G.** NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat.Rev.Immunol.* 3(5):371-382, 2003.

- 135 **Murray, P. J.** NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr.Opin.Immunol.* 17(4):352-358, 2005.
- 136 **Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., and Watanabe, T.** Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat.Rev.Immunol.* 6(1):9-20, 2006.
- 137 **Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., and Nunez, G.** Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J.Biol.Chem.* 276(7):4812-4818, 2001.
- 138 **Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J.** Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300(5625):1584-1587, 2003.
- 139 **Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez, G., and Inohara, N.** An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat.Immunol.* 4(7):702-707, 2003.
- 140 **Beinke, S. and Ley, S. C.** Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem.J.* 382(Pt 2):393-409, 2004.
- 141 **Liou, H. C.** Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. *J.Biochem.Mol.Biol.* 35(6):537-546, 2002.
- 142 **Bonizzi, G. and Karin, M.** The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25(6):280-288, 2004.
- 143 **Grumont, R., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Gugasyan, R., White, C., Caminschi, I., Cook, W., and Gerondakis, S.** c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J.Exp.Med.* 194(8):1021-1032, 2001.
- 144 **Rook, G. A. and Brunet, L. R.** Old friends for breakfast. *Clin.Exp.Allergy* 35(7):841-842, 2005.
- 145 **Wu, C., Yang, G., Bermudez-Humaran, L. G., Pang, Q., Zeng, Y., Wang, J., and Gao, X.** Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *Int.Immunopharmacol.* 6(4):610-615, 2006.
- 146 **Wegmann, M., Fehrenbach, H., Fehrenbach, A., Held, T., Schramm, C., Garn, H., and Renz, H.** Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 35(10):1263-1271, 2005.
- 147 **Neuhaus-Steinmetz, U., Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Lommatzsch, M., Herz, U., Kips, J., Alarie, Y., and Renz, H.** Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int.Arch Allergy Immunol* 121(1):57-67, 2000.
- 148 **Wegmann, M., Fehrenbach, H., Fehrenbach, A., Held, T., Schramm, C., Garn, H., and Renz, H.** Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 35(10):1263-1271, 2005.
- 149 **Boyum, A.** Separation of white blood cells. *Nature* 204:793-794, 1964.
- 150 **Turpin, J., Hester, J. P., Hersh, E. M., and Lopez-Berestein, G.** Centrifugal elutriation as a method for isolation of large numbers of functionally intact human peripheral blood monocytes. *J.Clin.Apher.* 3(2):111-118, 1986.
- 151 **Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J.Exp.Med.* 179(4):1109-1118, 1994.
- 152 **Dickgreber, N.** Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege in humanen dendritischen Zellen durch Stallbakterien. 2006.
- 153 **Lien, E., Means, T. K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M. J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R. W., Ingalls, R. R., and Golenbock, D. T.** Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J.Clin.Invest* 105(4):497-504, 2000.

- 154 **Woelk, E.** Erkennung und Aufnahme inflammatorisch aktiver synthetischer Peptidoglykanstrukturen. 2005.
- 155 **Moynagh, P. N.** TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol.* 26(9):469-476, 2005.
- 156 **Lohoff, M. and Mak, T. W.** Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.* 5(2):125-135, 2005.
- 157 **Repa, A., Grangette, C., Daniel, C., Hochreiter, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Thalhamer, J., Kraft, D., Breiteneder, H., Mercenier, A., and Wiedermann, U.** Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. *Vaccine* 22(1):87-95, 2003.
- 158 **Adel-Patient, K., Ah-Leung, S., Creminon, C., Nouaille, S., Chatel, J. M., Langella, P., and Wal, J. M.** Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine beta-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin.Exp.Allergy* 35(4):539-546, 2005.
- 159 **Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H., and Yoshikai, Y.** Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. *J.Allergy Clin.Immunol.* 102(1):57-64, 1998.
- 160 **Chu, H. W., Honour, J. M., Rawlinson, C. A., Harbeck, R. J., and Martin, R. J.** Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice. *Infect.Immun.* 71(3):1520-1526, 2003.
- 161 **Delayre-Orthez, C., de Blay, F., Frossard, N., and Pons, F.** Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy* 34(11):1789-1795, 2004.
- 162 **Cayabyab, M., Phillips, J. H., and Lanier, L. L.** CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 152(4):1523-1531, 1994.
- 163 **Somoza, C. and Lanier, L. L.** T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions. *Res.Immunol.* 146(3):171-176, 1995.
- 164 **Borriello, F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, A. N., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H.** B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 6(3):303-313, 1997.
- 165 **Somoza, C. and Lanier, L. L.** T-cell costimulation via CD28-CD80/CD86 and CD40-CD40 ligand interactions. *Res.Immunol.* 146(3):171-176, 1995.
- 166 **Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M.** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260(5107):547-549, 1993.
- 167 **Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O'Garra, A.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J.Immunol.* 154(10):5071-5079, 1995.
- 168 **Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., and Romagnani, S.** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J.Exp.Med.* 177(4):1199-1204, 1993.
- 169 **Rutz, S., Mordmuller, B., Sakano, S., and Scheffold, A.** Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur.J.Immunol.*, 2005.
- 170 **Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A.** Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat.Immunol.*, 2005.
- 171 **Gautier, G., Humbert, M., Deauvieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P.** A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J.Exp.Med.*, 2005.

- 172 **Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L.** High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int.Immunol.* 10(11):1593-1598, 1998.
- 173 **Romagnani, S.** Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr.Opin.Immunol.* 6(6):838-846, 1994.
- 174 **Romagnani, S.** The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112(3):352-363, 2004.
- 175 **Romagnani, S.** Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113(3):395-400, 2004.
- 176 **Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., and van Ree, R.** Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296(5567):490-494, 2002.
- 177 **Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R. A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D. H., Ray, A., and Hamid, Q.** Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 103(2 Pt 1):215-222, 1999.
- 178 **Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J. N., Qin, S., Lehr, H. A., Green, F. H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P. R., Szabo, S. J., Drazen, J. M., De Sanctis, G. T., and Glimcher, L. H.** Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295(5553):336-338, 2002.
- 179 **Erb, K. J., Holloway, J. W., Soback, A., Moll, H., and Le Gros, G.** Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J.Exp.Med.* 187(4):561-569, 1998.
- 180 **Brugnolo, F., Sampognaro, S., Liotta, F., Cosmi, L., Annunziato, F., Manuelli, C., Campi, P., Maggi, E., Romagnani, S., and Parronchi, P.** The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4+ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111(2):380-388, 2003.
- 181 **Romagnani, S.** Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol.Today* 13(10):379-381, 1992.
- 182 **Renz, H., Mutius, E., Illi, S., Wolkers, F., Hirsch, T., and Weiland, S. K.** T(H)1/T(H)2 immune response profiles differ between atopic children in eastern and western Germany. *J.Allergy Clin.Immunol.* 109(2):338-342, 2002.
- 183 **Cottrez, F., Hurst, S. D., Coffman, R. L., and Groux, H.** T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J.Immunol.* 165(9):4848-4853, 2000.
- 184 **Lewkowich, I. P., Herman, N. S., Schleifer, K. W., Dance, M. P., Chen, B. L., Dienger, K. M., Sproles, A. A., Shah, J. S., Kohl, J., Belkaid, Y., and Wills-Karp, M.** CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J.Exp.Med.* 202(11):1549-1561, 2005.
- 185 **Suto, A., Nakajima, H., Kagami, S. I., Suzuki, K., Saito, Y., and Iwamoto, I.** Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164(4):680-687, 2001.
- 186 **Chatelain, R., Mauze, S., and Coffman, R. L.** Experimental Leishmania major infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* 21(4):211-218, 1999.
- 187 **Horner, A. A.** Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117(5):1133-1140, 2006.
- 188 **Cook, D. N., Pisetsky, D. S., and Schwartz, D. A.** Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat.Immunol.* 5(10):975-979, 2004.
- 189 **Weidemann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S., Stelter, F., Rietschel, E. T., Flad, H. D., and Ulmer, A. J.** Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect.Immun.* 65(3):858-864, 1997.
- 190 **Elson, G., Dunn-Siegrist, I., Daubeuf, B., and Pugin, J.** Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood* 109(4):1574-1583, 2007.

- 191 **Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., and Schwartz, D. A.** TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat.Genet.* 25(2):187-191, 2000.
- 192 **Kuipers, H., Hijdra, D., De Vries, V. C., Hammad, H., Prins, J. B., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N.** Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. *J.Immunol.* 171(7):3645-3654, 2003.
- 193 **Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A., and Bottomly, K.** Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J.Exp.Med.* 196(12):1645-1651, 2002.
- 194 **Hollingsworth, J. W., Whitehead, G. S., Lin, K. L., Nakano, H., Gunn, M. D., Schwartz, D. A., and Cook, D. N.** TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. *J.Immunol.* 176(10):5856-5862, 2006.
- 195 **Eder, W., Klimecki, W., Yu, L., von Mutius, E., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Nowak, D., and Martinez, F. D.** Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113(3):482-488, 2004.
- 196 **Weidinger, S., Klopp, N., Rummler, L., Wagenpfeil, S., Baurecht, H. J., Gauger, A., Darsow, U., Jakob, T., Novak, N., Schafer, T., Heinrich, J., Behrendt, H., Wichmann, H. E., Ring, J., and Illig, T.** Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin.Exp.Allergy* 35(7):866-872, 2005.
- 197 **Kabesch, M., Peters, W., Carr, D., Leupold, W., Weiland, S. K., and von Mutius, E.** Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111(4):813-817, 2003.
- 198 **Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599-603, 2001.
- 199 **Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., and Cho, J. H.** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):603-606, 2001.
- 200 **Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P. J., Mirza, M. M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeier, A., Macpherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J. E., Foelsch, U. R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., and Mathew, C. G.** Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357(9272):1925-1928, 2001.
- 201 **van Strien, R. T., Engel, R., Holst, O., Bufe, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., and von Mutius, E.** Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J.Allergy Clin.Immunol.* 113(5):860-867, 2004.
- 202 **Velasco, G., Campo, M., Manrique, O. J., Bellou, A., He, H., Arestides, R. S., Schaub, B., Perkins, D. L., and Finn, P. W.** Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 32(3):218-224, 2005.
- 203 **Hertz, C. J., Kiertscher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D., and Modlin, R. L.** Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 166(4):2444-2450, 2001.
- 204 **Weigt, H., Muhlradt, P. F., Larbig, M., Krug, N., and Braun, A.** The Toll-like receptor-2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 cooperates with IFN-gamma to reverse the Th2 skew in an in vitro allergy model. *J.Immunol.* 172(10):6080-6086, 2004.
- 205 **Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H., and Raz, E.** Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J.Immunol.* 172(5):2739-2743, 2004.
- 206 **Re, F. and Strominger, J. L.** Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J.Biol.Chem.* 276(40):37692-37699, 2001.

- 207 **Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., and Pulendran, B.** Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J.Immunol.* 171(10):4984-4989, 2003.
- 208 **Re, F. and Strominger, J. L.** IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J.Immunol.* 173(12):7548-7555, 2004.
- 209 **Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T., and Takada, H.** Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect.Immun.* 73(12):7967-7976, 2005.
- 210 **Netea, M. G., Ferwerda, G., De Jong, D. J., Jansen, T., Jacobs, L., Kramer, M., Naber, T. H., Drenth, J. P., Girardin, S. E., Jan, Kullberg B., Adema, G. J., and Van Der Meer, J. W.** Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J.Immunol.* 174(10):6518-6523, 2005.
- 211 **Kapetanovic, R., Nahori, M. A., Balloy, V., Fitting, C., Philpott, D. J., Cavillon, J. M., and Adib-Conquy, M.** Contribution of phagocytosis and intracellular sensing for cytokine production by *Staphylococcus aureus*-activated macrophages. *Infect.Immun.* 75(2):830-837, 2007.
- 212 **Daniel, C., Repa, A., Wild, C., Pollak, A., Pot, B., Breiteneder, H., Wiedermann, U., and Mercenier, A.** Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy* 61(7):812-819, 2006.
- 213 **Kimoto, H., Mizumachi, K., Okamoto, T., and Kurisaki, J.** New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol.Immunol.* 48(2):75-82, 2004.
- 214 **Pochard, P., Hammad, H., Ratajczak, C., Charbonnier-Hatzfeld, A. S., Just, N., Tonnel, A. B., and Pestel, J.** Direct regulatory immune activity of lactic acid bacteria on Der p 1-pulsed dendritic cells from allergic patients. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116(1):198-204, 2005.
- 215 **Cortes-Perez, N. G., Ah-Leung, S., Bermudez-Humaran, L. G., Corthier, G., Wal, J. M., Langella, P., and Adel-Patient, K.** Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice. *Clin.Vaccine Immunol.* 14(3):226-233, 2007.
- 216 **von Hertzen, L. and Haahtela, T.** Disconnection of man and the soil: reason for the asthma and atopy epidemic? *J.Allergy Clin.Immunol.* 117(2):334-344, 2006.
- 217 **Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C. L.** The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat.Rev.Immunol.* 1(1):69-75, 2001.
- 218 **Decker, T., Muller, M., and Stockinger, S.** The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat.Rev.Immunol.* 5(9):675-687, 2005.
- 219 **Hilliard, B. A., Mason, N., Xu, L., Sun, J., Lamhamedi-Cherradi, S. E., Liou, H. C., Hunter, C., and Chen, Y. H.** Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J.Clin.Invest* 110(6):843-850, 2002.
- 220 **Pan, Q., Kravchenko, V., Katz, A., Huang, S., Li, M., Mathison, J. C., Kobayashi, K., Flavell, R. A., Schreiber, R. D., Goeddel, D., and Ulevitch, R. J.** NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect.Immun.* 74(4):2121-2127, 2006.
- 221 **Sanjabi, S., Hoffmann, A., Liou, H. C., Baltimore, D., and Smale, S. T.** Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97(23):12705-12710, 2000.
- 222 **Carmody, R. J., Ruan, Q., Liou, H. C., and Chen, Y. H.** Essential Roles of c-Rel in TLR-Induced IL-23 p19 Gene Expression in Dendritic Cells. *J.Immunol.* 178(1):186-191, 2007.
- 223 **Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G.** Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol.Cell* 11(6):1563-1574, 2003.
- 224 **Moser, M. and Murphy, K. M.** Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* 1(3):199-205, 2000.

-
- 225 **Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.** The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:S127-S132, 2002.
- 226 **Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.** Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* 1(4):311-316, 2000.

ZUSAMMENFASSUNG

Aktuelle epidemiologische Studien belegen, dass Kinder, die in einer bäuerlichen Umgebung aufwachsen, eine geringere Inzidenz für atopische Sensibilisierung, Heuschnupfen und Asthma aufweisen, als Kinder im selben Alter, die nicht in dieser Umgebung leben. Diese Befunde unterstützen die Hygiene-Hypothese, welche besagt, dass ein Kontakt zu einer Mikroorganismen-reichen Umgebung in den ersten Lebensjahren die Entwicklung von allergischen Reaktionen im späteren Leben beeinflusst. Da die ersten Lebensjahre wichtig für die Reifung des Immunsystems und der Entwicklung einer gesunden $T_{\text{Helfer}} (T_{\text{H}})$ -Zell-Balance ($T_{\text{H}1}/T_{\text{H}2}/T_{\text{Reg}}$) sind, könnten die mikrobiellen Komponenten eine entscheidende Rolle bei der Ausrichtung dieser Balance spielen, indem sie entweder $T_{\text{H}1}$ -Antworten begünstigen und dadurch die allergieassoziierte $T_{\text{H}2}$ -Antwort unterdrücken oder indem sie T_{Reg} -Antworten induzieren und damit generell alle überschießenden Immunantworten supprimieren. Daraus entstand die Frage, ob Mikroorganismen der bäuerlichen Umgebung und/oder ihre Produkte in der Lage sind, die Immunantworten in einer dieser Weisen zu modulieren. Um die potentielle allergieprotektive Wirkung dieser Mikroorganismen zu untersuchen, wurden zwei aus Kuhställen isolierte Bakterienstämme, *Acinetobacter Iwoffii* F78 (*A. Iwoffii* F78) und *Lactococcus lactis* G121 (*L. lactis* G121), ausgewählt und charakterisiert. Tatsächlich konnte in einem Mausmodell für allergisches Asthma gezeigt werden, dass beide Kuhstallisolate die allergischen Reaktionen der Mäuse reprimieren. Da unklar blieb, welche bakteriellen Moleküle und welche Rezeptoren und nachfolgenden Signaltransduktionswege beteiligt waren, wurde die Fähigkeit der Bakterien Immunantworten zu modulieren in humanen dendritischen Zellen (DCs) untersucht. Beide Bakterienstämme induzierten die Aktivierung und Reifung der DCs und führten zu einer stark $T_{\text{H}1}$ -polarisierten Immunantwort. Zudem konnten keine Anzeichen für die Induktion einer $T_{\text{H}2}$ - oder T_{Reg} -Antwort nachgewiesen werden. Um die für die $T_{\text{H}1}$ -Polarisierung verantwortlichen Strukturen der Bakterien näher zu charakterisieren wurde die Beteiligung verschiedener Rezeptoren des angeborenen Immunsystems untersucht. Diese Studien zeigten, dass der TLR4-Ligand von *A. Iwoffii* F78, das LPS der äußeren Membran, für die $T_{\text{H}1}$ -polarisierenden Effekte verantwortlich ist und zumindest für die allergieprotektiven Fähigkeiten die bedeutendste Struktur dieses Bakterienstammes ist. Im Hinblick auf *L. lactis* G121 konnte die Notwendigkeit der zellulären Aufnahme des Bakteriums und damit die Involvierung eines intrazellulären Rezeptors, wahrscheinlich NOD2, für die $T_{\text{H}1}$ -polarisierenden Effekte nachgewiesen werden. Zudem induzierte *L. lactis* G121 eine untypische Zellkerntranslokation der NF- κ B-Untereinheit c-Rel ohne gleichzeitige Translokation der p65-Untereinheit. Weiterhin konnte eine bis zu 48 h anhaltende Aktivierung der DCs durch *L. lactis* G121 festgestellt werden. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus für eine dauerhafte Induktion einer anti-allergischen Immunantwort sein.

Insgesamt untermauern diese Daten die Hygiene-Hypothese und implizieren dass die $T_{\text{H}1}$ -polarisierenden Eigenschaften der Bakterien wichtige Mechanismen für die allergieprotektiven Effekte der bäuerlichen Umgebung darstellen. Zudem liefert diese Arbeit erste Ansatzpunkte für die Entwicklung von allergieprotektiven Therapien mit einer potentiellen Anwendung der Kuhstallbakterien.

ABSTRACT

Recent epidemiological studies clearly indicate that children who grow up in a farming environment show lower levels of atopic sensitization, hay fever and asthma than children of the same age living not in such an environment. These findings support the hygiene hypothesis, stating that an early-life contact to an environment rich in microbial compounds influences the development of allergic reactions later in life. As the first year of life is important for the maturation of the immune system and the establishment of the T_{Helper} (T_{H}) cell balance ($T_{\text{H}1}/T_{\text{H}2}/T_{\text{Reg}}$) such microbial contact might play a pivotal role in adjusting this balance by either promoting $T_{\text{H}1}$ responses and thereby inhibiting allergy-associated $T_{\text{H}2}$ responses or promoting T_{Regs} and thereby suppress in general overwhelming immune responses. Therefore the question arose if farm microbial organisms and/or their products may have the ability to modulate immune responses in either way. To gain further insight into the potential allergy-protective properties of farm microbes two bacterial species isolated from cowsheds of farms were selected and characterized, namely *Acinetobacter Iwoffii* F78 (*A. Iwoffii* F78) and *Lactococcus lactis* G121 (*L. lactis* G121). In fact, it could be shown that both bacterial isolates were able to reduce allergic reactions in a mouse model of allergic asthma. Since it remained unclear which bacterial molecules and which receptors and subsequent signal transduction pathways were involved, the immune modulatory capacities of the bacteria with focus on their influence on the T_{H} cell balance were examined in human dendritic cells (DCs) as these cells provide a number of essential signals for T cell priming. Both bacterial strains induced activation and maturation of DCs and led to a strong $T_{\text{H}1}$ -polarizing immune response. Furthermore, no evidence for the induction of $T_{\text{H}2}$ or T_{Reg} cells could be detected. To further characterize the microbial structures responsible for the allergy-protective properties the involvement of innate immune receptors that participated in recognition of the two bacteria strains was analyzed. These studies revealed that the TLR4 ligand from *A. Iwoffii* F78, the LPS of the outer membrane is responsible for the $T_{\text{H}1}$ -polarizing effects of *A. Iwoffii* F78 and, at least with respect to the allergy-protective properties, seems to be the most dominant structure of this strain. With respect to *L. lactis* G121, the requirement of phagocytic uptake and thus an intracellular receptor, which most likely is NOD2, could be shown for the $T_{\text{H}1}$ -polarizing effects. In addition, *L. lactis* G121 induced an atypical nuclear translocation of the NF- κ B subunit c-Rel without translocation of the p65 subunit. Moreover, a sustained activation of DCs for up to 48 h was detected. This might be an important mechanism for a prolonged triggering of an anti-allergic immune response.

Together, these data strongly support the hygiene hypothesis and imply that the $T_{\text{H}1}$ -polarization properties of the bacteria are important mechanisms for the allergy-protective farm effects. In addition, this work provides first starting points for the development of allergy-protective therapies with potential application of the cowshed bacteria.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Mechanismen der allergischen Reaktion.....	11
Abb. 1.2:	Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Ausbildung einer gesunden T_{Helfer}^- Balance.....	15
Abb. 1.3:	T-Zell-Aktivierung und -Polarisierung durch DCs.....	18
Abb. 1.4:	Signaltransduktionswege der angeborenen Immunität.....	21
Abb. 2.1:	Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit lebenden bzw. Hitze-inaktivierten <i>L. lactis</i> G121- und <i>A. Iwoffii</i> F78-Präparationen.....	27
Abb. 2.2:	Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch lebende und Antibiotika-abgetötete Bakterien.....	28
Abb. 2.3:	Sensibilisierungs- und Behandlungsschema des OVA-Akutmodells.....	30
Abb. 2.4:	Differenzierung humaner DCs aus Monozyten.....	32
Abb. 2.5:	Isolierung naiver T-Zellen aus Lymphozyten.....	33
Abb. 3.1:	Leicht entzündliche Reaktionen der Lunge bei Behandlung von Mäusen mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78.....	46
Abb. 3.2:	Intranasale Behandlung der Mäuse mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78 verhindert den Einstrom von Eosinophilen in die Lunge.....	47
Abb. 3.3:	<i>L. lactis</i> G121- und <i>A. Iwoffii</i> F78-Behandlung der Mäuse verhindert die Entstehung einer Atemwegsentzündung und einer Becherzellhyperplasie.....	48
Abb. 3.4:	Behandlung mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78 verbessert die Atemwegsreaktivität..	48
Abb. 3.5:	Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78.....	49
Abb. 3.6:	Reifung humaner DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78.....	50
Abb. 3.7:	IL-12p70-Expression und -Freisetzung nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78.....	51
Abb. 3.8:	Expression $T_{\text{H}1}$ -polarisierender Faktoren in DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78.....	52
Abb. 3.9:	Freisetzung von IFN- γ in einer Kokultur von naiven T-Zellen mit autologen DCs.....	54
Abb. 3.10:	Freisetzung von IL-4 in einer Kokultur von naiven T-Zellen mit autologen DCs.....	54
Abb. 3.11:	Zytokinproduktion naiver T-Zellen nach Kokultur mit Bakterien-stimulierten autologen DCs.....	55
Abb. 3.12:	Expression bestimmter, für die Subgruppen der T_{Helfer}^- -Zellen spezifischer, Marker.....	56
Abb. 3.13:	Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch <i>A. Iwoffii</i> F78.....	57
Abb. 3.14:	Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch hitzebehandelte <i>A. Iwoffii</i> F78-Präparationen.....	58
Abb. 3.15:	Hitzebehandelte <i>A. Iwoffii</i> F78-Präparationen aktivieren humane DCs, induzieren jedoch keine Produktion von IL-12p70.....	59
Abb. 3.16:	Überprüfung der Aktivität des blockierenden TLR2-Antikörpers.....	60
Abb. 3.17:	Einfluss des TLR2-blockierenden Antikörpers auf die Aktivierung der DCs durch <i>A. Iwoffii</i> F78.....	60
Abb. 3.18:	Überprüfung der Aktivität der Phagozytose-hemmenden Substanz Cytochalasin D.....	61
Abb. 3.19:	Einfluss der Phagozytose-hemmenden Substanz Cytochalasin D auf die Aktivierung der DCs durch <i>A. Iwoffii</i> F78.....	62

Abb. 3.20:	Einfluss des TLR4 Antagonisten C406 auf die Aktivierung und Polarisierung dendritischer Zellen durch <i>A. Iwoffii</i> F78.....	63
Abb. 3.21:	Aktivierung humaner DCs nach Stimulation mit <i>A. Iwoffii</i> F78-LPS.	64
Abb. 3.22:	Reifung humaner DCs nach Stimulation mit <i>A. Iwoffii</i> F78-LPS.....	64
Abb. 3.23:	T _H 1 Ausrichtung dendritischer Zellen und T _H 1 Verschiebung naiver T-Zellen durch <i>A. Iwoffii</i> F78-LPS.	65
Abb. 3.24:	Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch <i>L. lactis</i> G121....	66
Abb. 3.25:	Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch hitzebehandelte <i>L. lactis</i> G121-Präparationen.....	67
Abb. 3.26:	Hitzebehandelte <i>L. lactis</i> G121-Präparationen aktivieren humane DCs, induzieren jedoch keine Produktion von IL-12p70.	67
Abb. 3.27:	Synthetische TLR2- oder NOD2-Liganden induzieren keine Produktion von IL-12p70.	68
Abb. 3.28:	Rolle der TLR2-Liganden von <i>L. lactis</i> G121 bei der Induktion von IL-8 und IL-12p70.	69
Abb. 3.29:	Verspätete Aktivierung der Genexpression nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121.	70
Abb. 3.30:	Verspätete Freisetzung von Chemo- und Zytokinen nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121.....	71
Abb. 3.31:	Hemmung der Aufnahme von <i>L. lactis</i> G121 durch humane DCs mit Cytochalasin D. .	72
Abb. 3.32:	Einfluss der Phagozytose-hemmenden Substanz Cytochalasin D auf die Aktivierung der DCs durch <i>L. lactis</i> G121.	72
Abb. 3.33:	Scatterplot-Analyse der Genregulation in humanen DCs nach Behandlung mit verschiedenen Bakterien.	74
Abb. 3.34:	Verwandschaftsanalyse der Genregulation in humanen DCs nach Behandlung mit verschiedenen Bakterien.	76
Abb. 3.35:	Microarray-Daten für T _H 1-polarisierende Marker auf humanen DCs nach Bakterienbehandlung.....	77
Abb. 3.36:	Microarray-Daten für T _H 2- bzw. T _{Reg} -polarisierende Marker auf humanen DCs nach Bakterienbehandlung.....	78
Abb. 3.37:	Induktion verschiedener Gene im Interferon-Signalweg durch <i>L. lactis</i> G121.	79
Abb. 3.38:	Aktivierung von IRF3 und des IFN-β-Promotors.....	80
Abb. 3.39:	Lokalisation der p65-Untereinheit in humanen DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121 bzw. <i>E. coli</i> F1111 9-41.	81
Abb. 3.40:	Translokation der c-Rel-Untereinheit in den Zellkern humaner DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121 bzw. <i>E. coli</i> F1111 9-41.	82
Abb. 3.41:	Länger anhaltende Aktivierung von DCs auf Genebene nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121.....	83
Abb. 3.42:	Länger anhaltende T _H 1-Polarisierung von DCs nach Stimulation mit <i>L. lactis</i> G121....	83
Abb. 3.43:	Synergistische Effekte von <i>L. lactis</i> G121 und <i>A. Iwoffii</i> F78.	84
Abb. 4.1:	Mögliche Mechanismen der Allergieprävention.....	96

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1:	Merkmale der T _{Helfer} -Subgruppen.	12
Tab. 1.2:	Differenzierungssignale von DCs für die Polarisierung der T _{Helfer} -Zellen.	19
Tab. 2.1:	Verwendete Plasmide im HEK293-System.	35
Tab. 2.2:	Antikörper für die FACS-Analysen.....	37
Tab. 2.3:	Antikörper für die Western Blots.....	38
Tab. 2.4:	Antikörper und Farbstoffe für die Konfokale Laserscanmikroskopie.....	40
Tab. 2.5:	Verwendete LightCycler®-Programme.....	42
Tab. 2.6:	Verwendete Primer.....	42
Tab. 3.1:	OVA-spezifische Immunglobulinkonzentrationen im Serum.	46
Tab. 3.2:	Anzahl regulierter <i>Probe Sets</i> nach Stimulation mit den verschiedenen Bakterien.	75
Tab. 4.1:	Epidemiologische und experimentelle Befunde für und gegen eine fehlende Immunpolarisierung oder fehlende Immunsuppression.	88

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Debarry, geb. Reiners
Vorname: Jennifer
Geburtstag: 21.11.1978
Geburtsort: Papenburg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

PROMOTION

seit 05/2004 Promotion am Forschungszentrum Borstel,
Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

STUDIUM

10/1998 – 04/2004 **Biologie-Studium** an der Universität Hannover
06/2003 – 04/2004 **Diplomarbeit** am Fraunhofer Institut für Toxikologie
und Experimentelle Medizin in Hannover
Note „sehr gut“
Titel: Die Rolle des Ah Rezeptors in der
transkriptionellen Aktivierung des c-raf Onkogens
5/2003 **mündliche Diplomprüfungen**, Note „sehr gut“

SCHULBILDUNG

08/1991 – 06/1998 **Gymnasium** in Papenburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife mit der Note 2,5
08/1989 – 07/1991 **Orientierungsstufe** in Aschendorf
08/1985 – 07/1989 **Grundschule** in Herbrum

VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalpublikationen

- ♦ J. Debarry, H. Garn, A. Hanuszkiewicz, N. Dickgreber, N. Blümer, E. von Mutius, A. Bufe, S. Gatermann, H. Renz, O. Holst, H. Heine. **(in press)** *Acinetobacter Iwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*
- ♦ J. Debarry, A. Hanuszkiewicz, O. Holst, H. Heine. **(in preparation)** The allergy protective properties of *A. Iwoffii* F78 are imparted by lipopolysaccharide.
- ♦ J. Debarry, A. Hanuszkiewicz, O. Holst, H. Heine. **(in preparation)** Sustained activation and polarization of T_H1 immune responses by the allergy protective cowshed strain *L. lactis* G121.

Ausgewählte Abstracts

- ♦ J. Debarry, H. Garn, A. Hanuszkiewicz, N. Dickgreber, O. Holst, H. Heine. **(2007)** Trying to unravel the farming effect: *Lactococcus lactis* strain G121 isolated from cowsheds possess allergy-protective properties. 5th EAACI GA²LEN Davos Meeting, Davos
- ♦ J. Debarry, N. Dickgreber, A. Hanuszkiewicz, O. Holst, H. Heine. **(2006)** NOD2-dependent activation of human dendritic cells by the gram-positive bacterium *Lactococcus lactis* strain G121. 1th Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris
- ♦ J. Debarry, H. Garn, A. Hanuszkiewicz, O. Holst, H. Heine. **(2006)** Bacterial strains isolated from cow sheds promote T_H1 immune responses. 1th Joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris
- ♦ J. Reiners, Z. Orinska, S. Bulfone-Paus, A.J. Ulmer, H. Heine. **(2005)** Role of tetraspanins in LPS signaling. 1th Spring School on Immunology of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Ettal

Ausgewählte Vorträge

- | | |
|---------|--|
| 03/2007 | 19. Mainzer Allergie-Workshop
<i>Allergy-protective properties of Lactococcus lactis strain G121: importance of intracellular receptors</i> |
| 02/2006 | 4 th EAACI GA ² LEN Davos Meeting, Garmisch-Partenkirchen
<i>Activation of human DCs with bacterial strains isolated from the environment of farmers children directs T_{Helper} cell polarization towards T_H1</i> |
| 11/2005 | 28. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel
<i>Bacterial strains isolated from the environment of farmer children trigger a T_H1-polarizing immune response in human DCs</i>
Auszeichnung "Most Promising Presentation" von BD Biosciences |
| 09/2004 | Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology, Maastricht
<i>Role of tetraspanins CD37 and CD81 in LPS signaling</i> |

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **PD Dr. Holger Heine** für die großartige Betreuung, die immer wieder sehr hilfreichen und konstruktiven Diskussionen sowie für die immer offene Tür herzlich bedanken. Die Arbeitsatmosphäre in deiner Arbeitsgruppe ist nicht zuletzt dank dir einzigartig.

Mein besonderer Dank gilt außerdem **Prof. Dr. A. Jochen Ulmer**, dem ich es zu verdanken habe, dass ich heute überhaupt in Borstel bin. Danke für die Betreuung im ersten Jahr meiner Doktorarbeit und für die vielen nützlichen und förderlichen Diskussionen während der gesamten Zeit.

Den beiden Arbeitsgruppen Angeborene Immunität und Zelluläre Immunologie möchte ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Für die exzellente technische Unterstützung aber auch für viele schöne Stunden im Labor gilt mein ausdrücklicher Dank Frau **Katrin Sprenger** und Frau **Ina Goroncy**. Besonderer Dank gilt auch den „Mädels“ **Elena Andresen**, **Katja Farhat**, **Dr. Sabine Riekenberg**, **Kristina Röschmann** und **Christine Warmbold** für die vielen lustigen Momente, manch schönen Abend, aber auch für viele konstruktive Diskussionen und die Durchsicht meiner Arbeit. Meinen beiden Diplomandinnen Frau **Nina Dickgreber** und Frau **Karina Stein** möchte ich für ihre wertvolle Arbeit aber auch für ihre „Pflegeleichtigkeit“ danken. Nicht zuletzt gilt mein Dank auch Frau **Carola Schneider** und Herrn **Suhad Al-Badri** für die wertvolle Hilfe im Labor. Darüber hinaus möchte ich allen nicht namentlich genannten Azubis und ehemaligen Mitarbeitern der beiden Laborgruppen, die mir im Laufe meiner Zeit in Borstel mit Rat und Tat zu Seite standen meinen Dank aussprechen.

Ohne die hervorragende Arbeit unserer Kooperationspartner wäre vieles nicht möglich gewesen. Danken möchte ich vor allem Frau **Ania Hanuszkiewicz** für die Bereitstellung der Bakterien sowie für die Isolierung und Aufreinigung der Strukturen, Herrn **Prof. Dr. Otto Holst** für die hilfreiche Unterstützung, Frau **Dr. Nicole Blümer** und Herrn **PD Dr. Holger Garn** für die Durchführung der *in vivo*-Experimente sowie Herrn **Dr. Jörg Mages** und Herrn **Dr. Roland Lang** für die Durchführung der Microarray-Analysen.

Frau **Renate Bergmann** und Frau **Erika Kaltenhäuser** danke ich für die Organisation der Blutspende sowie für diverse Elutriationen.

Weiter bedanke ich mich bei Herrn **Dr. Martin Ernst** für die vielen Hilfestellungen am FACS.

Ganz besonderer Dank gilt meiner **Familie** und meinen **Freunden**. Vielen Dank für eure Unterstützung, eure wertvollen Ratschläge, für schöne und abwechslungsreiche Wochenenden und Abende und vor allem für den Rückhalt, den ihr mir gebt.

Matthias, dir danke ich für die wundervollen Jahre, dein Lächeln, für Rom, für deine Aufmunterungen, deine Geduld und dein Verständnis, für die vielen Kilometer auf der Autobahn... Kurzum, danke, dass es dich gibt.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Auszüge dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht bzw. sind bereits veröffentlicht.

Kiel, 30. Mai 2007

Jennifer Debarry