

Technische Universität München

Fachgebiet für Ökoklimatologie

Extrinsische und intrinsische Immunmodulation der allergischen Antwort

Isabelle Beck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Menzel

2. Univ.-Prof. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann

Die Dissertation wurde am 19.09.13 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.06.14 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Poster und Vorträge.....	5
Publikationen.....	7
Abkürzungen.....	8
1 Zusammenfassung.....	11
2 Summary.....	14
3 Einleitung.....	16
3.1 Grundlagen der extrinsischen und intrinsischen Immunmodulation.....	16
3.2 Einteilung und Pathomechanismen allergischer Erkrankungen.....	17
3.3 Gemeinsamkeiten allergischer Erkrankungen mit Autoimmunerkrankungen.....	20
3.4 Allergische Erkrankungen in Abhängigkeit extrinsischer Faktoren.....	20
3.4.1 Hintergrund.....	20
3.4.2 Wirkung Luftschadstoffe auf den Menschen.....	21
3.4.3 Wechselwirkung zwischen Luftschadstoffen und Allergenträger.....	22
3.4.4 Adjuvante Effekte von Pollen.....	24
3.5 Allergische Erkrankungen in Abhängigkeit intrinsischer Faktoren.....	33
3.5.1 Hintergrund.....	33
3.5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	34
3.5.3 Einfluss des Ernährungsstatus.....	42
3.5.4 Sexualhormone und Leptin.....	51
3.6 Bedeutung CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen.....	52
4 Ziel der Studie.....	58
5 Material und Methoden.....	60
5.1 Probandencharakterisierung.....	60
5.2 Birkenphänologie und Pollenaufbereitung.....	60
5.3 Bestimmung atmosphärische Konzentration NO ₂ und Ozon.....	63
5.4 Temperaturmessungen und Urbanisationsindex.....	65
5.5 Generierung und Weiterverarbeitung wässriger Pollenextrakte.....	66
5.6 Isolation und Generierung verschiedener Zellpopulationen.....	67
5.7 Zellassays.....	69
5.8 Prick Test.....	73

5.9	ELISA	73
5.10	Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	74
5.11	Statistische Analysen	74
6	Ergebnisse	76
6.1	Extrinsische Immunmodulation der allergischen Antwort	76
6.1.1	Modulation der Allergenität von Birkenpollen durch Umweltfaktoren	76
6.1.1.1	Charakterisierung der Birken nach verschiedenen Umweltfaktoren	76
6.1.1.2	Kätzchencharakteristika in Abhängigkeit von Umweltfaktoren	78
6.1.1.3	Allergenität in Abhängigkeit vom Reifegrad	79
6.1.1.4	Allergenität in Abhängigkeit von Umweltfaktoren	80
6.1.1.5	Immunmodulatorisches und -stimulatorisches von WPE	83
6.1.2	Immunmodulation durch WPE <3kDA	87
6.1.2.1	Einfluss von WPE auf die humane Mastzelllinie LAD2	87
6.1.2.2	Einfluss von WPE <3kDA auf die allergischen Hautreaktion	88
6.1.2.3	Einfluss von WPE <3kDA auf Basophile Granulozyten	91
6.2	Intrinsische Immunmodulation	93
6.2.1	Wirkung von 17 β -Östradiol, Testosteron und Leptin auf Monozyten	93
6.2.2	Wirkung von 17 β -Östradiol, Testosteron und Leptin auf naive T-Zellen	101
6.2.3	Wirkung von 17 β -Östradiol, Testosteron und Leptin auf memory T-Zellen	108
7	Diskussion	115
7.1	Extrinsische Immunmodulation der allergischen Antwort	115
7.1.1	Modulation der Allergenität des Allergenträgers durch Umweltfaktoren	115
7.1.1.1	Unterschiede in Temperatur und NO ₂ -Konzentration zwischen urbanen und ruralen Birken	115
7.1.1.2	Zusammenhang von Kätzchencharakteristika und Umweltfaktoren	117
7.1.1.3	Abhängigkeit des Bet v 1- und PALMs-Gehalts vom Reifegrad	121
7.1.1.4	Zusammenhang des Bet v 1-Gehalts mit Ozonkonzentration und Temperatur	122
7.1.1.5	Zusammenhang des Adenosingehalts mit Umweltfaktoren	127
7.1.1.6	Zusammenhang des PALMs-Gehalts mit Umweltfaktoren	128
7.1.1.7	Verändertes immunstimulatorisches und –modulatorisches Potential „Hoch-Ozon“ belasteter Pollen	133
7.1.1.8	Klimawandel und Allergie	139
7.1.2	Immunmodulation durch WPE <3kDA	141
7.1.2.1	Aggravation der Aktivierung der Mastzelllinie LAD2 durch WPE	142
7.1.2.2	Aggravierende Wirkung von WPE <3kDA auf die allergische Hautreaktion	143
7.1.2.3	Verstärkte Aktivierung Basophiler Granulozyten durch WPE <3kDA	147
7.2	Intrinsische Immunmodulation	149
7.2.1	Immunstimulatorische Wirkung von 17 β -Östradiol auf Monozyten	150

7.2.2	Synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin in Monozyten.....	162
7.2.3	Verändertes Zytokinprofil in naiven T-Zellen durch 17 β -Östradiol und Testosteron.....	166
7.2.4	Verändertes Zytokinprofil in naiven T-Zellen durch Leptin	169
7.2.5	Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils in memory T-Zellen durch 17 β -Östradiol.....	172
7.2.6	Verändertes Zytokinprofil in memory T-Zellen durch Leptin.....	177
7.3	Bedeutung der Analyse extrinsischer und intrinsischer immunmodulatorischer Faktoren.....	183
8	Literatur	186
9	Anhang.....	211
9.1	Reagenzien.....	211
9.2	Antikörper und ELISA Kits.....	213
9.3	Verbrauchsmaterialien.....	214
9.4	Medien	215
9.5	Geräte.....	216

Poster und Vorträge

Poster

In vivo analysis of adjuvant effects of a low molecular-weight, non-protein fraction of aqueous birch pollen extracts

Isabelle Beck, Stefanie Gilles, Mareike McIntyre, Liliana Cifuentes, Renate Effner, Heidrun Behrendt, Philippe Schmitt-Kopplin, Carsten Schmidt-Weber, Claudia Traidl-Hoffmann

XXXIX. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V., Marburg, 1.-3. März 2012

Vorträge

Impact of urbanisation on the allergenicity of birch pollen grains

Isabelle Beck, Stefanie Gilles, Johannes Ring, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann
Allergo J 2010; 19 (1): 29

22. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 11.-12. March 2010

Allergenicity and pollen characteristics of birch trees in urban and rural environment

Isabelle Beck, Susanne Jochner, Stefanie Gilles, Annette Menzel, Johannes Ring, Heidrun Behrendt, Carsten Schmidt-Weber, Claudia Traidl-Hoffmann

6. Deutscher Allergie-Kongreß, Wiesbaden, 8.-10. September 2011

In vivo analysis of adjuvant effects of a low molecular-weight, non-protein fraction of aqueous birch pollen extracts

Isabelle Beck, Stefanie Gilles, Mareike McIntyre, Liliana Cifuentes, Renate Effner, Heidrun Behrendt, Philippe Schmitt-Kopplin, Carsten Schmidt-Weber, Claudia Traidl-Hoffmann

XXXIX. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V., Marburg, 1.-3. März 2012

Impact of environmental factors on the allergenicity of birch pollen

Isabelle Beck, Susanne Jochner, Stefanie Gilles, Mareike McIntyre, Jeroen Buters, Johannes Ring, Annette Menzel, Carsten Schmidt-Weber, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

Allergo J 2012; 21 (1): 50

24. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 22.-23. March 2012

Influence of environmental factors on the allergenic potential of birch pollen

Isabelle Beck, Susanne Jochner, Stefanie Gilles, Mareike McIntyre, Jeroen Buters, Johannes Ring, Annette Menzel, Carsten Schmidt-Weber, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann

EAACI Congress, Genf, Schweiz, 16.-20. Juni 2012

In vitro and in vivo analysis of adjuvant effects of a low molecular-weight fraction of aqueous birch pollen extracts

Isabelle Beck, Stefanie Gilles, Mareike McIntyre, Liliana Cifuentes, Renate Effner, Heidrun Behrendt, Johannes Ring, Philippe Schmitt-Kopplin, Carsten Schmidt-Weber, Claudia Traidl-Hoffmann

Allergo J 2012; 21 (1): 16

7. Deutscher Allergie-Kongreß, München, 11.-13. Oktober 2012

Influence of sex hormones and leptin on monocytes and CD4+ T cells

Isabelle Beck, Carsten Schmidt-Weber, Killian Eyerich, Wenchieh Chen, Claudia Traidl-Hoffmann

Allergo J 2013; 22 (1): 52

25. Mainzer Allergieworkshop, Mainz, 7. -8. März 2013

Publikationen

Veröffentlichte Publikationen

Chen W, Beck I, Schober W, Brockow K, Effner R, Buters JT, Behrendt H, Ring J. (2010) Human mast cells express androgen receptors but treatment with testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited by neuromuscular blocking agents. *Exp Dermatol*. 19(3):302-4

Gilles S, Fekete A, Zhang X, Beck I, Blume C, Ring J, Schmidt-Weber C, Behrendt H, Schmitt-Kopplin P, Traidl-Hoffmann C (2011) Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses. *J Allergy Clin Immunol*, 454-461

Jochner S, Beck I, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Menzel A (2011) Effects of extreme spring temperatures on urban phenology and pollen production: a case study in Munich and Ingolstadt. *Clim Res*, 49: 101–112

Jochner S, Höfler J, Beck I, Göttlein A, Ankerst DP, Traidl-Hoffmann C, Menzel A (2013) Nutrient status: a missing factor in phenological research? *J Exp Bot*, 64(7), 2081-2092.

Eingereichte Publikationen

Beck I, Jochner S, Gilles S, McIntyre M, Buters JTM, Schmidt-Weber C, Behrendt H, Ring J, Menzel A, Traidl-Hoffmann C (2013) High environmental ozone levels lead to enhanced allergenicity of birch pollen. Submitted to PLoS ONE.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADO	Adenosin
AK	Antikörper
CCL	C-Chemokin Ligand
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	„Cluster of Differentiation“
Cpm	counts per minute
CTL	cytotoxischer T Lymphozyt
CXCL	CX-Chemokine-Ligand
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	“Dulbeccos modified eagle medium”
DZ	dendritische Zelle
E1	Östron
E2	17 β -Östradiol
E3	Östriol
EAE	“experimental autoimmune encephalitis”
EDTA	Ethylendiamintetraacetate
ELISA	“enzyme linked immuno absorbent assay”
FACS	“fluorescent associated cell sorter”
Fc ϵ RI	hoch-affiner IgE Rezeptor
Fc ϵ RII	niedrig-affiner IgE Rezeptor
FCS	“fetal bovine serum”
FGF	“fibroplast growth factor”
Foxp3	“forkhead box P3”
gep. T-T.	gepaarter T-Test
GM-CSF	“granulocyte macrophage stimulating factor”
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H	hour
HLA	“human leukocyte antigen”
HU-DC	“human dendritic cell medium”
ICAM-1	“intercellular adhesion molecule 1”
IDO	“indoleamine 2,3-dioxygenase”

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IGF	“insulin growth factor”
IGFR	“insulin growth factor receptor”
IL	Interleukin
IL	Interleukin
kDA	Kilo Dalton
L	Leptin
LPS	Lipopolysaccharid
M. W.	Mann Whitney Test
MACS	“magnetic cell sorting”
MHC	“major histocompatibility complex”
min	Minute
ml	Milliliter
MoDZ	aus Monozyten generierte Dendritische Zelle
NAD ⁺	Nicotinamide-Adenine-Dinukleotide
NFAT	“transcription factor nuclear factor of activated T cells”
NFκB	“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”
NK Zelle	natürliche Killerzellen
NLRP	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
NOD	“nuclear oligomerization domain”
O ₃	Ozon
P.	Pearson Korrelation
PALM	Pollen-assoziierte Lipidmediatoren
PAMP	“pathogen-associated molecular pattern”
PBMZ	periphere Blut Mononukleäre Zellen
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Proliferations Index
PKA	Protein Kinase A
PL	Phospholipase
PM	“pariculate matter”
RA	Rheumatoide Arthritis
SO ₂	Schwefeldioxid
Sp.	Spearman Korrelation
StAR	“steroidogenic acute regulatory protein”

STAT	“signal transducers and activators of transcription”
Syk	„spleen tyrosine kinase“
T	Testosteron
TCR	T Zell Rezeptor
TF	Transkriptions Faktor
TGF- β	“transforming growth factor β “
Th	T-Helferzelle
Th3	regulatorische T-Zelle vom Typ 3
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tr1	regulatorische T-Zelle vom Typ 1
Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zelle
TSLP	“Thymic Stromal Lymphopoietin”
U	„unit“
UI	Urbanisations Index
W.V.R.T.	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
WPE	wässriger Pollenextrakt

1 Zusammenfassung

Die Allergie ist definiert als eine „spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“. Die Ursachen, welche zu dieser fehlgeleiteten Immunreaktion gegen eigentlich harmlose Antigene führen, sind bislang unklar. Extrinsische als auch intrinsische Faktoren werden diskutiert, welche die allergische Immunantwort beeinflussen können und deren Zusammenwirken die Suszeptibilität eines Individuums für die Entwicklung und Ausprägung allergischer Erkrankung beeinflusst. Die vorliegende Studie hat zum Ziel extrinsische und intrinsische immunmodulatorische Faktoren im Hinblick auf allergische Erkrankungen näher zu charakterisieren.

Der erste Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die extrinsische Immunmodulation durch Pollen. Insbesondere geht es um die Frage, inwieweit die zunehmende Urbanisierung Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften von Pollen nimmt. In den letzten Dekaden lässt sich eine stetige Zunahme der Soforttyp-Allergie beobachten. Studien konnten zeigen, dass die zunehmende Urbanisierung mitverantwortlich für diesen Trend ist. Erhöhte Schadstoffexposition übt eine direkte Wirkung auf den Menschen aus und kann so in suszeptiblen Individuen die Allergieentstehung begünstigen. Pollen gehören zu den häufigsten Auslösern einer Typ 1 Allergie. Unzureichend untersucht ist allerdings bislang wie die veränderten Umweltbedingungen der Urbanisierung den Allergenträger selbst beeinflussen. In dieser Studie wird daher die Frage bearbeitet, ob und inwieweit die Urbanisierung ebenfalls den Allergenträger beeinflusst und zu veränderten Eigenschaften mit erhöhter Allergenität führt. Da Städte aufgrund ihrer Umweltbedingungen (höhere Temperatur, Schadstoffe) als Modell für zukünftige Bedingungen gesehen werden können, geben unsere Ergebnisse ebenfalls Aufschluss über zukünftige Veränderungen hinsichtlich der Pollinosis, die im Zuge des Klimawandels stattfinden werden. In unserer Studie machen wir Gebrauch von einem breit angelegten Untersuchungsnetzwerk mit Temperatur- und Schadstoffmessungen entlang eines Urbanisierungsgradienten in München. Um ein besseres Verständnis der Immunreaktion auf den Pollen zu gewinnen, werden im ersten Teil dieser Arbeit zudem die immunmodulatorischen Wirkungen Allergen-unabhängiger Faktoren aus Pollen auf die Sofortreaktion untersucht.

Unsere Untersuchungen von Birkenpollen in ihrem natürlichen Umfeld identifizierten Ozon als maßgeblichen Einflussfaktor auf die Allergenität. Die Ergebnisse dieser Studie deuten auf eine Zunahme der Pollenallergenität durch Ozon und einen Einfluss der Urbanisierung auf den Allergenträger hin. Hohe Ozonkonzentrationen stehen hierbei im Zusammenhang mit höheren Gehalten des Majorallergens Bet v 1, einer veränderten Lipidzusammensetzung und einer stärkeren immunstimulatorischen Kapazität. Sollte es im Zuge des Klimawandels

sowie der zunehmenden Urbanisierung zu steigenden Ozonkonzentrationen kommen, ist ebenfalls mit einer erhöhten Allergenität des Pollens zu rechnen. Eine detaillierte Analyse der Wirkung von Ozon auf die Allergenität von Pollen könnte helfen, zukünftige Entwicklungen hinsichtlich der Pollinosis abzuschätzen und Therapie- sowie präventive Strategien zu entwickeln.

Ferner zeigt der erste Teil dieser Arbeit, dass nicht-Allergene Substanzen aus Pollen zu einer Aggravation der allergischen Sofortreaktion führen. Als möglicher verantwortlicher Faktor aus Pollen konnte Adenosin identifiziert werden. Die gewonnenen Ergebnisse zu nicht-allergenen Substanzen aus Pollen verbessern das Verständnis der Immunreaktion auf den Pollen und unterstreichen die Analyse weiterer Allergen-unabhängiger Faktoren zur Bestimmung der Pollen-Allergenität.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit eine intrinsische Immunmodulation durch die Sexualhormone 17β -Östradiol und Testosteron sowie das Adipokin Leptin stattfindet. Es soll geklärt werden, inwieweit diese Hormone mitverantwortlich für Prävalenzunterschiede zwischen den Geschlechtern in allergischen Erkrankungen sind. Hierbei wird ein besonderes Augenmerk auf die Option synergistischer Effekte von Sexualhormonen und Adipokinen gelegt.

Die Analysen weisen darauf hin, dass 17β -Östradiol eine proinflammatorische Wirkung auf sowohl Monozyten als auch T-Zellen hat. Eine Stimulation unter 17β -Östradiol-Inkubation führte in beiden Zelltypen zur Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils, gekennzeichnet durch eine verminderte IL-10 und verstärkte GM-CSF Sekretion. In memory T-Zellen ließ sich zusätzlich die Induktion sowohl Th1- als auch Th2-spezifischer Zytokine beobachten. Parallel deutete das Zytokinprofil der naiven- als auch memory T-Zellen auf die Induktion pathogener Th17-Zellen durch 17β -Östradiol hin. Diese Beobachtungen geben deutliche Hinweise auf eine Beteiligung der Sexualhormone an den unterschiedlichen Immunantworten zwischen den Geschlechtern. Ferner wurden in dieser Studie synergistische Wirkungen von 17β -Östradiol und Leptin auf Monozyten beobachtet. Synergistische Effekte von Leptin und 17β -Östradiol in der Induktion einer innate Immunantwort, mit niedrigeren IL-10 und höheren GM-CSF Konzentrationen, könnten somit ebenfalls mitverantwortlich für die gesteigerte Immunantwort des weiblichen Geschlechts sein. Einige Effekte, wie sie für Leptin beschrieben sind, wurden in dieser Studie nicht, oder nur unter Koinkubation mit 17β -Östradiol, beobachtet. Angenommen werden kann, dass Leptin in seiner Wirkung von Kofaktoren, u. a. 17β -Östradiol abhängig ist und möglicherweise differenzierte Wirkungen in Männern und Frauen sowie in Abhängigkeit des Mikromillieus hat.

Die Ergebnisse dieser Studie verbessern das Verständnis für Mechanismen der extrinsischen als auch intrinsischen Immunmodulation. Es wird deutlich, dass das Immunsystem sowohl von Umweltfaktoren als auch durch körpereigene Botenstoffe in der Art der Immunreaktion

beeinflusst wird. Weitere differenzierte Analysen könnten an einer verbesserten individuellen Risikoabschätzung für allergische Erkrankungen, unter paralleler Berücksichtigung extrinsischer als auch intrinsischer Faktoren, mitwirken und helfen, neue Therapie- als auch präventive Strategien zu entwickeln.

2 Summary

Allergy is defined as a specific alteration of the immune status leading to a pathological hypersensitivity reaction. The causes leading to this inappropriate immune reaction against usually harmless antigens remain largely unclear. Extrinsic and intrinsic factors are discussed which influence the allergic immune response and whose interaction influences the individual susceptibility to the development and outcome of allergic diseases. The aim of the current study is to characterize extrinsic and intrinsic immune modulatory factors associated with allergic diseases.

The first part of this work focuses on extrinsic immune modulation caused by pollen and the question to which extent the immune modulatory properties of pollen are influenced by increasing urbanisation. The incidence of allergic diseases due to type I hypersensitivity has been steadily increasing in the last decades. Several studies demonstrated that urbanisation is jointly responsible for this trend. Amongst others, elevated exposure to pollutants can promote the development of allergic disease via a direct impact on susceptible individuals. Pollen is a common elicitor of type I allergic diseases. Up to date it is poorly understood how changing environmental conditions caused by urbanisation influence this relevant allergen carrier itself. It is highly interesting to know if urbanisation can likewise influence the allergen carrier thus leading to modified properties of pollen with a potentially higher allergenicity. Since cities can be regarded as harbingers of future climate, our study will help to understand how pollinosis may alter in the light of a changing climate. To obtain a better understanding of the pollen-induced immune response, allergen-independent immune modulatory properties of pollen on the immediate type immune reaction are investigated. Birch trees were monitored along an urbanisation gradient in Munich and its surrounding and pollen was respectively harvested from urban and rural trees.

Our study on birch pollen in their natural environment revealed ozone as a prominent factor influencing the allergenicity of pollen. Our findings show an increase of pollen allergenicity induced by ozone, indicating an influence of urbanisation on the allergen carrier. Higher ozone concentrations were related to a higher content of pollen allergen (Bet v 1), an altered lipid composition and a higher immune stimulatory capacity. In case of rising ozone concentrations due to climate change and increasing urbanisation, a higher allergenicity of pollen can be expected. Detailed analysis of the impact of ozone on the allergenicity of pollen could help to predict future trends and develop both therapeutic and preventive strategies concerning pollinosis. Moreover, this work has shown that non-allergenic compounds of pollen could aggravate the immediate type allergic reaction, in which adenosin was identified as a potential responsible factor in pollen. Findings concerning non-allergenic pollen compounds

improve our understanding of the immune reaction directed against pollen and highlight the analysis of allergen-independent factors in determination of pollen allergenicity.

The second part of this study deals with the question to which extent the sex hormones 17 β -estradiol and testosterone, and the adipokine leptin have intrinsic immune modulatory properties. It should be clarified how these hormones might be jointly responsible for differences in the prevalence of allergic diseases between the sexes. In addition, synergistic effects between sex hormones and adipokines were investigated.

Our data demonstrated a proinflammatory effect of 17 β -estradiol on monocytes as well as on T cells. Stimulation in the presence of 17 β -estradiol caused a proinflammatory cytokine profile in both cell types, characterized by a lower IL-10 and a higher GM-CSF secretion. Moreover, an induction of Th1 and Th2 specific cytokines could be observed in memory T cells. The cytokine profile of naïve and memory T cells indicated the induction of pathogenic Th17 cells by 17 β -estradiol. This is a hint of an involvement of sex hormones in the different immune responses between the sexes. Furthermore synergistic effects of leptin and 17 β -estradiol could be observed in monocytes. Thus synergistic effects of leptin and 17 β -estradiol in the induction of an innate immune response, characterized by lower IL-10 and higher GM-CSF concentrations in monocytes, could be jointly responsible for the enhanced immune status of the female sex. Certain effects described for leptin could not be observed or were just observed in co-treatment with 17 β -estradiol in this study. It could be hypothesized that the effect of leptin depends on cofactors (e.g. 17 β -estradiol) and may exert potentially differential effects in men and women and depending on the microenvironment.

In conclusion, our findings help us to gain a better understanding of mechanisms of extrinsic and intrinsic immune modulation. These results demonstrate that the immune system is influenced by environmental factors as well as by endogenous messengers in the type of immune response. Further differential analyses could contribute to an improved individual risk assessment of allergic diseases, by simultaneous consideration of extrinsic and intrinsic factors and could help to develop both new preventive and therapeutic strategies.

3 Einleitung

3.1 Grundlagen der extrinsischen und intrinsischen Immunmodulation

Die Allergie ist eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit (Ring 2004). Bislang ist unklar, was die Ursachen für diese fehlgeleitete Immunreaktion sind. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, sowohl extrinsische als auch intrinsische Faktoren mit Einfluss auf die allergische Immunreaktion zu analysieren.

Im ersten Teil wurde die Immunmodulation durch Pollen, sowie der Einfluss der Urbanisierung auf die immunogenen Eigenschaften von Pollen untersucht. Allergische Erkrankungen stellen ein zunehmendes Problem der heutigen Zeit dar. Studien konnten zeigen, dass die zunehmende Urbanisierung mitverantwortlich für die steigende Prävalenz dieser Erkrankung in den Industrieländern ist. Diskutiert wird ein Einfluss der Urbanisierung auf susceptible Individuen, welcher die Entstehung allergischer Erkrankungen begünstigt [1]. Die Frage, die sich stellt, ist, ob die veränderten Umweltbedingungen der Urbanisierung zudem Einfluss auf den Allergenträger nehmen und dessen Allergenität beeinflussen und in dieser Weise ebenfalls zur erhöhten Allergieprävalenz beitragen. Einen Allergenträger, welcher in besonderem Maß diesen veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt ist, stellt der Pollen dar, aber auch die den Pollen produzierenden allergenen Pflanzen.

Der erste Teil dieser Studie sollte die Frage klären, ob durch die zunehmende Urbanisierung eine Veränderung des Allergenträgers statt findet, welcher zu einer verstärkten Allergenität des Pollens beiträgt. Des Weiteren sollten Allergen-unabhängige Faktoren aus Pollen und deren Wirkung in der Sofortreaktion der allergischen Typ 1 Reaktion näher analysiert werden.

Die Immunantwort wird hingegen nicht nur von extrinsischen Faktoren beeinflusst, auch intrinsische, endogene immunmodulatorische Faktoren werden diskutiert. Hierzu gehören u. a. Sexualhormone und Adipokine.

Im zweiten Teil wurden die intrinsischen immunmodulatorischen Eigenschaften der Sexualhormone 17β -Estradiol und Testosteron sowie des Adipokins Leptin analysiert. Aufgrund veränderter relativer Risiken allergischer Erkrankungen in Abhängigkeit des Geschlechtes als auch in Abhängigkeit des Ernährungsstatus sind diese Hormone als intrinsische immunmodulatorische Faktoren in den Vordergrund gerückt. Es sollte geklärt werden, inwieweit diese Hormone eigenständige Risikofaktoren für allergische Erkrankungen darstellen und die Immunantwort beeinflussen.

Zum verbesserten Verständnis der Arbeit werden im Folgenden zunächst die allgemeinen Grundlagen allergischer Erkrankungen erläutert. Zudem wird die bestehende Literatur zum Einfluss der Urbanisierung auf den Pollen als auch die Immunmodulation durch Pollen kurz vorgestellt. Darüber hinaus wird die Datenlage allergischer Erkrankungen in Abhängigkeit von Geschlecht als auch Adipositas aufgeführt und Zusammenhänge und Wirkungen der Sexualhormone als auch Adipokine auf das Immunsystem erläutert. Abschließend wird das Konzept der T-Helfersubzellpopulationen vorgestellt, welche eine herausragende Bedeutung in der Regulation der Immunantwort einnehmen.

3.2 Einteilung und Pathomechanismen allergischer Erkrankungen

Allergische Erkrankungen gehören zu den Überempfindlichkeitsreaktionen [2] und stellen ein bedeutendes Gesundheitsproblem mit erheblichen volkswirtschaftlichen Kosten dar [1, 3]. Sie sind jedoch kein auf die heutige Zeit beschränktes Phänomen. Die ersten Aufzeichnungen zu allergischen Symptomen lassen sich bereits in Schriften aus dem alten Rom finden, in denen die Symptome der Rhinokonjunktivitis, des Asthma bronchiale sowie des atopischen Ekzems beschrieben wurden [4]. Eine Definition sowie Systematisierung verschiedenster allergischer Erkrankungen wie der Anaphylaxie oder des Heuschnupfens fand allerdings erst weitaus später, im 19. und 20. Jahrhundert, statt. Der Begriff Allergie selbst wurde schließlich durch die zwei Wiener Pädiatrer Clemens von Pirquet und Bela Schick im Jahre 1906 geprägt. Sie definierten die Allergie als eine „spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus nach Allergenkontakt“ [5]. 1995 wurde der Begriff schließlich von Johannes Ring erneut definiert. Nach Ring (1995) ist die Allergie eine „spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“ [6].

Die Allergie umfasst dabei verschiedene immunologische Erkrankungen. Nach Coombs und Gell werden diese in vier Typen eingeteilt [7]. Die Einteilung erfolgt hierbei anhand der Art der zugrundeliegenden Immunreaktion sowie dem Effektormechanismus, welcher für die Überempfindlichkeitsreaktion verantwortlich ist (Tab. 1) [8]. Gemein ist allen vier Typen eine krankmachende Immunreaktion auf normalerweise harmlose exogene Substanzen [8, 9].

Tabelle 1: Einteilung der Allergietypen 1 – 4 nach Combs und Gell und assoziierte Erkrankungen [7, 10]

	Pathogenese	Auftreten Symptomatik nach Exposition	Krankheitsbilder (Beispiele)	Antikörper
Typ 1	IgE-Bildung IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung aus Mastzellen	Frühreaktion: Sekunden - Minuten Spätreaktion: ca. 6 h	Heuschnupfen, Urtikaria, allergisches Asthma	IgE-vermittelt
Typ 2	zellzerstörende (zytotoxische) Antikörper Komplementaktivierung	6 -12 h	Hämolytische Anämie, allergische Aggranulomatose	Zytotoxische Antikörper der Klassen IgG, IgM
Typ 3	Zirkulierende Immunkomplexe Komplementsystem	6 -12 h	Vaskulitis, Serumkrankheit	hauptsächlich durch IgG vermittelt
Typ 4	durch sensibilisierte T-Lymphozyten	24 h – mehrere Tage	Kontaktexzem	Keine (zellvermittelt)

Typ 1

Im heutigen Sprachgebrauch wird unter dem Begriff Allergie meist die Typ 1 Allergie verstanden. Die Typ 1 Allergie ist eine Soforttypreaktion, welche nach vorrangegangener Sensibilisierung innerhalb von wenigen Sekunden bis Minuten zu Symptomen führt. Krankheitsbilder, die in diese Kategorie fallen, sind u. a. die allergische Konjunktivitis, die allergische Rhinitis, das allergische Asthma sowie die Nesselsucht [11, 12].

Der Pathomechanismus der Typ 1 Allergie kann in zwei Phasen eingeteilt werden - die Sensibilisierungsphase und die Auslösephase [13]. Beim Erstkontakt mit dem Allergen findet eine sogenannte Sensibilisierung statt. Hierbei wird das Allergen von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, prozessiert und über den MHCII-Komplex naiven T-Zellen präsentiert. Diese differenzieren daraufhin zu Th2-Zellen, welche in B-Zellen über IL-4 den Isotypwechsel zu IgE stimulieren [13]. Die gebildeten IgE-Antikörper (AK) binden in Folge an FCε-Rezeptoren von im Gewebe lokalisierten Mastzellen. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen findet eine Quervernetzung der an die Mastzelle gebundenen IgE-AK durch das Allergen statt. Dies führt zur Aktivierung der Mastzelle mit Ausschüttung von Mediatoren, gefolgt von den typischen Symptomen der Soforttypallergie. Dies wird als Auslösephase bezeichnet [13].

Die Auslösephase kann abermals in zwei Phasen eingeteilt werden, eine Frühphase und eine Spätreaktion. In der Frühphase findet die Ausschüttung kurzlebiger Mediatoren wie Histamin statt. Die Spätreaktion ist gekennzeichnet durch die Produktion und Sekretion von Leukotrienen, Zytokinen und Chemokinen, gefolgt von der Rekrutierung verschiedener Leukozyten, zu denen Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Th2-Zellen gehören [9, 11-13].

Typ 2

Bei allergischen Erkrankungen des Typ 2 sind IgM- oder IgG-Antikörper gegen Zelloberflächen- und Matrixantigene gerichtet. Die Zellzerstörung findet hierbei primär durch die Aktivierung des Komplementsystems statt [14]. Beispiele für allergische Erkrankungen vom Typ 2 sind die hämolytische Anämie und die allergische Agranulomatose [8].

Typ 3

Allergische Erkrankungen des Typ 3 sind ebenfalls IgG-abhängig. Hierbei werden jedoch Antikörper gegen lösliche Antigene (AG) gebildet, was zur Bildung von AG-AK-Komplexen führt. Bilden sich diese Komplexe in hohen Konzentrationen und können nicht mehr entsprechend geklärt werden, findet eine Ablagerung im Gewebe statt. Dies führt zu einer Komplement- und FcR-vermittelten Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Die pathologischen Eigenschaften der Krankheit sind hierbei weniger von der Quelle des AGs abhängig als vielmehr vom Ort der Deposition der Immunkomplexe. Hierbei können multiple Organe und Gewebe betroffen sein, wobei Niere und Gelenke besonders anfällig sind. Typische Erkrankungen sind die Vaskulitis oder die Serumkrankheit [8].

Typ 4

Allergische Erkrankungen des Typ 4 werden von T-Zellen vermittelt. Die Gewebeerstörung wird hierbei durch Zytokine von hauptsächlich Th1- und Th17-Zellen und die Zellyse durch cytotoxische Lymphozyten (CTL) vermittelt. Die typische T-Zell-vermittelte Reaktion ist eine Spättyp-Reaktion, welche durch Aktivierung von T-Zellen und Produktion von Zytokinen induziert wird. Diese rekrutieren und aktivieren Leukozyten, primär Makrophagen. Zu den allergischen Erkrankungen des Typ 4 gehören u. a. das Kontaktekzem [8].

3.3 Gemeinsamkeiten allergischer Erkrankungen mit Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen gehören wie die allergischen Erkrankungen zu den Überempfindlichkeitsreaktionen und sind ähnlich allergischen Erkrankungen pathologisch fehlgeleitete Immunreaktionen gegen eigentlich harmlose Antigene [2]. Gegenteilig zu allergischen Erkrankungen wird die Immunreaktion hingegen nicht durch exogene Faktoren ausgelöst, sondern durch endogene körpereigene Strukturen [2].

Die Einteilung erfolgt entsprechend allergischen Erkrankungen ebenfalls anhand der Art der zugrundeliegenden Immunreaktion sowie dem Effektormechanismus.

Der IgE vermittelte Typ 1 existiert bei Autoimmunerkrankungen nicht. Ansonsten finden sich dieselben Typen 2-3, welche ebenfalls bei allergischen Erkrankungen gefunden werden können (Tab. 2). Beispiele für Autoimmunerkrankungen sind die Pemphigus vulgaris, der Systemische Lupus Erythematoses oder die Multiple Sklerose [2].

Tabelle 2: Einteilung von Autoimmunerkrankungen und assoziierte Erkrankungen

	Pathogenese	Krankheitsbilder (Beispiele)	Antikörper
Typ 2	zellerstörende (zytotoxische) Antikörper Komplementaktivierung	Pemphigus vulgaris, Autoimmunhämolytische Anämie	Zytotoxische Antikörper der Klassen IgG, IgM
Typ 3	Zirkulierende Immunkomplexe Komplementsystem	Systemischer Lupus Erythematoses	hauptsächlich durch IgG vermittelt
Typ 4	durch sensibilisierte T-Lymphozyten	Multiple Sklerose	keine (zellvermittelt)

3.4 Allergische Erkrankungen in Abhängigkeit extrinsischer Faktoren

3.4.1 Hintergrund

Allergische Erkrankungen, insbesondere die Typ 1 Allergie, stellen ein zunehmendes Problem der heutigen Zeit dar [15]. Hierbei konnte eine deutliche Zunahme dieser Allergieform in den letzten Dekaden beobachtet werden [16], ein Trend welcher sich nicht für allergische Erkrankungen des Types 2-4 beobachten ließ [1]. Bereits bis zu 30% der Bevölkerung in den Industrieländern sind von einer Typ 1 Allergie betroffen [17]. Diskutierte Ursachen für die stetige Zunahme sind veränderte Lebensgewohnheiten sowie das Fehlen protektiver immu-

stimulierender Faktoren [1]. Gleichzeitig wird die Zunahme anthropogener Schadstoffe aus Verkehr und Industrie, mit Wirkung auf Mensch und Allergenträger, mitverantwortlich gemacht [1, 18-20].

3.4.2 Wirkung Luftschadstoffe auf den Menschen

Schadstoffbelastung wird in zwei Typen eingeteilt, wobei lediglich die Typ 2 Schadstoffbelastung mit der zunehmenden Allergieprävalenz in Verbindung gebracht wird. Schadstoffbelastung vom Typ 1 ist gekennzeichnet durch hohe Schwefeldioxid (SO₂)-Konzentrationen mit groben Staubpartikeln, wie sie in Teilen der ehemaligen DDR vorlag [1, 19]. Schadstoffbelastung vom Typ 2 findet sich in hoch popularisierten Industrienationen in der westlichen Welt und wird von Innen- und Außenquellen emittiert [1].

Während die Typ 1 Schadstoffbelastung keine bis geringe Assoziation mit der Allergieentstehung zeigt, wird eine positive Assoziation zu Infektionen und inflammatorischen Erkrankungen des oberen Respirationstraktes festgestellt [19]. Eine vergleichende Studie zu Kindern aus Ost- und Westdeutschland beschreibt sogar eine inverse Beziehung von SO₂-Belastung und Allergien [21].

Im Gegensatz dazu stehen NO₂, Ozon, VOCs, Passivrauch sowie feine und ultrafeine Partikel aus KFZ-bedingten Emissionen und Emissionen aus dem Innenraum. Diese werden als adjuvante Faktoren in der Allergieentstehung (Typ 1) diskutiert [19]. *In vitro* als auch *in vivo* Versuche und Beobachtungen geben hier Hinweise auf adjuvante und aggravierende Wirkung in Sensibilisierungs- und Auslösephase der allergischen Soforttypreaktion. *In vivo* Untersuchungen zu den Schadstoffen NO₂ und Ozon konnten zeigen, dass Exposition von Allergikern mit diesen Schadstoffen zu einem Anstieg inflammatorischer Zellen in der Nasenspülflüssigkeit führt [22, 23]. *In vitro* konnte eine durch Sauerstoffradikalbildung bedingte Störung der Membranintegrität mit Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch NO₂ und Ozon festgestellt werden [24, 25]. Für Passivrauch wurde die Induktion eines Th2-assoziierten Zytokinmilieus und die Produktion von allergenspezifischem IgE beobachtet [19, 26]. Weiter geben Expositionsstudien klare Evidenzen für die Verstärkung symptomatischer Beschwerden durch Passivrauch. In Schwangerschaft und Stillzeit stellt Passivrauch einen maßgeblichen Risikofaktor für die allergische Sensibilisierung dar [27, 28]. Von besonderer Bedeutung als adjuvante Faktoren mit Wirkung in Sensibilisierungs- und Auslösephase der Allergie sind zudem partikuläre Schwebstäube, hier insbesondere Dieselrußpartikel. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Dieselrußpartikeln mit Allergenen einen Isotypswitch zu IgE in der nasalen Schleimhaut begünstigt. Zudem wurde eine Sensibilisierung auf Neoantigene in Richtung einer Th2-Antwort und ein starker Anstieg der IL-4 Produktion in der Mukosa durch Dieselrußpartikel festgestellt. Auch eine Aggravation der

lokalen Schleimhautentzündung sowie eine verstärkte allergeninduzierte Freisetzung von Histamin aus Mastzellen durch Dieselrußpartikel wurde postuliert [26, 29-33].

Zusammenfassend besteht Evidenz dafür, dass anthropogene Luftschadstoffe über Wirkung auf den Menschen zumindest in Teilen mitverantwortlich für den stetigen Anstieg allergischer Erkrankungen in Industrienationen gemacht werden können.

3.4.3 Wechselwirkung zwischen Luftschadstoffen und Allergenträger

Neben einer direkten Wirkung anthropogener Schadstoffe auf den Menschen wird gleichzeitig eine Wechselwirkung entsprechender Schadstoffe mit dem Allergen und Allergenträger beschrieben, welcher ebenfalls Einfluss auf die allergische Sensibilisierung sowie Symptomatik nimmt (Tab. 3).

Zu den diskutierten Mechanismen gehören hier u. a. Nitrierungsreaktionen von Allergenen, Bildung von allergenhaltigen Aerosolen als auch veränderte Allergengehalte und -bioverfügbarkeiten durch Schadstoffe.

U. a. konnte gezeigt werden, dass Ozon und NO_2 zu einer Nitrierung von Proteinen, auch dem Birkenpollenallergen Bet v 1 führen [34]. Dies wiederum begünstigte eine Sensibilisierung im Tiermodell und trug zu einer verstärkten Immunantwort mit höher IgE- und Zytokinproduktion bei [35]. Zudem konnten bei allergischen Patienten höhere Konzentrationen von spezifischem funktionalem IgE gegen nitriertes Bet v 1 als gegen nicht-nitriertes Bet v 1 gefunden werden [35], was einen Hinweis auf eine stärkere Allergenität nitrierter Proteine gibt.

Untersuchungen von Behrendt et al. (1997) beschreiben, dass auch die Bioverfügbarkeit von Allergenen aus Pollen durch Schadstoffe beeinflusst werden kann. Die Autoren stellten fest, dass NO_2 und SO_2 die Bioverfügbarkeit von Allergenen aus Gräserpollen reduzieren, wässrige Schwebstaubextrakte hingegen zu morphologischen Veränderungen der Pollenoberfläche mit vermehrten Austritt allergenhaltiger Proteine führen [10, 36].

Andere Studien beschreiben ähnliche Effekte. In diesen wird eine Voraktivierung von Pollen durch Schadstoffe mit Austritt von Allergenen postuliert. Als Folge wird eine Bildung allergenhaltiger Aerosole diskutiert [37-42]. Aufgrund einer tieferen Lungengängigkeit können diese zu einer verstärkten Symptomatik, speziell asthmatischer Beschwerden, führen [37-42].

In einer Studie von Morgenstern et al. wurde ein weiterer Hinweis für eine Wechselwirkung anthropogener Schadstoffe mit dem Allergenträger gegeben [43]. Hierbei wurde der Zusammenhang der Schadstoffexposition von Kindern mit dem Auftreten allergischer Erkrankungen untersucht. Es wurde beobachtet, dass die Exposition gegenüber $\text{PM}_{2,5}$ aus Verkehrsbelastung die Sensibilisierungsraten sowie atopische Erkrankungen bei Kindern erhöht.

Die Sensibilisierungsraten waren ausschließlich gegenüber Außenallergenen erhöht, was ebenfalls einen Hinweis für eine Wechselwirkung anthropogener Schadstoffe mit dem Allergenträger gibt.

Neben direkten Effekten von Schadstoffen auf den Allergenträger werden ebenfalls indirekte über Einfluss auf allergene Pflanzen diskutiert.

Masuch et al. (1997) begasten Gräserpezien mit Ozon und beschrieben einen Anstieg mehrerer Gräserpollenallergene [44]. Ähnliche Untersuchungen von Eckl-Dorna et al. (2010) zeigten ebenfalls einen Anstieg von Allergenen durch Ozonbegasung [45]. Die physiologische Relevanz erhöhter Allergengehalte mit verstärkter Symptomatik wurde in Immunoblots bestätigt.

Eine Studie von Guedes et al. (2009) konnte zudem Unterschiede zwischen urbanen und ruralen Pollen des weißen Gänsefußes (*Chenopodium alba*) detektieren. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Proteinprofile zwischen urbanen und ruralen Pollen mit einer zusätzlichen Reduzierung des Proteingehaltes in urbanen Pollen – ein Hinweis auf einen Einfluss urbaner und ruraler Umweltbedingungen auf Pollen [46].

Auch Studien in Canna Pollen beschreiben unterschiedliche Expressionsmuster zwischen urbanen und ruralen Pollen. Parallel wird ebenfalls eine Reduzierung des Proteingehalts in urbanen Pollen festgestellt. Die Allergenität der Pollen wurde zudem im murinen Sensibilisierungsmodell untersucht, wobei eine stärkere Allergenität urbaner Pollen postuliert wurde [47].

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Studien von D'Amato et al. (2000) und Riedler et al. (2000) zudem eine höhere Prävalenz von Pollenallergien in urbanen Gebieten beschreiben [48, 49]. Pollen sind stärker entsprechenden Luftschadstoffen ausgesetzt als es andere Allergene, wie beispielsweise die Hausstaubmilbe, sind. Die erhöhte Prävalenz von Pollenallergien in urbanen Gebieten deutet ebenfalls auf eine Wirkung anthropogener Schadstoffe auf allergene Pflanzen und deren Allergenträger hin, welche zu einer erhöhten Allergenität des Pollens für den Menschen führt.

Abschließend lässt sich sagen, dass bisherige Studien darauf hindeuten, dass die zunehmende Urbansierung mit veränderten Umweltbedingungen und steigender Schadstoffbelastung einen Einfluss auf den Menschen als auch den Allergenträger vermitteln. Hierbei besteht Evidenz, dass diese Veränderungen als mitursächliche Faktoren der zunehmenden Allergie vom Typ 1 betrachtet werden können.

Tabelle 3: Einfluss von Schadstoffen auf Pollen

Schadstoff	Effekt auf Allergen/Allergenträger/Pflanze
NO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Nitrierung von Proteinen/Allergenen • Beschädigung Pollenoberfläche • Reduzierung Bioverfügbarkeit von Allergenen
Ozon	<ul style="list-style-type: none"> • Verstärkt die Nitrierung durch NO₂ • Beschädigung Pollenoberfläche • Erhöht Allergengehalt
SO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzierung Bioverfügbarkeit von Allergenen
Dieselrußpartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Beschädigung Pollenoberfläche
Wässrige Schwebstaubextrakte	<ul style="list-style-type: none"> • Morphologische Veränderungen der Pollenoberfläche • Erhöhte Bioverfügbarkeit von Allergenen

3.4.4 Adjuvante Effekte von Pollen

Allergien sind gekennzeichnet durch eine Th2-gewichtete Immunantwort auf bestimmte Antigene, was in Folge zur Bildung von IgE und je nach Lokalisation zu den typischen Symptomen der Soforttyp Allergie führt. Abschließend geklärt ist jedoch noch nicht, weshalb auf bestimmte Antigene eine Th2-gerichtete Immunantwort induziert wird. Bekannt ist, dass der genetische Hintergrund ein maßgeblicher Faktor ist, welcher die Suzeptibilität eines Individuums zur Ausprägung einer allergischen Erkrankung bestimmt. Parallel sind adjuvante Faktoren bekannt geworden, welche in suszeptiblen Individuen die Allergieentstehung fördern können. Diese Faktoren können anthropogener als auch biogener Natur sein und sowohl auf Ebene der Sensibilisierung als auch in der Ausprägung allergischer Erkrankungen Einfluss nehmen (Abb. 1) [50].

Im Falle der Pollenallergie werden u. a. Pollen-eigene biogene Faktoren, welche parallel mit dem Pollenallergen freigesetzt werden, für die Sensibilisierung und die Th2-begünstigende Immunitätslage des Pollenallergens verantwortlich gemacht (Abb. 1). Zu diesen Pollen-eigenen Faktoren gehören NADPH-Oxidase, Proteasen und PALMs (Abb. 3). Ein weiterer

kürzlich in Pollen identifizierter Faktor mit immunogenen Eigenschaften ist Adenosin [51-59].

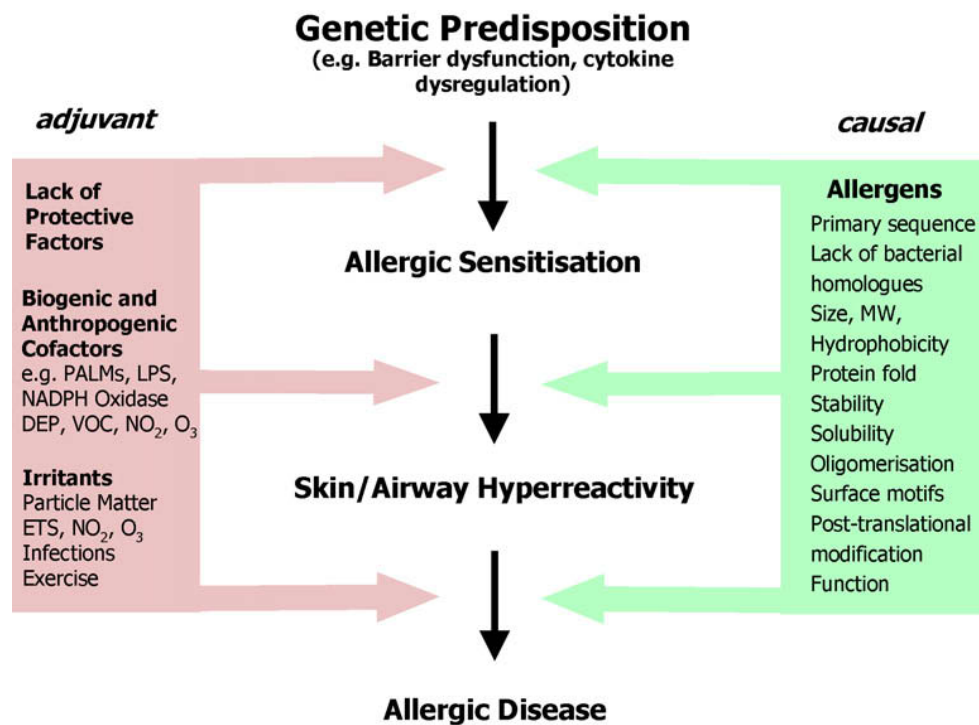


Abb. 1: Determinanten allergischer Erkrankungen [50]

NADPH-Oxidasen

NADPH-Oxidasen sind membran-gebundene Enzymkomplexe, welche im Menschen u.a. in der Phagosomenmembran Neutrophiler Granulozyten gefunden werden können [60]. Die Aufgabe von NADPH-Oxidasen in Granulozyten ist die Generierung von Hyperoxiden und reaktiven Sauerstoffspezien zur Zerstörung von Pathogenen. Gezeigt werden konnte, dass Pollen ebenfalls NADPH-Oxidasen enthalten. In Pollen wird eine Funktion der NADPH-Oxidasen im Pollenschlauchwachstum, in der Abwehr mikrobieller Erreger als auch in der Signalgebung diskutiert [51, 61, 62]. In murinen Studien konnte gezeigt werden, dass die in Pollen enthaltenen NADPH-Oxidasen ebenfalls zu Generierung reaktiver Sauerstoffspezien in mukosalen Zellen führen und Einfluss auf die adaptive Immunantwort nehmen [51]. Die parallele Gabe von Antigen mit NADPH-Oxidasen führt zu einer Aggravation der Antigen-induzierten allergischen Entzündung, einer erhöhten Atemwegshyperreaktivität sowie einer verstärkten Bildung von IgE im Vergleich zur Gabe von Antigen allein. Die zusätzliche Gabe von Antioxidantien schwächt die Antigen induzierte allergische Entzündung wieder ab. Dies hebt die Bedeutung von in Pollen enthaltenen NADPH-Oxidasen in der allergischen Entzündung hervor, weshalb sie als adjuvante und aggravierende Faktoren in Pollen diskutiert werden [51].

Proteasen

Neben NADPH-Oxidase sind weitere Enzyme, sogenannte Proteasen in verschiedenen Pollenspezies beschrieben [63, 64]. Hierbei handelt es sich um proteolytische Enzyme, welche Proteine oder Peptide spalten. Proteasen werden hingegen nicht nur in Pollen gefunden, auch im Menschen sind sie nahezu ubiquitär exprimiert. Im Menschen sind sie u.a. beteiligt an der Regulation des Proteingehaltes der Zelle, aber auch an der hydrolytischen Spaltung von Nahrungsmitteln im Gastrointestinaltrakt. Angenommen wird, dass Pollen-Proteasen parallel mit dem Allergen aus dem Pollen freigesetzt werden und über ihre proteolytische Aktivität auf humanem Gewebe sowie spezifische Aktivierung von Rezeptoren ebenfalls an der Immunreaktion auf Pollenallergene beteiligt sind [52]. Diskutiert wird hier eine Zerstörung von Zell-Zell-Kontakten (Tight-Junctions) zwischen den Epithelzellen, eine Aktivierung spezifischer Protease- (PARs) und Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sowie eine Induktion von TSLP und weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [52]. Begleitet von einer Allergen-unabhängigen Aktivierung des Immunsystems können Allergene somit leichter epitheliale Barrieren überqueren, was zu einer verstärkten Allergenität beiträgt [52]. Auch Allergene selbst können Proteasefunktion haben. Diese kann mitverantwortlich für ihre Allergenität sein oder diese maßgeblich bestimmen. Ein Beispiel hierfür ist Der p 1, welches zur Familie der Papain-like Cysteine-Proteasen gehört.

Neben Proteasefunktionen sind weitere intrinsische Funktionen von Allergenen bekannt, welche ebenfalls mitverantwortlich für ihre Allergenität gemacht werden. So fungieren manche Allergene als Pektinlyasen, Trypsininhibitoren, Kalzium-bindende Proteine, Lipidtransferproteine oder Aktinbindende Proteine [50]. Jedoch sind nicht alle Allergene mit intrinsischen Funktionen ausgestattet und nicht alle Proteasen sind Allergene. Deswegen gibt die intrinsische Aktivität nicht die Antwort auf die Frage, was das Allergen zum Allergen macht.

Eikosanoide und PALMs

In Pollen wurden ebenfalls Lipide mit struktureller Ähnlichkeit zu den menschlichen Eikosanoiden gefunden, die sogenannten Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs) [25, 65]. Aufgrund ihrer Kreuzreaktivität im PGE₂ und LTB₄ ELISA sowie ihrer funktionellen Ähnlichkeit zu entsprechenden Eikosanoiden wurden sie als PALM_{PGE₂} und PALM_{LTB₄} bezeichnet.

Eikosanoide sind Produkte des Stoffwechsels von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche 20 Kohlenstoffatome enthalten [66]. Im Körper wirken sie als Immunmodulatoren und Neurotransmitter und sind beteiligt an verschiedensten entzündlichen Prozessen [67]. Hierbei unterscheidet man ausgehend von der Vorläufersubstanz verschiedene Serien von Eikosanoiden [68, 69]. Vorläufersubstanzen bilden hierbei die Dihomogammalinolensäure, die Arachidonsäure und die Eicosapentaensäure [68, 70]. Produkte der Dihomogammalinolensäure

und der Eicosapentaensäure werden dabei als primär antiinflammatorisch, Produkte der Arachidonsäure als inflammatorisch betrachtet (Abb. 2) [67-69]. Die einzelnen Vertreter der Eikanoide lassen sich in vier unterschiedliche Substanzgruppen unterteilen, die über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren oder nukleäre Rezeptoren wirken [67]. Man unterscheidet hier die Prostacycline, die Thromboxane, die Prostaglandine und die Leukotriene [66, 67, 71].

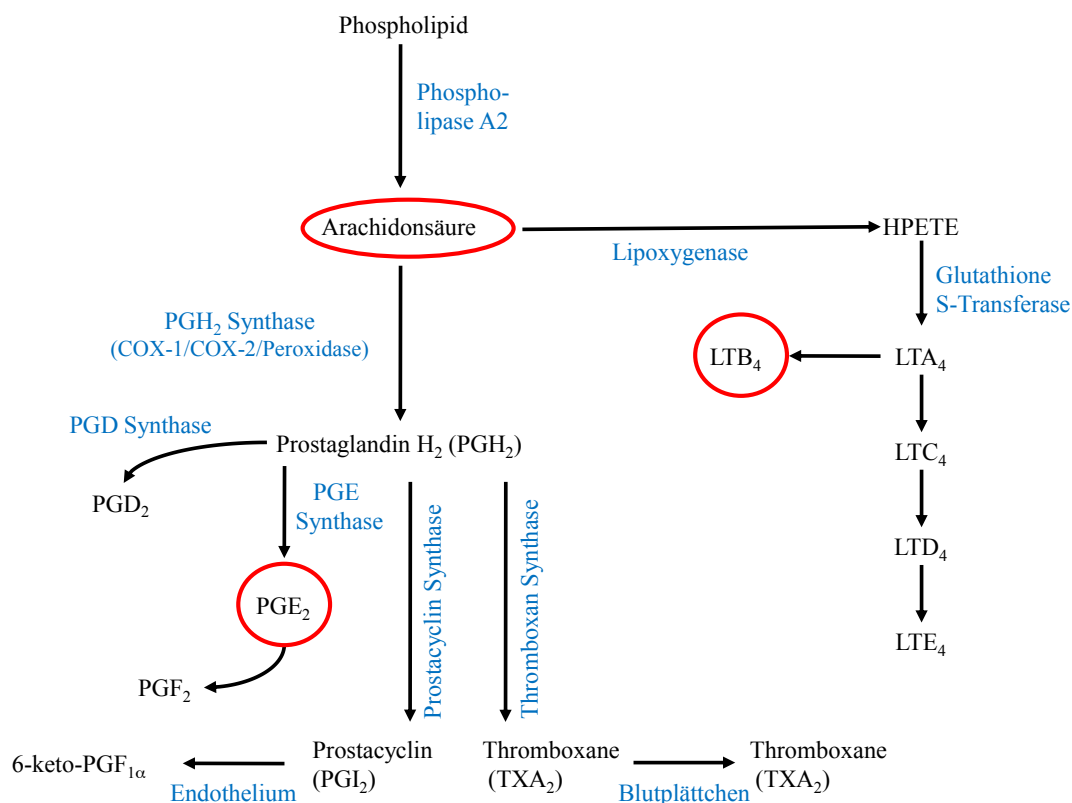


Abb. 2: Produkte der Arachidonsäure (modifiziert, basierend auf [72])

LTB₄ und PALM_{LTB4}

Leukotriene der Serie 4 bilden sich aus Arachidonsäure über das Enzym Arachidonat-5-Lipoxygenase, welches die Reaktion von Arachidonsäure über 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HPETE) zu Leukotrien A₄ (LTA₄) katalysiert (Abb. 3) [67, 71]. Das sehr instabile Epoxid Leukotrien A₄ ist in Folge die Ausgangsverbindung zur Biosynthese diverser Leukotriene. LTB₄ besitzt ein Molekulargewicht von 336,5 DA und ist ein Leukotrien, welches von Leukozyten als Antwort auf inflammatorische Mediatoren produziert wird. Beschriebene Rezeptoren für LTB₄ sind der hochaffine BLT1-Rezeptor und der niedrigaffine BLT2-Rezeptor [73, 74]. LTB₄ vermittelt u. a. die Adhäsion von Leukozyten am Endothelium, was diesen wiederum die Einwanderung in entsprechendes Gewebe erlaubt. Für Neutrophile Granulozyten ist es zudem ein potentes Chemoattraktanz [74-76] und

in der Lage in diesen die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Freisetzung von lysosomalen Enzymen zu induzieren [77].

In Pollen verschiedener Spezies konnten ebenfalls LTB₄-ähnliche Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen durch Kreuzreaktivität im LTB₄ ELISA identifiziert werden. Diese wurden in Folge als PALM_{LTB4} bezeichnet [25]. LTB₄ in Pollen wird ausgeschlossen, da Pollen keine Arachidonsäure, die Vorläufersubstanz für LTB₄, enthalten.

Ähnlich LTB₄ waren ebenfalls wässrige Pollenextrakte (WPE) in der Lage eine Migration und Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten mit Freisetzung von Myeloperoxidase zu induzieren [78]. Entsprechende Migration konnte mittels LTB₄-Rezeptorantagonist gehemmt werden. Zudem konnte der WPE induzierte Calcium-Flux durch Vorinkubation mit LTB₄ gehemmt werden wie auch der durch LTB₄ induzierte Calcium-Flux durch WPE gehemmt werden konnte. Dies sind deutliche Hinweise einer funktionellen Ähnlichkeit LTB₄-ähnlicher Substanzen aus Pollen (PALM_{LTB4}) mit LTB₄. Ähnlich Neutrophilen Granulozyten induzieren WPE zudem eine Chemotaxis von Eosinophilen Granulozyten mit Aktivierung und Freisetzung von Kationischen Protein sowie der Expression von CD11b. Auch hier konnte die Migration durch den LTB₄-Rezeptorantagonisten Ly293111 gehemmt werden [79]. Als relevante chemoattraktiv wirkende Substanzen, verantwortlich für beobachtete Migrationen, wurden 9- und 13-HODE und HOTE in WPE identifiziert. Hierbei handelt es sich um monohydroxilierte Produkte der Linol- bzw Linolensäure [58]. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass in Pollen enthaltene LTB₄-ähnliche Substanzen über spezifische Aktivierung humaner BLT1- und BLT2-Rezeptoren wirken, somit Allergen-unabhängige inflammatorische Wirkung vermitteln und so Einfluss auf die allergische Entzündungsreaktion nehmen.

PGE₂ und PALM_{PGE2}

Neben LTB₄-ähnlichen Substanzen sind in Pollen ebenfalls PGE₂-ähnliche Lipidmediatoren beschrieben. In menschlichen Zellen entstehen Prostaglandine durch die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 und nachfolgende verschiedene Prostaglandin-Synthasen [67, 71] (Abb.3) aus der Dihomogammalinolensäure, der Arachidonsäure oder der Eicosapentaensäure. Prostaglandine der Serie 2, zu denen PGE₂ gehört, sind dabei u. a. verantwortlich für Schmerz, Blutgerinnung und Entzündung. PGE₂ besitzt dabei ein Molekulargewicht von 352,5 DA und vermittelt seine Wirkungen über die vier Rezeptoren EP1, EP2, EP3 und EP4 [67]. Im Körper ist PGE₂ das mengenmäßig häufigste Prostaglandin und hat vielfältige physiologische Funktionen. Unter pathologischen Bedingungen wird es ubiquitär produziert [80-82]. Neben der Fieberreaktion ist PGE₂ beteiligt an allen Kardinalsymptomen der Entzündung zu denen Ödembildung, Rötung, Schwellung und Schmerz gehören [80, 83]. PGE₂ erhöht dabei die Gefäßpermeabilität und den Blutfluss im inflammatorischen Gewebe. Gleichzeitig

führt es zu einer Verstärkung des durch andere Entzündungsmediatoren hervorgerufenen Schmerzes, indem es die Aktivierungsschwelle für resistente Natriumkanäle an sensiblen Nerven herabsetzt [84].

Parallel vermittelt es direkte Effekte auf Immunzellen. Auf dendritische Zellen wurde ein stimulatorischer Effekt auf die Maturation, die Antigenaufnahme, die Expression Kostimulatorischer Moleküle sowie die Migration zum Lymphknoten gezeigt [85-87]. In Makrophagen unterstützt es die Aktivierung durch $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ und induziert die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 [88, 89].

Die Wirkung auf T-Zellen stellt sich hingegen weitaus komplexer dar. So sind parallel immunsuppressive sowie -stimulatorische Effekte von PGE_2 beschrieben. Zum einen ist eine Hemmung der T-Zellproliferation postuliert, wobei dieser Effekt in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus sowie der Länge der PGE_2 Interaktion mit der Zielzelle diskutiert wird. Ebenfalls beschrieben ist eine Induktion von $\text{FoxP3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ positiven regulatorischen T-Zellen mit Unterdrückung von Effektor T-Zellen [90-92], eine Induktion von T-Zell-Anergie und eine Hemmung der T-Zell Zytotoxizität [93]. Gleichzeitig werden inflammatorische Mechanismen in Teilen kontrovers diskutiert. So zeigten Studien eine Potentierung der Th1- und Th17-Differenzierung durch PGE_2 [94], während andere wiederum eine Hemmung von IL-12 und $\text{IFN-}\gamma$, nicht hingegen IL-4 und IL-5 durch PGE_2 postulierten [95]. Weitere Studien beschrieben eine verstärkte IL-5 Produktion in T-Zellen durch PGE_2 [96]. Spätere Studien unterstützten eine Th2-fördernde Wirkung von PGE_2 , indem sie einen primären Effekt von PGE_2 auf Th-Zellen mit Folge einer höheren Produktion der Th2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13, sowie einer Hemmung der IL-12 Rezeptorsensitivität, postulierten [97].

Ebenfalls auf Ebene der APZ wird ein Einfluss auf die T-Zellpolarisierung diskutiert. Hierbei ist sowohl ein Einfluss auf die APZ in Form einer Th1- [98], Th17- [99, 100] als auch Th2-fördernden [101] Immunitätslage beschrieben. Die Wirkung scheint hier in Teilen in Abhängigkeit der Rezeptorwirkung als auch der Stimulationsbedingungen zu stehen. Die Wirkung von PGE_2 ist somit sehr vielfältig, womöglich in starker Abhängigkeit von Kofaktoren, Konzentration und Rezeptorexpression.

In Pollen werden, wie bereits beschrieben, ebenfalls PGE_2 -ähnliche Lipide, die sogenannten $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ gefunden, welche mit weiteren Pollenfaktoren eine Th2-gewichtete Immunitätslage begünstigen.

Dendritische Zellen sind die Verbindung zwischen innater und adaptiver Immunabwehr und sind die effektivsten APZ zur Aktivierung naiver T-Zellen, womit ihnen eine besondere Rolle in der Induktion einer Immunantwort zukommt. Im Falle der Allergie kommt ihnen eine spezielle Rolle in der Sensibilisierungsphase, also der Entstehung der Allergie zu. Gleichzei-

tig haben sie Einfluss auf die Erhaltung und Ausprägung der Erkrankung in bereits sensibilisierten Individuen [102, 103].

Eine Studie von Traidl-Hoffmann et al. [59] konnte zeigen, dass die Stimulation von aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen (MoDZ) mit LPS in Anwesenheit von WPE zu einer verstärkten Expression von Maturationsmarkern führt, ähnliche Effekte wie sie für PGE₂ beobachtet werden können. Funktionell zeigte sich eine verstärkte Proliferation naiver allogener T-Zellen, somit eine Verstärkung der allostimulatorischen Kapazität durch WPE. Ebenfalls beschrieben wurde eine dosisabhängige selektive Inhibition von IL-12p70 durch WPE, während andere Zytokine IL-6, TNF- α und IL-10 unbeeinflusst blieben [59]. Durch GC-MS Analysen konnte PPE₁ als relevanter Faktor für beobachtete Effekte identifiziert werden. PPE₁ war entsprechend WPE in der Lage die LPS induzierte IL-12 Sekretion zu hemmen und eine Stimulation von MoDZ mit WPE sowie PPE₁ führte in einer allogenen DZ-T-Zellkultur (MLR) zu einer erhöhten IL-4/IFN- γ Ratio [59]. Weitere Studien analysierten den Einfluss von WPE auf die Chemokin-Produktion, die Chemokin-Rezeptor Expression sowie die migratorische Kapazität von MoDZ [56]. WPE führten dabei zu einer verstärkten Expression von CXCR4. Ein Chemokinrezeptor, welcher möglicherweise an der Migration von DC in lymphoide Organe während der allergischen Entzündung beteiligt ist. Weiterhin wurde eine verminderte CCR1 und CCR5 Expression beobachtet. Verminderte CCR1 und CCR5 Expression wird mit einem proinflammatorischen Phänotyp dendritischer Zellen in Zusammenhang gebracht [104]. Die funktionelle Relevanz der erhöhten CXCR4 Expression zeigte sich in einer verstärkten Migration auf den CXCR4 Ligand CXCL12. Zudem wurde eine verstärkte Migration auf die Lymphknoten „Homing“ Chemokine CCL19 und CCL21 beschrieben. Die Analyse der Chemokine zeigte zudem eine verringerte Produktion der Th1-Chemokine CXCL10 und CCL5 mit paralleler Erhöhung des Th2-Chemokins CCL22. Die funktionelle Bedeutung wurde in Migrationsassays mit Th1- und Th2-Zellen deutlich. Hierbei induzierten Überstände von mit LPS und WPE generierten MoDZ eine verstärkte Th2- und verminderte Th1-Chemotaxis.

In einem murinen Modell wurde die Wirkung von WPE auf die Polarisierung von T-Zellen weiter *in vivo* untersucht. Hierbei führte die Gabe von Allergen in Kombination mit Bet-WPE zu einer Herunterregulation des Th1-Zytokins IFN- γ und einer Induktion der Th2-typischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 [55]. PPE₁ in Kombination mit Allergen hingegen führte zu einer Herunterregulation von sowohl Th1- als auch Th2-spezifischen Zytokinen. *In vitro* konnten die beobachteten WPE Effekte nur teilweise auf PPE₁ zurückgeführt werden. Die Herunterregulation der Th1-Chemokine CXCL10 und CCL5 war für PPE₁ auch nach Stimulation zu beobachten, hingegen nicht die Hochregulation des Th2-Chemokins CCL22.

In der Gesamtheit sprechen diese Ergebnisse für summative Effekte von Pollenfaktoren auf die Induktion einer Th2-gewichteten Immunantwort.

Adenosin

Einen kürzlich ebenfalls in Pollen identifizierter Faktor mit Wirkung auf Immunzellen stellt Adenosin dar [53]. Im Körper kann das Nukleosid Adenosin ubiquitär gefunden werden. Adenosin besteht dabei aus der Nukleinbase Adenin und dem Zucker β -D-Ribose, wobei das Molekulargewicht 276,2 DA beträgt. Seine Wirkungen vermittelt Adenosin über die vier G-Protein gekoppelten Rezeptoren A1, A2a, A2b und A3 [105], welche mit unterschiedlichen G-Proteinen gekoppelt sind und unterschiedliche bis gegenläufige Effekte vermitteln. Der A1- und A3-Rezeptor sind mit Gi-Proteinen gekoppelt, während der A2a- und A2b-Rezeptor mit Gs-Proteinen und der A2b zusätzlich noch mit Gq/G11-Proteinen gekoppelt ist [106]. Des Weiteren besitzen die verschiedenen Rezeptoren unterschiedliche Affinitäten zu Adenosin, wobei der A1- und A2a-Rezeptor eine höhere Affinität im Vergleich zu den Rezeptoren A2b und A3 zeigen [107]. Produziert wird Adenosin intrazellulär und extrazellulär, insbesondere unter Bedingungen verstärkten Energieverbrauchs wie Stress oder Hypoxie, welche sich im Rahmen von Entzündung oder Verletzung finden lassen [107, 108].

Die Wirkung von Adenosin wird primär als antiinflammatorisch eingeordnet, wobei auch inflammatorische Wirkungen, abhängig von der Rezeptorbeteiligung, vermittelt werden. Unter normalen Bedingungen liegen die Adenosin-Konzentrationen dabei bei etwa 300 nmol/l, wohingegen sie unter ischämischen oder inflammatorischen Bedingungen rapide auf bis zu 600-1200 nmol/l ansteigen können [109].

Nachdem nicht alle durch WPE vermittelten Effekte auf bekannte Faktoren aus Pollen zurückgeführt werden konnten, wurde in einer Studie von Gilles et. al (2011) das Pollenmetabolom mittels Ultrahochauflösender-Massenspektrometrie auf weitere „Kandidaten-Substanzen“ mit immunogener Wirkung analysiert [53]. Hierbei wurde Adenosin als relevanter Faktor identifiziert. Die Präsenz von Adenosin in Pollen verschiedener Spezies in μ -molaren Konzentrationen konnte mittels hochauflösender Massenspektrometrie bestätigt werden. In Zellassays wurde dessen immunogene Wirkung untersucht, wobei divergente Effekte in Zellen von Atopikern und Nicht-Atopikern beobachtet werden konnten [53].

Die Funktion von Adenosin in Pollen ist noch nicht abschließend geklärt. Ein aktiver Transporter-abhängiger Import von Nukleosiden konnte gezeigt werden, welche als Grundbausteine für die RNA Synthese während der Pollenkeimung diskutiert werden [110, 111]. In frischen Pollen detektiertes Adenosin könnte auch ein Abbauprodukt von ATP darstellen, welchem u. a. Bedeutung in der Pollenkeimung und der Pollenschlauchbildung zukommt [112-115].

Ähnlich PPE₁ ist auch Pollen-Adenosin in der Lage die Funktion humaner dendritischer Zellen zu modulieren. Hierbei konnte ebenfalls eine LPS induzierte IL-12 Hemmung durch in Pollen enthaltenem Adenosin mit Beteiligung der A2a- und A2b-Rezeptoren gezeigt werden

[53]. Des Weiteren vermittelt es über dendritische Zellen ebenfalls Wirkungen auf naive T-Zellen. Werden dendritische Zellen (Nicht-Atopiker) zunächst mit Adenosin oder WPE inkubiert und in Folge in Koinkubationen mit naiven T-Zellen eingesetzt, führt dies über Wirkung auf dendritische Zellen zu einer Hemmung von IFN- γ und Induktion von IL-10. Weiter konnte gezeigt werden, dass Adenosin aus Pollen über dendritische Zellen von Nicht-Atopikern tolerogene Wirkung durch Induktion von CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen vermittelt. Dieser Effekt ist auf dendritische Zellen von Atopikern signifikant geringer ausgeprägt. Ebenfalls war in nicht-Atopikern die Induktion von IL-10 begleitet von erniedrigten Konzentrationen der Th2-spezifischen Zytokine IL-5 und IL-13, was sich ebenfalls nicht für Atopiker beobachten ließ [53]. Mit WPE oder Adenosin behandelte dendritische Zellen von Atopikern induzierten in allogenen Stimulationsassays mit naiven T-Zellen von Nicht-Atopikern niedrigere Konzentrationen IL-10 und höhere Konzentrationen IL-5 und IL-13 [53]. Adenosin scheint somit bei Nicht-Atopikern in der Lage zu sein, tolerogene Signale über dendritische Zellen auf naive T-Zellen zu vermitteln, in dendritischen Zellen von Atopikern scheint dieser Mechanismus gestört [53].

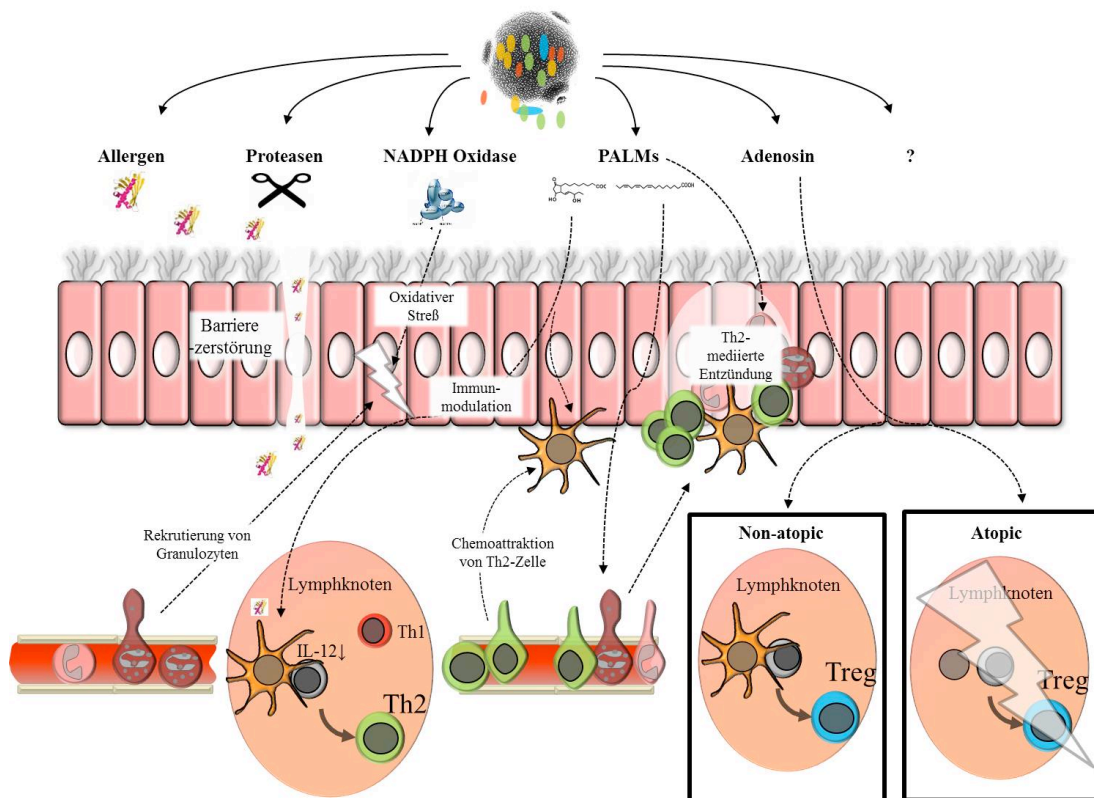


Abb. 3: Immunmodulation durch Pollen [modifiziert, basierend auf [116]]. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Pollen eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen enthält, welche parallel mit dem Allergen auf der Schleimhaut freigesetzt werden. Zu diesen Faktoren gehören Proteasen, NADPH-Oxidasen, PALMs oder Adenosin. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass diese Faktoren divergente Wirkungen auf Zellen des Immunsystems besitzen, weshalb sie als adjuvante und aggravierende Faktoren in der Soforttypallergie diskutiert werden. Während durch Proteasen eine Barrierezerstörung mit den Folgen einer erleichterten Allergenpenetration beschrieben wird, ist für NADPH die Induktion von oxidativem Streß mit verstärkter Rekrutierung von Granulozyten postuliert. Zusätzlich enthalten Pollen LTB₄-ähnliche Lipidmediatoren (PALM_{LTB4}), welche als Chemoattraktanz für Neutrophile und Eosinophile Granulozyten ebenfalls immunstimulatorische Wirkungen vermitteln. Weitere in Pollen enthaltene PGE₂-ähnliche Lipidmediatoren (PALM_{PGE2}) zeigen immunmodulatorische Wirkungen und begünstigen eine Th2-gewichtete Allergie-fördernde Immunitätslage. Auch Pollen-Adenosin vermittelt immunmodulatorische Wirkungen. Hierbei werden hingegen vielmehr tolerogene Effekte beschrieben, welche im Atopiker im Vergleich zum Nicht-Atopiker in verminderter Ausprägung bestehen.

3.5 Allergische Erkrankungen in Abhängigkeit intrinsischer Faktoren

3.5.1 Hintergrund

Neben extrinsischen Faktoren, zu denen u. a., wie in 3.4 diskutiert, die Urbanisierung und hier insbesondere anthropogene Schadstoffe gehören, werden auch intrinsische Faktoren als Risikofaktoren für allergische Erkrankungen diskutiert. Neben genetischen Faktoren [9, 117, 118] sind hier ebenfalls hormonelle Faktoren, zu denen Sexualhormone, aber auch Adipokine gehören, in den Vordergrund gerückt. Epidemiologisch können Unterschiede in der Prävalenz bestimmter Erkrankungen zum einen zwischen dem männlichen und weiblichen Ge-

schlecht, zum anderen in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus beobachtet werden. Hier wird das weibliche Geschlecht als auch der Zustand der Adipositas mit einem veränderten relativen Risiko für einige allergische Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Dies deutet darauf hin, dass sowohl Geschlecht als auch Adipositas mit einer veränderten Immunantwort in Verbindung stehen, welche zur Entwicklung oder Ausprägung bestimmter Erkrankungen prädispositioniert.

Als Ursache für eine veränderte Immunitätslage zwischen Männern und Frauen werden mitunter die Sexualhormone diskutiert [119-121]. Bei Adipositas werden die sogenannten Adipokine mitverantwortlich gemacht [122-125]. Während das weibliche Geschlecht mit einer verstärkten Immunkompetenz in Verbindung gebracht wird, lässt sich dies für Adipositas nicht pauschal sagen. Sofern man die Mortalitätsraten einiger Erkrankungen in Verbindung zu Adipositas betrachtet, werden sowohl erhöhte als auch gleichbleibende und erniedrigte relative Risiken in Abhängigkeit zur Erkrankung beschrieben [126]. Hierbei steht das relative Risiko sowohl in Abhängigkeit zum Ausmaß der Adipositas, hingegen ebenfalls, für jede Erkrankung zu beobachten, in weiterer Abhängigkeit zum Geschlecht [126].

3.5.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Während das weibliche Geschlecht mit einer erhöhten Immunkompetenz in Verbindung gebracht wird, stellt es gleichzeitig einen unabhängigen Risikofaktor für pathologisch fehlgeleitete Immunantworten gegen eigentlich harmlose Antigene dar. Hierzu gehören allergische Erkrankungen als auch Autoimmunerkrankungen [121, 127]. Bis zu 5% der Bevölkerung der westlichen Länder sind von Autoimmunerkrankungen betroffen und 80% davon sind Frauen [128]. Auch die Mehrzahl der von Asthma Betroffenen [129, 130], von schweren Nahrungsmittelallergikern [131-133] sowie vom anaphylaktischen Schock Betroffenen machen Frauen aus [134].

Als Ursache für diese Beobachtungen sind verstärkt Sexualhormone in den Vordergrund gerückt. Unterstützt wird die Hypothese einer hormonellen Beteiligung an Erkrankungen sowie einer direkten Wirkung von Sexualhormonen auf das Immunsystem durch die Expression von Sexualhormonrezeptoren auf Immunzellen [135-139].

Sowohl Menstruation als auch Schwangerschaft zeigen einen Einfluss auf die Allergieausprägung. Dies wiederum gibt einen maßgeblichen Hinweis für eine direkte Beteiligung von Sexualhormonen an der allergischen Entzündungsreaktion [140-143]. Beispiele hierfür sind das Atopische Ekzem, bei dem sich häufig eine Verschlechterung während der Menstruation beobachten lässt, als auch Asthma bei dem in 40% der Fälle eine Zyklusabhängigkeit festzustellen ist [134]. Auch die Einnahme synthetischer Hormone in Form oraler Kontrazeptiva oder im Rahmen einer Hormonersatztherapie hat einen Einfluss auf die Allergie-

ausprägung und spricht für einen direkten Einfluss von Sexualhormonen auf die Ausprägung der Erkrankung. Hierbei konnte eine Aggravation der Symptomatik sowie eine Erhöhung des Risikos für Keuchhusten beobachtet werden [144]. Auch ein Anstieg von IgE-Antikörpern durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva konnte gezeigt werden.

Aber auch höhere Konzentrationen der Antikörper Isotypen IgG sowie IgM sind bei Frauen beschrieben [145-147]. Gemeinhin besitzen Frauen im Rahmen bestimmter Infektionen eine höhere Resistenz als auch bessere Prognose. *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass Östrogen die IgG und IgM-Produktion von sowohl männlichen als auch weiblichen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMZs) erhöht, wohingegen Testosteron die Produktion inhibiert [148-151].

Auch tierexperimentelle Studien deuten auf eine verbesserte Infektions-Resistenz beim weiblichen Geschlecht und eine Wirkung von Sexualhormonen auf das Immunsystem hin [135]. Metaanalysen beschreiben eine verstärkte Prävalenz von Helminth-Infektionen beim männlichen Geschlecht verschiedener Wirbeltierarten [152]. Weitere Übersichts-Arbeiten zeigen, dass eine höhere Prävalenz parasitärer Infektionen sowie Filariosen in männlichen Geschlecht in acht von zehn Studien postuliert wird [153, 154]. Ebenfalls findet sich eine höhere Mortalität in Folge von Infektionen bei männlichen Affen [155] sowie eine verringerte Zytokinproduktion [156] als auch Antikörper-Antwort beim männlichen Geschlecht verschiedener Spezies [157].

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen auf eine gesteigerte Immunantwort beim weiblichen Geschlecht und einen Einfluss von Sexualhormonen auf das Immunsystem hin. Hierbei lässt sich auf eine immunstimulatorische Wirkung von Östrogenen und eine immunsuppressive von Testosteron schließen.

Östrogene

Bildung und Funktion

Östrogene sind die Hauptvertreter der weiblichen Geschlechtshormone, wobei zwischen Östron, Östriol und Östradiol unterschieden wird. Östradiol ist dabei das potenteste der Östrogene [158]. Gebildet werden Östrogene hauptsächlich in den Ovarien, im Follikel und Gelbkörper, zu einem geringen Teil auch in der Nebennierenrinde und im Fettgewebe. Hier entstehen sie aus männlichen Geschlechtshormonen, katalysiert durch das Enzym Aromatase CYP19A1 (Abb. 4).

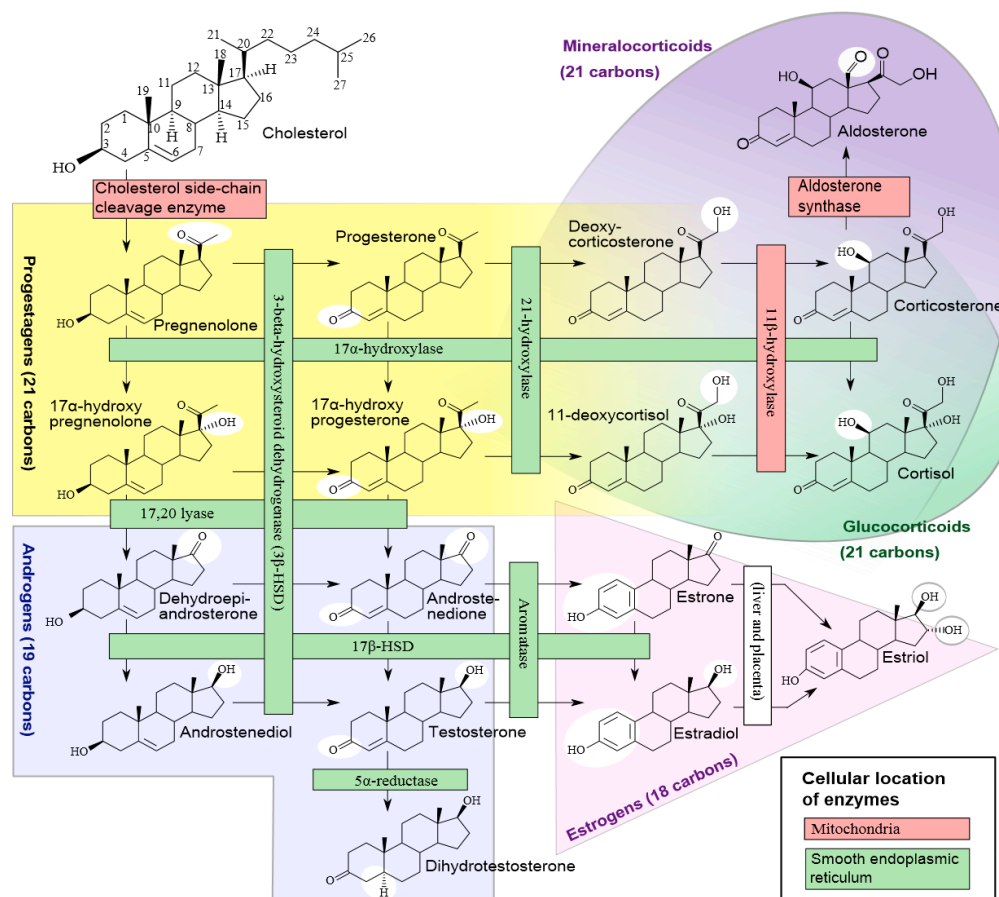


Abb. 4: Schema der Steroidsynthese [159]

Auch Männer bilden Östrogene, hingegen in geringeren Mengen, wobei hier der Bildungsort der Hoden ist [160]. Die physiologischen Östradiolspiegel von Frauen liegen im Bereich 44 – 587 pmol/l in der follikulären Phase, 125 – 1468 pmol/l in der Ovulationsphase und von 99 – 903 pmol/l in der lutealen Phase. Postmenopausal liegen die Östradiolspiegel zwischen 44 und 110 pmol/l. Bei Männern finden sich Östradiolspiegel von 44 – 206 pmol/l. Die Wirkungen der Östrogene sind vielfältig. U. a. sind sie verantwortlich für die Entwicklung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale [161] sowie die Steuerung des Menstruationszyklus. Gleichzeitig haben sie Einfluss auf das psychische Befinden, den Knochenaufbau [162] aber auch das Immunsystem [120, 127, 163, 164]. Die Wirkung der Östrogene auf das Immunsystem wird, wie bereits beschrieben, als primär immunstimulatorisch eingeordnet [120, 127, 165].

Östrogenrezeptoren (ERs) und „klassischer“ Wirkmechanismus von Östrogenen

Ihre Wirkungen können Östrogene über spezifische Rezeptoren oder aber Rezeptor-unabhängig vermitteln [166]. Bei den Östrogenrezeptoren (ER) werden der Östrogenrezeptor α (ER α) und der Östrogenrezeptor β (ER β) unterschieden, welche zur Superfamilie der nuk-

leären Rezeptoren gehören [166]. Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um im Cytosol befindliche Rezeptoren, welche primär als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren agieren und als solche die Genexpression des Zielgens regulieren („klassischer“ Wirkmechanismus). Durch ihre lipophilen Eigenschaften können Östrogene frei durch die Zellmembran diffundieren und ihre Wirkungen innerhalb der Zelle vermitteln. Beim klassischen genomischen Wirkmechanismus der Rezeptoren wird die Bindung der Östrogene gefolgt von einer Dimerisierung mit anschließender Translokation in den Zellkern. Translozierte Dimere binden in Folge an spezifische Motive der DNA, sogenannte Östrogen-responsive Elements (ERE) und beeinflussen so die Genexpression. Mögliche Dimere können dabei Homo- aber auch Heterodimere zwischen $ER\alpha$ und $ER\beta$ sein. Hingegen können sich auch Heterodimere mit anderen Rezeptoren bilden. Hier sind u. a. Dimere mit dem Thyroidrezeptor beschrieben.

Expression der ERs

Während beide Rezeptoren weitläufig in Zellen sowie Geweben exprimiert sind, lassen sich dennoch differenzierte Expressionsmuster beobachten. Der $ER\alpha$ wird hauptsächlich im Endometrium, Eierstockstromazellen, Haut, Hypothalamus und in Brustkrebszellen [167] exprimiert. Die Expression des $ER\beta$ lässt sich verstärkt in Niere, Gehirn, Knochen, Herz, Lunge, intestinaler Mukosa, Prostata und Endothelzellen beobachten [168].

Parallel wird eine Regulation der Rezeptorexpression durch inflammatorische, hypoxische oder pathologische Zuständen beschrieben. Hierbei wird eine Änderung des Verhältnisses der Rezeptoren zueinander postuliert. Das Verhältnis der Rezeptoren ist von maßgeblicher Bedeutung, da unterschiedliche bis gegenläufige Effekte durch die Rezeptoren vermittelt werden können [169, 170].

Regulation ER-Expression unter pathologischen und inflammatorischen Bedingungen

Tierexperimentelle Studien beschreiben eine Zunahme der $ER\beta$ - und Abnahme der $ER\alpha$ -Expression unter Verletzungs- oder Blutungszuständen und deuten somit eine Zunahme von $ER\beta$ unter inflammatorischen Bedingungen an [171]. Inflammatorische Bedingungen werden gleichzeitig von Hypoxie begleitet. Ebenfalls gezeigt werden konnte eine Abnahme von $ER\alpha$ unter hypoxischen Bedingungen [172, 173] sowie eine Zunahme der $ER\beta$ Expression unter oxidativem Stress [174].

Überdies konnte auch unter pathologischen Bedingungen im Menschen eine veränderte Expression der ERs nachgewiesen werden. Ein Beispiel hierfür ist die Rheumatoide Arthritis. In Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte eine verstärkte Expression des $ER\beta$ in Fibroblasten sowie inflammatorischen Zellen des Synovialgewebes nachgewiesen werden [175]. Auch eine veränderte Rezeptorexpression in Patienten mit Systemischem Lupus Erythe-

matodes konnte beobachtet werden. Zumal die T-Zellen der Patienten eine unveränderte Expression des ER β im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen, fand sich eine erniedrigte ER α Expression, womit wiederum eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten von ER β resultierte [176].

Eine veränderte Rezeptorexpression unter inflammatorischen oder pathologischen Bedingungen gibt Hinweis auf eine unterschiedliche Wirkung und möglicherweise Bedeutung von Östrogenen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Regulation der Östrogensynthese unter inflammatorischen Bedingungen

Interessanterweise lässt sich ebenfalls eine Induktion der Aromataseaktivität unter inflammatorischen Bedingungen beobachten. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Konvertierung von Androgenen zu Östrogenen. Die Folge einer Induktion von Aromatase ist damit ein Anstieg der Östrogenkonzentration. Die Induktion von Aromatase kann hierbei durch die inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 stattfinden [165].

Östrogene können interessanterweise wiederum die Aromatase-induzierenden Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 regulieren. Hier wird eine bimodale Wirkung von Östrogenen diskutiert mit Stimulation in physiologischen und Inhibition in pharmakologischen Konzentrationen [177, 178]. Gestützt wird die Studie zur Induktion von Aromatase durch proinflammatorische Zytokine durch eine weitere Studie die feststellen konnte, dass sich in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis – Gewebe mit erhöhter Entzündungsaktivität – ein verändertes Verhältnis von Östrogenen zu Androgenen finden lässt [165]. Dieses veränderte Verhältnis wird auf die Expression von Aromatase in sich entzündlichem Gewebe lokalisierter Makrophagen zurückgeführt. Die erhöhte Aromataseexpression führt zu einer verstärkten Konvertierung von Androgenen zu Östrogenen, womit die Östrogenkonzentrationen zu- und die Androgenkonzentrationen abnehmen. Dies sind Hinweise, die für eine starke Beteiligung von Östrogenen in der Entzündungsreaktion sprechen.

Nachdem die Östrogen-Rezeptoren eine spezifische Expression aufweisen, lässt sich zudem eine unterschiedliche Affinität der verschiedenen Östrogene zu den Rezeptoren beobachten. Hierbei binden Östrone mit höherer Affinität an den ER α , Östriol an den ER β . 17 β -Östradiol bindet gleichsam an beide Rezeptoren. Interessanterweise wurden neben einer veränderten Rezeptorexpression im Systemischen Lupus Erythematodes, ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen der Östrogenmetabolite im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben [179].

Auch dies hat möglicherweise eine veränderte Wirkung auf die Immunantwort zur Folge und spricht für eine Beteiligung von Östrogenen in der Entzündungsreaktion.

„Nicht-klassischer“ Wirkmechanismus von Östrogenen

Die Wirkung der Östrogene ist damit äußerst komplex und in starker Abhängigkeit von der Rezeptorexpression. Neben einer Wirkung von Östrogenen über entsprechende Rezeptoren besteht zusätzlich eine Rezeptor-unabhängige Wirkung (Abb. 6). Zudem kann auch die Wirkung über den Rezeptor in veränderter Weise stattfinden, wobei der Rezeptor nicht als Transkriptionsfaktor agiert und in anderer Weise Einfluss auf die Zelle nimmt (Abb. 5).

In Abhängigkeit des Wirkmechanismus werden die Wirkungen bezeichnet als „genomische“ Wirkungen, in der der Rezeptor, wie bereits beschrieben, als Transkriptionsfaktor agiert, und „nicht-genomische“ Wirkungen. Diese Bezeichnung kann hingegen auch irreführend sein, da auch als „nicht-genomische“ Wirkungen bezeichnete Wirkmechanismen, Einfluss auf die Genexpression nehmen können. Aus diesem Grund wird oftmals auch vom „klassischen“ und „nicht-klassischen“ Wirkmechanismus gesprochen.

Der als nicht-genomische Weg bezeichnete Wirkmechanismus der Östrogene zeichnet sich primär durch seinen rapiden Verlauf aus, welcher unabhängig von der Transkription ist. Hingegen können dennoch genomische Wirkungen indirekter Art nicht ausgeschlossen werden. Die Wirkung kann hier in Abhängigkeit oder unabhängig von den ERs stattfinden. Kriterien des nicht-genomischen Effektes sind eine Wirkung in einer Zeitspanne von wenigen Minuten. Des Weiteren soll er nicht durch Inhibitoren der RNA- und Proteinsynthese zu inhibieren sein und der Effekt durch physiologische Konzentrationen von Steroidhormonen ausgelöst werden.

Diskutierte nicht-genomische Wirkungen sind eine direkte Bindung von Östrogenen an spezifische Strukturen von Zielmolekülen [180], ein membran-assoziiertes Östrogenrezeptor [26], eine Wirkung oder Bindung an transmembrangekoppelte G-Proteine [181] sowie eine veränderte Membranfluidität [182, 183]. Vermutlich verbinden sich einige Östrogenrezeptoren über Caveolin-1 mit der Zellmembran oder formen Komplexe mit G-Proteinen, Striatin, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (z.B. EGFR und IGF-1) oder löslichen Tyrosin-Kinasen (z.B. Src) [162, 184] und modulieren so die Funktion regulatorischer Kinasen (MAPK, PI3K, Tyrosin-Kinasen) oder membran-assoziiertes Moleküle (Ionenkanäle, G-Protein gekoppelte Rezeptoren) [185].

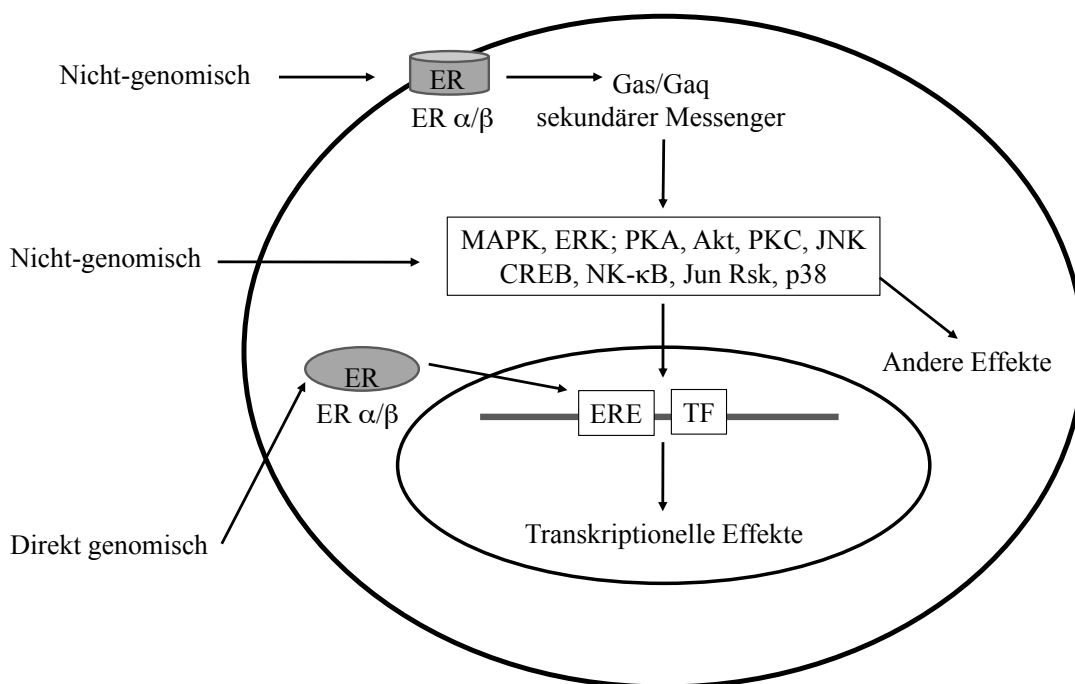


Abb. 5: Direkt genomische, nicht-genomische und indirekt genomische Wirkungen von Östrogenen (modifiziert, basierend auf [186])

Immunstimulatorische Wirkung von Östrogenen auf das Immunsystem

Zusammenfassend erscheint der Einfluss von Östrogen auf das Immunsystem äußerst komplex. Hierbei ist neben der Abhängigkeit von der Rezeptorexpression auch eine Abhängigkeit von Expositionszeitpunkt und Expositionsdauer der Östrogene beschrieben. Ebenfalls gezeigt ist eine Abhängigkeit von der Konzentration der Östrogene, mit bis zu gegenläufigen Effekten in unterschiedlichen Konzentrationen. Generell werden Östrogene als immunstimulatorisch betrachtet. Hinweise und Evidenz geben hier epidemiologische Beobachtungen und *in vitro* Versuche. Ausschließliche epidemiologische Beobachtungen machen es schwierig, zwischen immunstimulatorischen Effekten von Östrogenen und immunsuppressiven von Androgenen zu differenzieren sowie die Beobachtungen in direkte Abhängigkeit zu den Sexualhormonen zu bringen. So bestehen weitere endokrinologische Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Beispielsweise lassen sich in Frauen auch höhere Konzentrationen des ebenfalls als immunstimulatorisch betrachteten Adipokins Leptin finden.

Für einen immunstimulatorischen Effekt von Östrogenen sprechen ebenfalls *in vitro* Versuche. In diesen konnte u. a. eine Erhöhung der Phagozytosefähigkeit, Stimulation der Antikörperproduktion als auch bestimmter T-Zellzytokine durch Östrogene gezeigt werden [176]. Epidemiologische Beobachtungen sowie *in vitro* Versuche geben somit starke Evidenz für eine immunstimulatorische Wirkung von Östrogenen mit der Folge einer veränderten Immunantwort in Frauen.

Androgene

Bildung und Funktion

Androgene sind Sexualhormone, welche für die Ausprägung der männlichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich sind. Zu ihren Vertretern gehören Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androstendion, Androstendiol, Androsteron, Dihydrotestosteron und Testosteron (T). Die Synthese der Androgene findet beim Mann primär in den Leydig-Zellen des Hodens und in der Nebennierenrinde statt, bei der Frau in den Ovarien und ebenfalls in der Nebennierenrinde. Die Konzentration von Testosteron bei Männern reicht dabei von 10-35 nmol/l, bei Frauen liegen prämenopausal Testosteronkonzentrationen von 1,3-2,6 nmol/l, postmenopausal 0,3-0,82 nmol/l vor. Die Funktion der Androgene ist ähnlich den Östrogenen vielfältig. Zu ihren Wirkungen gehören u. a. die Erhaltung der männlichen Merkmale, zudem hemmen sie die Fettablagerung [187], fördern den Muskelaufbau [188] und nehmen Einfluss auf die Psyche und das Verhalten [189]. Gleichzeitig ist eine Wirkung auf das Immunsystem diskutiert [164]. Während für Östrogene eine immunstimulatorische Wirkung beschrieben ist, wird für Testosteron u. a. durch epidemiologische Beobachtungen und *in vitro* Analysen eine immun-suppressive Wirkung postuliert.

„Klassischer“ Wirkmechanismus von Androgenen und Androgenrezeptoren

Die Wirkung der Androgene wird entsprechend der Östrogene primär über spezifische Rezeptoren vermittelt, kann hingegen ebenso rezeptorunabhängig sein. Eine Einteilung erfolgt auch hier nach genomischer und nicht-genomischer Wirkung. Der Androgenrezeptor, auch als NR3C4 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4) bezeichnet, ist, wie der Östrogenrezeptor, ebenfalls ein DNA bindender Transkriptionsfaktor, welcher die Genexpression reguliert [190]. Hierbei sind zwei Isoformen des Androgenrezeptors beschrieben, der Androgenrezeptor A und der Androgenrezeptor B [191]. Aktiviert wird er entweder durch Testosteron oder Dihydrotestosteron [192], was zu Konformationsänderungen des Rezeptors sowie Dimerisierung mit Translokation in den Zellkern führt.

„Nicht-klassischer“ Wirkmechanismus von Androgenen

Neben dem klassischen genomischen Weg wird, ähnlich den Östrogenen, ebenfalls ein nicht-genomischer Signalweg diskutiert. Neben dem zytoplasmatischen Rezeptor wird zudem ein Membranständiger-Rezeptor, eine Interaktion mit speziellen Signaltransduktionsproteinen im Cytoplasma, eine Interaktion mit zytoplasmatischen Androgenrezeptoren sowie ein veränderter Ionentransport beschrieben [193, 194].

Regulation der Testosteronkonzentration unter inflammatorischen Bedingungen und immunsuppressive Wirkung von Testosteron

Die Wirkung von Testosteron wird, wie bereits beschrieben, im Gegenteil zu Östrogen als eine immunsuppressive diskutiert [195]. Interessanterweise kann ein direkter Zusammenhang von inflammatorischen Bedingungen und Testosteron-Konzentration beobachtet werden. So ist eine Abnahme der Serumtestosteronkonzentration während Sepsis, Verbrennungen, Myokardinfarkt oder Operationen beschrieben [196, 197]. Auch experimentelle Virusinfektionen in Makakenaffen führten nach Infektion zu einer Abnahme der Testosteronkonzentration [198]. Als möglicher Mechanismus wird eine Wirkung proinflammatorischer Hormone auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse diskutiert, welche zur Senkung der Testosteronkonzentrationen führen. In Ratten konnte gezeigt werden, dass das proinflammatorische Hormon IL-1 β direkt auf die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse mit Reduzierung der LH Freisetzung wirkt. Zudem wird eine direkte Hemmung der Expression des „Steroidogenic Acute Regulatory“ (StAR) Proteins in Leydig-Zellen durch IL-1 β und TNF- α postuliert [199, 200]. Über Blockierung von StAR wird die Cholesterin-Translokation zur mitochondrialen Membran der Leydig-Zellen unterbunden, somit der erste Schritt der Steroidhormonbiosynthese.

Eine Theorie zur Bedeutung verringerter Testosteronkonzentrationen durch Immunstimulation ist die Annahme, dass hohe Testosteronkonzentrationen ebenfalls mit einem erhöhten Energieverbrauch einhergehen. Aufgrund dessen wird während einer Infektion der Testosteronspiegel gesenkt, um die Energie für das Immunsystem bereitzustellen [195]. Auch direkte immunsuppressive Effekte von Testosteron auf Immunzellen wurden beschrieben. *In vitro* wurde u. a. eine Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase in murinen Makrophagen [201], eine Verringerung der Phagozytose-Kapazität, eine verringerte Zytokinproduktion von Makrophagen [202, 203] sowie eine Reduzierung der T-Helferzellfunktion durch Testosteron beobachtet [204, 205]. Die Bedeutung der Senkung der Testosteronkonzentration unter Infektion könnte somit auch in der funktionellen Verbesserung der Immunfunktion durch verminderte inhibierende Testosteroneffekte liegen.

3.5.3 Einfluss des Ernährungsstatus

Neben dem Geschlecht zeigt auch der Ernährungsstatus Einfluss auf das Immunsystem. Während Untergewicht mit einer verminderten Immunkompetenz in Verbindung gebracht wird, bedingt auch krankhaftes Übergewicht, als Adipositas bezeichnet, eine veränderte Immunantwort [206-208]. So stellt ähnlich dem weiblichen Geschlecht auch Adipositas einen unabhängigen Risikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen dar und auch hier werden hormonelle Faktoren als mitursächlich diskutiert [208, 209]. Die bei Adipositas diskutierten

Hormone mit Einfluss auf die Immunantwort werden als Adipokine bezeichnet und sind vom Fettgewebe sezernierte Substanzen.

Definition, Ursachen und Folgen der Adipositas

Adipositas beschreibt den Zustand einer über normale Maße hinausgehenden Vermehrung des Körperfettanteils [210]. Nach WHO liegt eine Adipositas ab einem Körpermassenindex (BMI) von 30 kg/m^2 vor, wobei 3 Schweregrade unterschieden werden. Es ist hingegen auch bereits ein BMI von $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ als Übergewicht oder Preadipositas klassifiziert (Tab. 4) [211]. Der Körpermassenindex beschreibt das Verhältnis von Körpergröße zu Gewicht. Eine starke Vermehrung der Muskelmasse jedoch geht ebenfalls mit einem erhöhten BMI einher, wird dann hingegen nicht als Adipositas klassifiziert. Die Bezeichnung Adipositas bedingt eine Körperzusammensetzung mit krankhafter Vermehrung des Fettgewebes. In der Betrachtung von Adipositas als Risikofaktor wird zudem nach dem Fettverteilungsmuster differenziert. Intraabdominales Fett wird dabei als verstärkter Risikofaktor für einige mit Adipositas in Verbindung gebrachte Erkrankungen betrachtet [212].

Tabelle 4: Einteilung des Ernährungsstatus nach WHO (nach [211])

Kategorie nach WHO	BMI [kg/m^2]
Untergewicht	<18,5
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht (Präadipositas)	25-29,9
Adipositas Grad I	30-34,9
Adipositas Grad II	35-39,9
Adipositas Grad III (morbid Adipositas)	≥ 40

Als Ursache für die speziell in den industrialisierten Ländern zu beobachtende Zunahme an Adipositas werden die veränderten Lebensbedingungen diskutiert. Diese führen durch verminderte körperliche Belastung und verstärkte Nahrungszufuhr zu einer ungesunden Energiebilanz [213]. Neben veränderten Lebensbedingungen deuten Zwillingsstudien auch eine starke genetische Beteiligung für die Entwicklung einer Adipositas an [214]. Unterstützt wird dies durch Studien, die zeigen konnten, dass ein Zusammenhang zwischen dem BMI adoptierter Kinder zu dem BMI ihren leiblichen Eltern, hingegen nicht zu dem der Adoptiveltern besteht [215].

Die Folge von Adipositas ist ein erhöhtes Risiko verschiedenster Erkrankungen [213]. Zu diesen gehören die typischen Zivilisationserkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Parallel wird ebenfalls eine höhere Inzidenz von Infektionen,

eine höhere Prävalenz bestimmter Autoimmunerkrankungen sowie Asthma postuliert. Beobachtungen, die einen Einfluss von Adipositas auf das Immunsystem wahrscheinlich machen [122, 207, 208, 216-219].

Asthma und Adipositas

Ein besonders interessantes Beispiel für ein verändertes relatives Erkrankungsrisiko in Abhängigkeit von Adipositas ist Asthma. Adipositas erhöht zum einen das relative Risiko an Asthma zu erkranken [217], zum anderen führt sie zur Entwicklung eines schwer zu kontrollierenden Typs von Asthma [220]. Somit besteht eine positive Korrelation der Adipositas nicht nur mit der Inzidenz, sondern auch mit der Ausprägung der Erkrankung. Hierbei deuten Studien auf einen direkten Zusammenhang zwischen BMI und Asthma hin [221]. Ebenfalls wird eine Verbesserung der Erkrankung durch Gewichtsreduktion postuliert [217, 222-224]. Diskutiert werden im Hinblick auf Asthma und Übergewicht u.a. mechanische Faktoren, bedingt durch eine verringerte Lungenfunktion, zu der ein verringertes Atemvolumen sowie eine verringerte funktionale Restkapazität gehören [225]. Aufgrund einer verringerten Volumenkapazität und einer verringerten Dehnung der glatten Lungenmuskulatur besteht eine geringere Kapazität auf physiologische Stressereignisse zu reagieren [225]. Gleichzeitig ist Übergewicht verstärkt mit gastroösophagealen Reflux assoziiert [225]. Direkter Kontakt der Atemwege mit Magensäure führt zur Bronchokonstriktion [226], wobei die Zusammenhänge gastroösophagealen Reflux mit Asthma noch nicht abschließend geklärt sind [225]. Beide Effekte bedingen eine verringerte Lungenfunktion, der klinische Bedeutung in der Assoziation von Asthma und Übergewicht zugeschrieben wird [227]. Neben weiteren genetischen Faktoren, welche eine Assoziation bestimmter Gene mit Asthma als auch Übergewicht beschreiben [225], werden ebenfalls endokrinologische Faktoren mitursächlich für die verstärkte Prävalenz von Asthma in adipösen Personen gemacht [225, 228-230].

Das Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ (Abb. 6) [231], womit eine Veränderung der Fettmasse ebenfalls endokrinologische Änderungen bedingt. Adipositas ist charakterisiert durch einen niedriggradigen Entzündungsstatus, wobei vom Fettgewebe sezernierte proinflammatorische Mediatoren als ursächlich diskutiert werden [124]. Die vom Fettgewebe sezernierten Substanzen werden als Adipokine bezeichnet, bei denen es sich um bioaktive Faktoren handelt, die autokrin, parakrin oder endokrin wirken können [124]. Dabei haben Adipokine vielfältige Wirkungen und nehmen Einfluss auf Appetit, Energiegleichgewicht, Insulinsensitivität, Angiogenese, Blutdruck, Hämostase hingegen ebenfalls das Immunsystem [231].

Zu den vom Fettgewebe sezernierten Substanzen gehören Zytokine, Komplementfaktoren, C-reaktives Protein, Wachstumsfaktoren aber auch Hormone [231]. Gleichzeitig ist das Fett-

gewebe gekennzeichnet durch die Expression bestimmter Enzyme, zu denen u. a. die Aromatase gehört [231]. Hormone, deren primäre Quelle das Fettgewebe darstellt, sind Leptin und Adiponektin, welche in Folge von Fantuzzi et al. [124] als die eigentlichen Adipokine bezeichnet wurden. Andere vom Fettgewebe sezernierte Substanzen werden auch von anderen Geweben in ähnlichem Umfang oder vermehrt sezerniert.

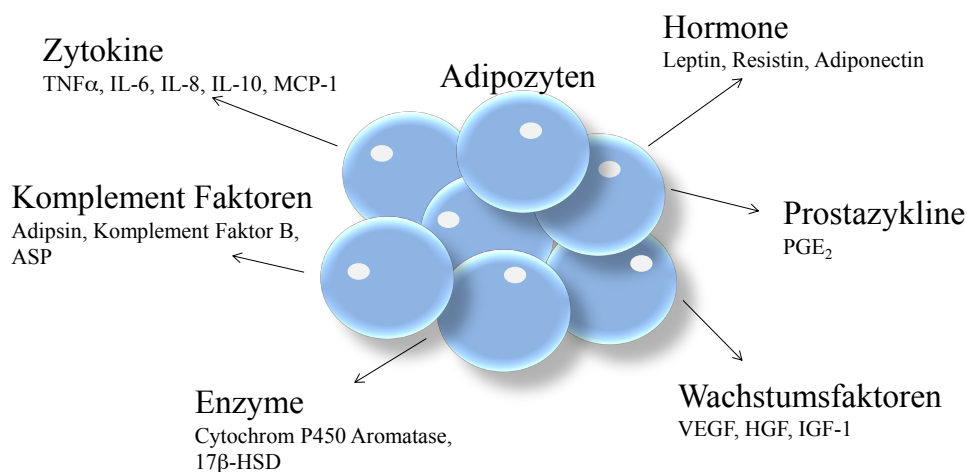


Abb. 6: Vom Fettgewebe sezernierte Substanzen [modifiziert, basierend auf [232]]

Änderungen des Fettgewebe-Sekretionsmusters bei Adipositas

Endokrinologische Änderungen, welche mit Adipositas einhergehen, sind nicht nur durch eine vermehrte Sekretion von Adipokinen gekennzeichnet. Vielmehr lässt sich ein verändertes Sekretionsmuster finden, welches durch eine verstärkte Sekretion inflammatorischer Mediatoren charakterisiert ist [124]. Grob lassen sich die beiden von Fantuzzi et al. [124] als eigentlichen Adipokine bezeichneten Hormone Leptin und Adiponektin in inflammatorisch und antiinflammatorisch einteilen. Leptin wird primär als inflammatorisch betrachtet, Adiponektin als antiinflammatorisch [233]. Der adipöse Zustand ist nun nicht durch eine gleichmäßige Vermehrung von Leptin und Adiponektin charakterisiert. Es kann eine Zunahme von Leptin [234], hingegen keine Zunahme von Adiponektin beobachtet werden. Vielmehr lässt sich ein Trend zu einer Reduktion des Adiponektinspiegels in adipösen Personen finden [235]. Die verstärkte Sekretion proinflammatorischer Substanzen mit verminderter Sekretion antiinflammatorischer Substanzen bedingt in Folge einen niedriggradigen Entzündungsstatus in adipösen Personen [124, 236, 237].

Ursachen für das veränderte Sekretionsmuster des Fettgewebes bei Adipositas

Als Ursache des veränderten Sekretionsmusters bei Adipositas werden proinflammatorische Makrophagen im Fettgewebe von adipösen Personen diskutiert (Abb. 7). Makrophagen stellen einen normalen Bestandteil des Fettgewebes dar, im Fettgewebe adipöser Personen findet sich diese hingegen vermehrt und zudem in veränderter proinflammatorischer Form.

In Folge stellen Makrophagen im Fettgewebe bei Adipositas zum einen selbst eine Quelle proinflammatorischer Mediatoren dar. Eine Vermehrung des Fettgewebes führt ebenfalls zu einer Vermehrung der Makrophagen und deren sezernierter Produkte. Zum anderen werden sie für die verminderte Adiponektin-Sekretion von Adipozyten mitverantwortlich gemacht. Die verstärkte IL-6 und TNF- α Sekretion der inflammatorischen Makrophagen hemmt die Adiponektin-Sekretion von Adipozyten [124, 238] (Abb. 8). Gezeigt werden konnte das TNF- α in der Lage ist, Adiponektin zu hemmen [239]. Die Makrophagen in adipösem Fettgewebe sind hingegen nicht nur durch eine höhere Sekretion von TNF- α charakterisiert. Es scheint vielmehr ein morphologisch als auch funktionell proinflammatorischer Status zu bestehen, dessen Ursache bislang noch nicht vollständig geklärt ist. Als Ursache in der Diskussion steht ein hypoxischer Zustand des Fettgewebes adipöser Personen, welcher zu morphologisch als auch funktionell proinflammatorischen Makrophagen führt [124, 240].

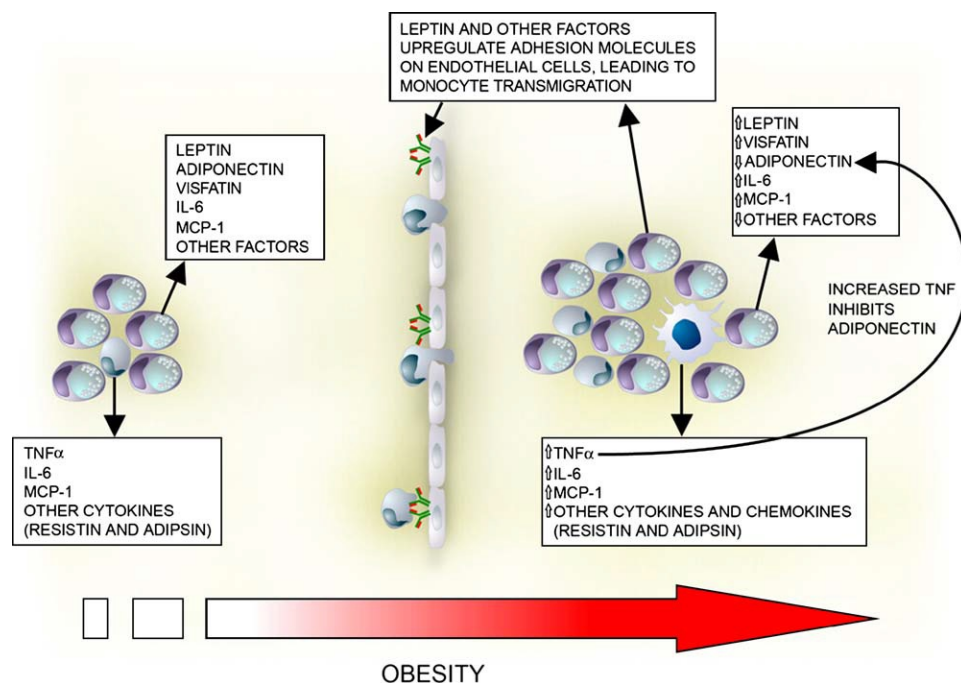


Abb. 7: Morphologische und endokrine Änderungen von adipösem Fettgewebe [124]

Eine Vielzahl von Faktoren wird vom Fettgewebe sezerniert (siehe Abb. 7), weshalb es als endokrines Organ bezeichnet wird. Aufgebaut ist das Fettgewebe aus Adipozyten und der stromalen vaskulären Fraktion, welche bis zu 10% aus Makrophagen besteht. Zu den von

Adipozyten sezernierten Faktoren gehören u. a. Leptin, Adiponektin, Visfatin, IL-6 und MCP-1. Makrophagen sezernieren mitunter TNF- α , IL-6 und MCP-1. Mit steigendem Grad der Adipositas lassen sich morphologische und endokrine Änderungen des Fettgewebes feststellen. Leptin und weitere vom Fettgewebe sezernierte Faktoren führen zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen, gefolgt von einer Monozyten-Transmigration. Mit steigendem Grad der Adipositas lässt sich in Folge einer erhöhte Anzahl an Makrophagen im Fettgewebe finden. Diese Makrophagen zeigen zudem morphologische Veränderungen und reifen zu Riesenzellen heran. Parallel lässt sich ein verändertes Sekretionsmuster beobachten. Unter Adipositas zeigt sich eine erhöhte Leptin-, Visfatin-, IL-6- und MCP-1-Sekretion, während die Adiponektinsekretion erniedrigt ist. Als ursächlich für eine erniedrigte Adiponektinsekretion wird das durch Makrophagen sezernierte TNF- α diskutiert. Neben einer erhöhten TNF- α Sekretion sezernieren diese Makrophagen zudem höhere Konzentrationen an IL-6, MCP-1 und anderen Zytokinen und Chemokinen.

Hypoxischer Zustand des Fettgewebes bei Adipositas

Das Fettgewebe adipöser Personen ist durch einen hypoxischen Zustand gekennzeichnet. Dieser wird auf die verstärkte Hypertrophie und Hyperplasie des wachsenden Fettgewebes zurückgeführt. Die Adipozytengröße kann auf bis zu 140-180 μm Durchmesser zunehmen [241], die Vergrößerung von Adipozyten ist hingegen aufgrund des Diffusionslimits von Sauerstoff, welches bei einem Durchmesser von 100 μm liegt, limitiert.

Angenommen werden kann, dass die Adipozyten adipöser Personen aufgrund ihrer Hypertrophie eine unzureichende Sauerstoffzufuhr haben [241]. Unzureichende Sauerstoffzufuhr kann zu einer verstärkten Apoptoserate der Adipozyten führen, was wiederum eine Makrophageninfiltration bedingen kann [241].

Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate von Adipozyten in adipösen Personen um ein 30-faches erhöht ist [242]. Apoptotische Adipozyten wiederum aktivieren Makrophagen, was in Folge zu einem proinflammatorische Milieu mit Rekrutierung weiterer Immunzellen führt [241]. Es konnte beobachtet werden, dass 90 % der Makrophagen im weißen Fettgewebe bei Adipositas, human als auch murin, um apoptotische Adipozyten lokalisiert sind. Dort formen sie Riesenzellen (Giant cells), welche ein Charakteristikum eines inflammatorischen Zustandes sind [242]. Als Ursache für das veränderte Sekretionsmuster des Fettgewebes bei Adipositas kann somit u. a. der hypoxische Zustand des Fettgewebes betrachtet werden, welcher sowohl mit einer vermehrten Makrophageninfiltration als auch mit einer vermehrten Makrophagenaktivierung einhergeht [241, 242].

Makrophagen im Fettgewebe

Die Anzahl der Makrophagen im Fettgewebe, human sowie murin, ist direkt mit dem Übergewicht sowie der Adipozytengröße korreliert [236, 243]. Der Vergleich weiblicher und männlicher Mäuse zeigt zudem, dass in weiblichen Mäusen eine höhere Anzahl zu finden ist. Die Ursache hierfür ist bislang unklar und es ist fraglich, ob dies ebenfalls human der Fall ist [124]. Induziert wird die Migration durch vom Fettgewebe sezerniert Substanzen, welche Adhäsionsmoleküle u. a. ICAM-1 in Endothelzellen hochregulieren und so zu einer Adhäsion und Transmigration von Monozyten führen [244]. Ein Effekt der durch Leptin imitiert werden kann [244]. Insgesamt lässt sich eine direkte Korrelation von Leptin, TNF- α und IL-6 mit Adipositas feststellen [245]. Makrophagen sind dabei die Hauptquelle von TNF- α und verantwortlich für 50% des vom Fettgewebe sezernierten IL-6 [243].

Fettgewebe und Sexualhormone

Neben Zytokinen exprimiert das Fettgewebe ebenfalls Enzyme unter anderem Aromatase. Aromatase ist das Enzym, welches für die Konvertierung von Androgenen zu Östrogenen verantwortlich ist, womit aus einer Vermehrung des Fettgewebes auch eine verstärkte Expression dieses Enzyms resultiert. Als Folgen werden veränderte Sexualhormonspiegel mit Unfruchtbarkeit bei Männern und Frauen diskutiert [246]. Bei Männern lässt sich zudem eine Verweiblichung (Gynäkomastie) beobachten. Die Veränderungen der Hormonspiegel werden hingegen kontrovers diskutiert. Zum einen wird ein genereller Anstieg der Östrogene in Adipositas beschrieben, zum anderen werden hingegen auch differentielle Effekte in Männern und Frauen postuliert [225, 246, 247]. Bei Männern wird einheitlich eine Zunahme der Östrogene mit Abnahme der Androgene beschrieben, während bei Frauen die Angaben widersprüchlich sind [225, 247]. So wird sowohl eine Zu- als auch Abnahme der Östrogene bei Frauen postuliert [225, 246, 247].

Zumal hormonelle Effekte kontrovers diskutiert sind, wird die Zunahme der Östrogene in Adipositas als mitursächlich für eine verfrühte Menarche bei Mädchen sowie einen verspäteten Pubertätseintritt bei Jungen betrachtet [246]. Möglicherweise ist Ausmaß als auch Zeitpunkt der Adipositas entscheidend für resultierende hormonelle und physiologische Effekte. Während ein Einfluss sich verändernder Sexualhormonspiegel auf das reproduktive System beschrieben ist, werden die steigenden Östrogenkonzentrationen in Adipositas ebenfalls als kausaler Faktor für die Assoziation von Asthma und Adipositas diskutiert [225]. So finden sich Parallelen zwischen der Assoziation des weiblichen Geschlechts und Asthma sowie von Adipositas und Asthma. Entsprechend dem weiblichen Geschlecht ist ebenfalls Adipositas mit einem schweren therapieresistenten Asthma assoziiert [225]. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Östrogenen bei adulten Frauen das relative Risiko für Asthma erhöht [225].

Dies sind Beobachtungen, die Evidenz geben, dass ebenfalls veränderte Spiegel der Sexualhormone an der Assoziation von Adipositas und Asthma beteiligt sein könnten.

Leptin

Bei Leptin handelt es sich um ein 16 kDA großes Peptidhormon, welches vom OB Gen codiert wird [248]. Sezerniert wird Leptin primär von Adipozyten, in geringen Mengen aber auch von der Plazenta, der Magenschleimhaut, dem Knochenmark, dem Brustepithel, dem Skelettmuskel, der Hypophyse und dem Hypothalamus [248-252]. Die Hauptaufgabe von Leptin ist die Appetitkontrolle, wobei die Leptinkonzentration direkt mit der Masse des Fettgewebes korreliert [253]. Die Leptinkonzentration Normalgewichtiger liegt hierbei um etwa 10 ng/ml, bei adipösen Personen bei etwa 30 ng/ml [254]. Interessanterweise kann ebenfalls ein Unterschied der Leptinkonzentration zwischen Männern und Frauen beobachtet werden. Hier weisen Frauen in Abhängigkeit vom Alter eine 1,5 bis 3 fach höhere Konzentration an Leptin im Vergleich zu Männern auf [255]. Parallel zeigen sie hingegen eine erniedrigte Expression des Leptinrezeptors [256].

Mäuse mit Mutationen im OB-Gen (ob/ob) oder dem Leptinrezeptor-Gen (db/db), sowie Menschen mit entsprechenden Mutationen haben starkes Übergewicht [230, 257-260]. Über Wirkung im Hypothalamus hemmt Leptin das Hungergefühl und steigert den Energieverbrauch [248, 261-264]. In adipösen Personen wird eine Störung dieser Regulation, eine sogenannte Leptinresistenz, diskutiert, welche zur Gewichtszunahme beiträgt [265, 266]. Neben der maßgeblichen Beteiligung von Leptin an der Hungerregulation, hat es ebenfalls Einfluss auf die Reproduktion [267], den Knochenstoffwechsel [268], die β -Zellen des Pankreas [269], die Angiogenese [270] aber auch das Immunsystem [124, 125, 271-275].

Wirkung von Leptin auf das Immunsystem

Sowohl Unter- als auch Übergewicht gehen mit einer veränderten Immunantwort einher. Als mitursächlich diskutiert werden u. a. veränderte Leptinkonzentrationen mit Wirkung auf das Immunsystem [208, 273]. Weitere Beobachtungen, die für einen Einfluss von Leptin auf das Immunsystem sprechen, sind erhöhte Leptinkonzentrationen nach Infektion sowie die Induktion von Leptin durch proinflammatorische Zytokine wie TNF, Leukemia Inhibitory Factor oder IL-1 [276-279]. Weiterhin wurden Leptinrezeptoren auf Immunzellen nachgewiesen, was wiederum ein maßgeblicher Hinweis für eine Bedeutung von Leptin im Immunsystem ist [280-283].

Im Allgemeinen wird Leptin als immunstimulatorisch diskutiert, hingegen werden divergente Effekte in unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. Auf T-Zellen wirkt Leptin antiapoptotisch und reguliert die T-Zellproliferation wie –aktivierung [281]. Hierbei wirkt es inhibierend auf die Proliferation von Gedächtnis T-Zellen, hat hingegen einen stimulierenden Effekt

auf naive T-Zellen [273, 274, 284]. Parallel wird ebenfalls eine divergente Wirkung auf verschiedene T-Helfersubtypen diskutiert. So wird die Stimulation des Th1- sowie Hemmung des Th2-Phänotyps postuliert [273, 285].

Hinweis auf entsprechende Effekte von Leptin gaben u. a. tierexperimentelle Studien in Leptin-defizienten Mäusen. In diesen konnte festgestellt werden, dass Mäuse, welche Leptin-defizient sind, eine verringerte Anzahl naiver T-Lymphozyten aufwiesen [273, 286]. Hierbei konnte die Administration von Leptin die Zahlen normalisieren. Zudem ließ sich in diesen Mäusen eine geringere Sekretion der Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- α , und IL-18 sowie höhere Sekretion von IL-10 und IL-4 beobachten. Dies führte zu dem Schluss eines Th1-stimulierenden Effektes von Leptin [273, 286].

Weitere tierexperimentelle Studien mit Fehlfunktionen von Leptin oder dem Leptinrezeptor untersuchten die Wirkung von Leptin auf Makrophagen [272]. Hier wurden Defekte in der Phagozytose, sowie in der Expression inflammatorischer Zytokine *in vivo* und *in vitro* beschrieben. Die Administration von exogenem Leptin *in vivo* und *in vitro* hatte auch hier positiven Einfluss auf sowohl Phagozytose als auch Zytokinproduktion [272]. Auch auf Monozyten hat Leptin stimulierende Effekte. Hier führt es zu einer verstärkten Proliferation und aggraviert die LPS oder PMA induzierte Aktivierung [275].

Adiponektin

Adiponektin wird vom ADIPOQ-Gen codiert. Das Molekulargewicht von Adiponektin ist dabei uneinheitlich, so existiert eine „high-molecular weight“- (HMW) und eine „low-molecular weight“ (LMW) Form [231]. Seine Wirkungen vermittelt Adiponektin über verschiedene Rezeptoren [287-289]. Identifiziert sind bislang der Adiponektin-Rezeptor 1, der Adiponektin Rezeptor 2 und T-Cadherin [288, 289]. Die Adiponektin 1- und 2 Rezeptoren zeigen Homologie zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren, während T-Cadherin zu Rezeptoren der Cadherin Familie gehört [288, 289]. Im Vergleich zu den Leptinkonzentrationen, welche im ng/ml Bereich liegen, befinden sich die Adiponektinkonzentrationen im μg Bereich um ein vielfaches höher. Während die Leptinkonzentration in adipösen Personen erhöht ist, lässt sich für Adiponektin ein Trend zu einer Reduktion in Adipösen [235] und einer Erhöhung in anorektischen Personen feststellen [290].

Eine Bedeutung hat Adiponektin u.a. im Glukosestoffwechsel [291], in der Insulinsensitivität [292, 293], im Lipidkatabolismus [291], im Energiemetabolismus und in der Immunregulation [294-297].

Wirkung von Adiponektin auf das Immunsystem

Beschriebene Wirkungen von Adiponektin auf das Immunsystem sind eine Inhibition der TNF- α und IL-6 Sekretion sowie eine Induktion von IL-10 und dem IL-1-

Rezeptorantagonist [294-297]. Auch postuliert wurde eine Inhibition von NF κ B [297] sowie eine Reduktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM [298, 299]. Zusammenfassend wird eine antiinflammatorische Wirkung von Adiponektin auf das Immunsystem postuliert.

3.5.4 Sexualhormone und Leptin

Wie bereits beschrieben, ist der Hormonhaushalt von Frauen nicht einzig durch höhere Konzentrationen von Östrogenen charakterisiert, es zeigen sich gleichzeitig auch höhere Konzentrationen des ebenfalls als immunstimulatorisch betrachteten Hormons Leptin [300]. Fraglich ist, inwieweit dies im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Immunantworten zwischen den Geschlechtern steht.

Interessanterweise lässt sich ein direkter Zusammenhang der Sexualhormone mit Leptin beobachten. So konnte gezeigt werden, dass 17 β -Östradiol die Leptinsekretion induziert [300], während Testosteron selbige hemmt [301]. Auch eine Regulation der Leptinrezeptorexpression durch 17 β -Östradiol ist beschrieben, wobei Frauen im Vergleich zu Männern durch eine verminderte Expression der Leptinrezeptoren gekennzeichnet sind [256]. In der Gesamtheit sind dies Hinweise für einen engen Zusammenhang der Sexualhormone mit Leptin.

Auch auf Immunzellen sind sowohl Rezeptoren als auch Wirkungen der Sexualhormone und Leptin beschrieben [127, 137, 163, 177, 178, 202, 205, 280-283, 302]. Die Frage, die sich stellt, ist inwieweit diese Hormone hier möglicherweise zusammenwirken. Die Beobachtung, dass Östrogen Leptin induziert und beide Hormone als immunstimulatorisch betrachtet werden, lässt die Vermutung zu, dass diese Hormone möglicherweise synergistische Wirkungen entfalten.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass bei Asthma ein engerer Zusammenhang der Leptinkonzentration mit der Erkrankung in Frauen als in Männern postuliert wurde [228]. Möglicherweise aufgrund einer synergistischen Wirkung von Leptin mit Östrogenen, welche in Folge den Effekt von Leptin verstärken. Frauen weisen zudem ein verändertes relatives Mortalitätsrisiko Adipositas-assoziiierter Erkrankungen als Männer auf [225, 303]. Weiterhin ist unklar, inwieweit eine veränderte Wirkung adipositas-assoziiierter Faktoren (z. B. Leptin), möglicherweise über Interaktionen mit den Sexualhormonen, in Männern und Frauen besteht.

3.6 Bedeutung CD4⁺ T-Zellsubpopulationen

Das Immunsystem ist ein körpereigenes Abwehrsystem zum Schutz vor Erkrankungen. Abhängig von der Art der Immunantwort wird das innate von dem adaptiven Immunsystem unterschieden.

Die innate Immunabwehr stellt die frühe Abwehrreaktion des Körpers gegen Krankheitserreger bereit. Nur ein Pathogen, welches diese erste Abwehr durchbricht, löst eine adaptive Immunantwort aus. Im Gegensatz zur adaptiven ist die innate Immunabwehr eine eher unspezifische Abwehrreaktion des Körpers, deren beteiligte Proteine im Genom festgelegt sind und nicht angepasst werden können. Sie besteht aus zellulären und biochemischen Abwehrmechanismen, die bereits vor der Infektion stehen, um eine schnelle Reaktion zu ermöglichen. Durchbricht ein Pathogen diese erste Abwehr, stellt die innate Immunabwehr zudem die Weichen für die adaptive Immunabwehr. Durch ein spezifisches Zytokinmilieu kann sie die Richtung in eine mehr humorale oder zelluläre adaptive Immunabwehr vorgeben [304-306]. Im Gegensatz zur Innaten ist die adaptive Immunabwehr hochspezifisch und zeichnet sich durch Ausbildung eines Gedächtnisses aus. Dieses ermöglicht es auf erneuten Antigenkontakt verstärkt und verbessert zu reagieren. Vermittelt wird die adaptive Immunantwort von Lymphozyten, zu denen B-Zellen und T-Zellen gehören. Unterschiedliche Krankheitserreger induzieren hierbei verschiedene adaptive Immunantworten, welche sich unter anderem durch die Induktion unterschiedlicher T-Zellsubpopulationen auszeichnen [304-306]. Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

T-Zellen werden zunächst nach CD4⁺- und CD8⁺-Expression unterschieden [307]. CD4⁺ T-Zellen werden als T-Helferzelle bezeichnet, wobei mehrere Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen sowie Bedeutung in Physiologie als auch Pathophysiologie differenziert werden [2, 9, 308]. Die Induktion der für die Infektion entsprechenden Subpopulation ist dabei für die Klärung der Infektion von entscheidender Bedeutung [9, 309]. Unterschieden werden u. a. Th1-, Th2-, Th17- sowie Th22-Zellen, welche an der Abwehr unterschiedlicher Krankheitserreger beteiligt sind (Abb. 8). Gleichzeitig werden entsprechende Subpopulationen in Verbindung mit pathologischen Bedingungen, zu denen die allergische Soforttypreaktion als auch Autoimmunerkrankungen gehören, gebracht [309] (Abb. 8). Als Gegenspieler entsprechender T-Zell-Populationen können die regulatorischen T-Zellen betrachtet werden. Diese sind verantwortlich für die Limitierung und Regulation der Immunantwort sowie die Erhaltung der Toleranz gegen Selbstantigene und körperfremde harmlose Antigene [309].

Th1-Zellen

CD4⁺ T-Zellsubpopulationen wurden erstmals in den 80iger Jahren beschrieben [310, 311], wobei zunächst nur ein Konzept der Th1- und Th2-Zellen bestand, welches später erweitert wurde.

Die Rolle der Th1-Zellen wird primär in der Abwehr intrazellulärer Erreger, wie Bakterien, Viren aber auch Parasiten eingeordnet, wobei ihre Hauptaufgabe in der Phagozytenaktivierung liegt [312]. Über die Produktion von IFN- γ sind sie zudem beteiligt am Isotypwechsel zu Komplement bindenden und opsonisierenden IgG-Antikörpern [310, 313]. Parallel werden sie als Effektorzellen in pathologisch fehlgeleiteten Immunantworten auf Selbstantigene, in sogenannten Autoimmunerkrankungen, diskutiert [8]. Hier kann ihre inadäquate Aktivierung und Reaktion auf Selbstantigene zu pathologischen Gewebeschäden- sowie im schlimmsten Fall zur Gewebeerstörung führen [8, 309, 314-316]. IFN- γ ist dabei das Marker- und gleichzeitig wichtigste Effektorzytokin der Th1-Zellen und maßgeblich beteiligt an der Makrophagenaktivierung [9, 312].

Induziert und unterstützt wird die Th1-Zell-Differenzierung durch die Zytokine IL-12, IL-18 sowie Typ 1 Interferone, welche Infolge von Infektionen von der innate Immunabwehr gebildet werden [9, 312, 317, 318]. Die Zytokine IFN- γ und IL-12 aktivieren die Transkriptionsfaktoren T-Bet, STAT1 und STAT4, welche maßgeblich an der Th1-Differenzierung beteiligt sind [312]. T-Bet wird hierbei als Masterregulator der Th1-Differenzierung betrachtet [312]. Das Markerzytokin der Th1-Zellen, IFN- γ , amplifiziert die Th1-Differenzierung und inhibiert die Differenzierung von Th2- und Th17-Zellen [318, 319].

Weitere Faktoren, welche die Th1-Zell Differenzierung beeinflussen, sind die Menge und Art des Antigens und der Antigenpräsentation [320, 321]. Hohe Mengen an Antigenen, sowie Peptide mit einer starken T-Zellrezeptor-Wirkung lösen dabei eher Th1-Antworten aus [320, 322, 323]. Es bestehen auch Studien mit gegenteiligen Ergebnissen, womit dieser Punkt kritisch zu betrachten ist [321].

Auch die Peptidsequenz kann Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung ausüben. So induzieren Peptide, die sich mit hoher Affinität an die MHC-Klasse-II-Moleküle anlagern und daher auf APZ sehr dicht gedrängt vorkommen, ebenfalls eher eine Th1-Antwort [321]. Die meisten Proteinantigene hingegen lösen sowohl Th1- als auch Th2-Antworten aus. Ursächlich sind möglicherweise unterschiedliche Peptidsequenzen innerhalb der Proteine, welche mit unterschiedlicher Affinität an die MHC-Klasse-II-Moleküle binden und so zu unterschiedlicher Dichte auf den APZ führen [320, 321]. Angenommen wird, dass auf bestimmte Peptidsequenzen des Proteins eine Th1- und auf andere eine Th2-Antwort induziert wird [320].

Th2-Zellen

Die Rolle der Th2-Zellen wird im Gegensatz zu Th1-Zellen primär in der Abwehr extrazellulärer Erreger eingeordnet [324]. Th2-Zellen spielen dabei eine wichtige Rolle in der humoralen Immunabwehr und aktivieren speziell bei Primärreaktionen höchst effektiv B-Zellen. Th2-Zellen sind damit besonders in der Abwehr spezieller extrazellulärer Erreger sowie Helminthinfektionen von Bedeutung [324]. Von Th2-Zellen sekretiertes IL-4 kann zudem in B-Zellen den Isotypwechsel zu IgE induzieren. IgE ist ein Antikörper mit Bedeutung in der Abwehr von Helminthinfektionen, hingegen ebenso maßgeblich beteiligt an der allergischen Soforttypreaktion, einer fehlgeleiteten Immunantwort auf eigentlich harmlose Antigene [324].

Induziert wird die Th2-Differenzierung durch die Zytokine IL-4 und IL-6, wobei IL-4 die größere Bedeutung zukommt [324]. Die ursprüngliche Quelle von IL-4 ist noch nicht abschließend geklärt, wobei NK-T1 Zellen, Mastzellen, Eosinophile - aber auch Basophile Granulozyten in der Diskussion stehen. Eine weitere Theorie ist, dass die T-Zelle selbst die primäre Quelle ist [324]. Hierbei wird angenommen, dass, sofern eine T-Zellstimulation erfolgt, hingegen keine starke innate Immunantwort induziert wurde und Th1-induzierende Zytokine wie IL-12 fehlen, dass von der T-Zelle nach Antigenaktivierung selbst produzierte IL-4 die T-Zelldifferenzierung induziert [324]. Auch ist ein positiver Einfluss von IL-10, TGF- β , Kortikosteroiden, Vitamin D3 und PGE₂ auf die Th2-Zelldifferenzierung postuliert [101]. Das für die Th2-Differenzierung nötige IL-4 aktiviert STAT-6. STAT-6 zusammen mit der Aktivierung des T-Zellrezeptors induziert in Folge die Expression von GATA3, dem Masterregulator der Th2-Differenzierung [310, 311, 324-326]. GATA-3 führt zur verstärkten Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 aber auch IL-10, welche kennzeichnend für Th2-Zellen sind [310, 311, 324-326]. Ähnlich den Th1-Zellen, amplifiziert das von Th2-Zellen produzierte IL-4 die Th2 Entwicklung und hemmt die Generation der anderen T-Zellsubpopulationen, der Th1-, Th17- sowie regulatorischen T-Zellen (Tregs) [327-329].

Gegensätzlich zur Th1-Differenzierung wird die Th2-Differenzierung durch sehr geringe Antigenmengen sowie eine geringe Antigenpräsentation auf der Oberfläche von APZ induziert [9, 320, 322, 323]. Ebenfalls gegenläufig zur Th1-Differenzierung begünstigt eine schwache Wechselwirkung mit dem T-Zellrezeptor die Differenzierung zu Th2-Zellen [9, 321].

Th17-Zellen

2005 wurde schließlich eine weitere eigenständige T-Zellsubpopulation beschrieben, die Th17-Zellen [330]. Im Gegensatz zu Th1- und Th2-Zellen, welche numerisch benannt sind, wurden die Th17-Zellen nach ihrem Leitzytokin, dem IL-17 benannt. Die Rolle der Th17-Zellen wird ebenfalls in der Abwehr extrazellulärer Erreger, primär bei Bakterien- und Pilz-

infektionen, eingeordnet. Hier kommt ihnen unter anderem Bedeutung in der Aktivierung und Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten zu [331]. Parallel werden sie auch als maßgeblich beteiligt an der Pathogenese einiger entzündlicher Autoimmunerkrankungen diskutiert [8].

Die Differenzierung von Th17-Zellen wird durch die Zytokine IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23 induziert, wobei IL-23 weniger für die Induktion als vielmehr für die Erhaltung und weitere Stabilisation des Phänotyps von Bedeutung ist [331]. Entscheidende Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von Th17-Zellen sind dabei ROR-C und STAT3 [9]. Charakterisiert sind Th17-Zellen durch die Sekretion der Zytokine IL-17, IL-22, TNF- α und IL-6 [330, 332-335]. Beschriebene Zytokine mit inhibierender Wirkung auf die Th17-Differenzierung sind IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-25 und IL-27 [336-340]. Gleichzeitig zeigen Th17-Zellen eine reziproke Verbindung zu induzierbaren regulatorischen T Zellen [341], welche sich durch immunsuppressive und regulatorische Eigenschaften auszeichnen [9, 342]. Beide T-Zelltypen werden durch TGF- β induziert. Die Zugabe von IL-6 unterdrückt Tregs und induziert Th17-Zellen [335]. Hohe TGF- β Konzentrationen und eine Überexpression von Foxp3 können zu einer Herunterregulation von Th17-Genen führen, gefolgt von einer Konversion von Th17 zu Treg [343, 344]. Umgekehrt ist eine Herunterregulation von Foxp3 durch IL-6 und TGF- β mit verstärkter Th17-Genexpression gezeigt [344, 345].

Th22-Zellen

Th22-Zellen sind eine jüngst beschriebene T-Zellsubpopulation, von der angenommen wird, dass sich ihre Funktion stark auf epitheliale Barrieren und Gewebe beschränkt, wo sie an der Abwehr mikrobieller Pathogene sowie Wundheilung und Gewebeumbau beteiligt sind [346]. Gleichzeitig deuten einige Studien eine pathologische Funktion und Beteiligung an Hauterkrankungen an, zu denen Psoriasis, das atopische Ekzem sowie die allergische Kontaktdermatitis gehören [347-350]. Die Bedeutung, speziell in der Haut, deutet die Expression der Haut-homing Rezeptoren CCR4, CCR6 und CCR10 an [346, 351]. Th22-Zellen sezernieren IL-22, hingegen kein IL-17 oder IFN- γ [346, 351-353]. Der Rezeptor für IL-22 findet sich ebenfalls nur auf Gewebezellen, was die Bedeutung dieser Zellen an epithelialen Barrieren und in Geweben unterstreicht [348]. IL-22 führt hier zur Induktion antimikrobieller Peptide sowie von Defensinen [354]. Zusammen mit TNF- α führt es des Weiteren zur Induktion von Komplementfaktoren und antimikrobiellen Chemokinen in Keratinozyten [346, 355]. Gleichzeitig ist die Expression von Fibroblastenwachstumsfaktoren sowie des PDGF-Rezeptors beschrieben [346].

Induziert werden Th22-Zellen durch die Zytokine TNF- α und IL-6, wobei noch kein Transkriptionsfaktor identifiziert werden konnte [351]. Ähnlich Th17-Zellen exprimieren Th22-Zellen hingegen ebenfalls den Arylhydrocarbon Rezeptor, dem maßgebliche Beteiligung an

der Zytokinsekretion von IL-17 und IL-22 zugeschrieben wird. Es konnte gezeigt werden, dass ein Ligand des AHR die IL-17 Produktion inhibiert und die IL-22 Sekretion stimuliert [352, 356]. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Arylhydrocarbon Rezeptor möglicherweise an dem Gleichgewicht zwischen Th22- und Th17-Zellen beteiligt ist [352, 356]. Ungeklärt ist bislang, ob es sich dabei um den Haupttranskriptionsfaktor der Th22-Zellen handelt.

Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung der Selbsttoleranz, aber auch für die Regulation der Immunantwort auf Pathogene [342]. Unterschieden werden die natürlich vorkommenden Tregs von den induzierbaren Tregs (iTregs). Natürlich vorkommende Tregs entwickeln sich im Thymus und zeichnen sich durch CD4 und hohe CD25 Expression sowie die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 aus (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) [342, 357].

Induzierbare regulatorische T-Zellen entwickeln sich aus CD4⁺CD25⁺Foxp3-Zellen nach T-Zellrezeptor Stimulation in Gegenwart von TGF- β und IL-2 [341, 342, 358]. Beide regulatorischen T-Zellpopulationen können ihre regulatorische Funktion durch Zellkontakt, aber auch lösliche Mediatoren vermitteln [342, 358, 359]. Zu den löslichen Mediatoren gehören die Zytokine IL-10, IL-35 und TGF- β [342, 358, 359]. Regulatorische T-Zellen sind so in der Lage verschiedene Immunzellen zu unterdrücken, darunter CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Osteoblasten, Mastzellen, NK-Zellen und NKT-Zellen. Somit sind sie in der Lage die Immunantwort auf Pathogene aber auch nicht-pathogene Antigene und Allergene zu kontrollieren [360]. Dysfunktion oder Fehlen regulatorischer T-Zellen wird mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen sowie der Soforttypallergie in Verbindung gebracht [361, 362].

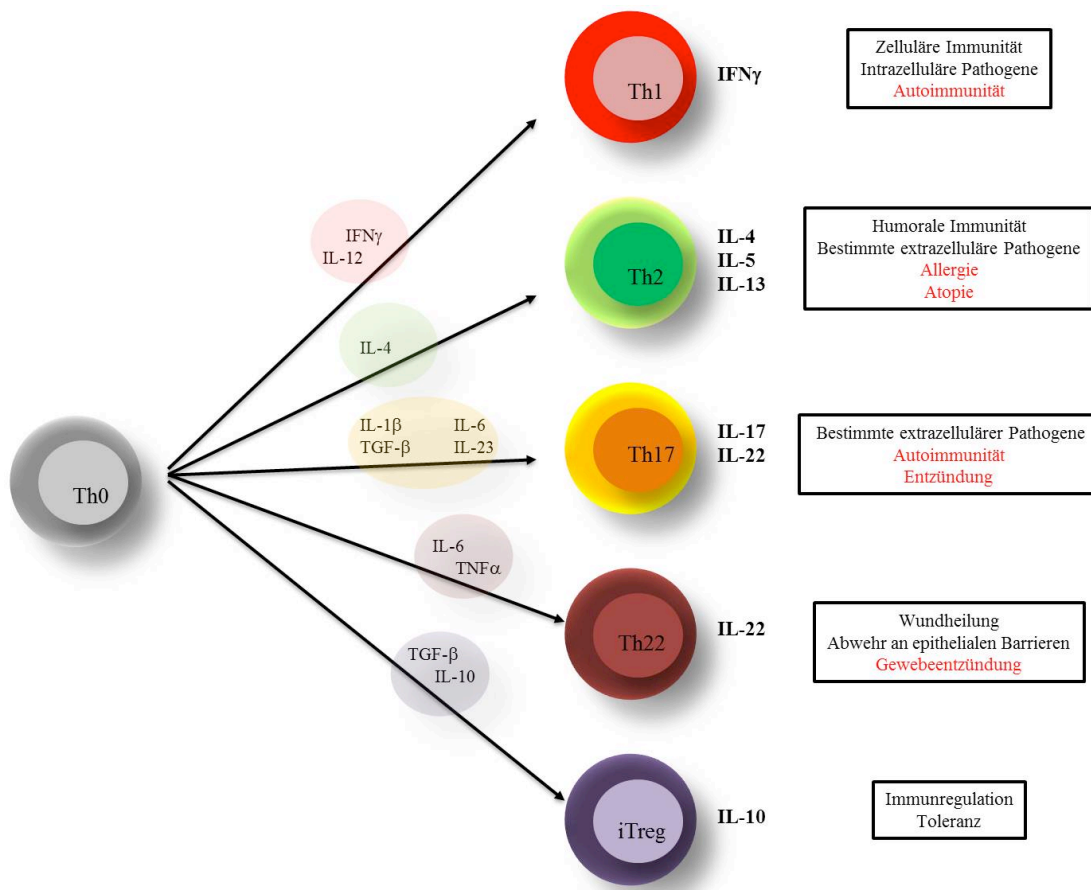


Abb. 8: T-Zellsubpopulationen und assoziierte Erkrankungen

4 Ziel der Studie

Allergische Erkrankungen beschreiben eine fehlgeleitete Immunantwort gegen eigentlich harmlose Umweltantigene. Die Ursachen, die zur Entstehung führen, sind bislang unklar. Diskutiert werden extrinsische als auch intrinsische Faktoren.

Zu den extrinsischen in der Diskussion stehenden Faktoren gehört die zunehmende Urbanisierung.

Im ersten Teil dieser Studie sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wird die Allergenität von Pollen durch die zunehmende Urbanisierung beeinflusst? Welche Faktoren natürlichen oder anthropogenen Ursprungs stehen in Zusammenhang mit der Allergenität von Pollen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Birken von unterschiedlichen Standorten ausgewählt, eingehend charakterisiert und in Bezug zur Allergenität des Pollens gesetzt.

Durch Bestimmung von Allergen sowie PALMs und Adenosin in Pollen, sollte geklärt werden, inwieweit Allergengehalt sowie adjuvante immunmodulatorische und –stimulatorische Faktoren durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Mittels weiterer *in vitro* Zellassays sowie *in vivo* Pricktests sollte die physiologische Relevanz gemessener Parameter beurteilt werden.

Neben dem Allergen sind adjuvante immunmodulatorische Faktoren in Pollen bekannt geworden, welche mitverantwortlich für die Immunreaktion gemacht werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte daher die Frage beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben Allergen-unabhängige Faktoren aus Pollen auf die Sofortreaktion der Allergie?

Hierfür sollten Stimulationsversuche mit der Mastzelllinie LAD2 sowie humanen basophilen Granulozyten als auch Pricktestungen mit WPE durchgeführt werden.

Neben extrinsischen Faktoren werden auch intrinsische Faktoren, unter diesen Sexualhormone und Adipokine, als mitbeteiligt an der Immunantwort mit Einfluss auf die Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen diskutiert.

Im zweiten Teil dieser Studie sollten daher folgende Fragen beantwortet werden:

- Haben Hormone wie 17 β -Östradiol eine immunstimulatorische Wirkung auf das Immunsystem? Welche Wirkung haben 17 β -Östradiol und Testosteron auf Monozyten? Welche Wirkung haben 17 β -Östradiol und Testosteron auf T-Zellen?

Weiter stellt sich die Frage, welchen immunologischen Zusammenhang die Sexualhormone mit Leptin haben. Aufgrund der Beobachtung, dass 17 β -Östradiol Leptin induziert und beide Hormone als immunologisch wirksame Hormone diskutiert werden, könnte angenommen werden, dass diese Hormone möglicherweise synergistische Wirkungen auf Zellen des inna-ten oder adaptiven Immunsystems entfalten.

Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil dieser Studie weiter geklärt werden:

- Haben 17 β -Östradiol und Leptin synergistische Wirkung? Wie wirken Testosteron und Leptin zusammen?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollten Monozyten und T-Zellen unter Inkubation erhöhter 17 β -Östradiol- als auch Testosteron-Konzentrationen sowie in Koinkubationen mit Leptin stimuliert werden und auf Unterschiede in Überlebensrate, Proliferation und Zytokinprofil untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Studie tragen zum weiteren Verständnis der extrinsischen sowie intrinschen Immunmodulation bei. Es werden Hinweise gegeben, inwieweit die zunehmende Urbanisierung den Allergenträger beeinflusst und was dies für die Prävalenz als auch Ausprägung der Pollenallergie in Zukunft bedeutet. Zudem trägt diese Studie zum besseren Verständnis adjuvanter Pollenfaktoren in der Soforttypreaktion bei.

Der zweite Teil dieser Studie kann Hinweise geben, inwieweit Sexualhormone und Leptin einen prädispositionierenden Faktor für bestimmte Erkrankungen darstellen könnten und wieweit eine Immunmodulation durch diese Hormone stattfindet.

Zusammenfassend sollen die Ergebnisse dieser Studie helfen, extrinsische als auch intrinsische Risikofaktoren für allergische Erkrankungen zu identifizieren. Dadurch könnten individuelle Risikoeinschätzungen nach Umweltbedingungen und endokrinologischen Parametern verbessert und möglicherweise Therapie- als auch präventive Strategien entwickelt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Probandencharakterisierung

Das Serum der Probanden wurde auf Gesamt-IgE und spezifisches IgE gegen übliche Allergene gescreent. Auf der Grundlage der IgE-Konzentration fand eine Einteilung in Atopiker und Nicht-Atopiker statt. Der Nicht-Atopiker war charakterisiert durch ein Gesamt IgE < 100 kU und keine Sensibilisierung gegen eines der getesteten Allergene. Die Einteilung in Atopiker erfolgte bei einem Gesamt IgE > 100 kU und einer Sensibilisierung gegen mindestens ein getestetes Allergen.

Für die Untersuchungen zu immunologischen Effekten der Sexualhormone 17 β -Östradiol (Reagenzien aufgeführt im Anhang), Testosteron und Leptin wurden nur weibliche Probanden im Alter zwischen 18 und 45 Jahren ausgewählt.

5.2 Birkenphänologie und Pollenaufbereitung

Auswahl der Birken

Es wurden 40 Birken in München und dessen nördlichen Umland ausgewählt (Abb. 9), welche während der Birkenpollensaison im Jahr 2010 beprobt wurden. Die Beprobung fand zu einem definierten Zeitpunkt statt, dem phänologischem Entwicklungsstadium 60/61. (Abb.: 10).

Die Birken wurden nach ähnlicher Größe und ähnlichem Alter ausgewählt und beschränkten sich auf eine Spezies (*Betula pendula*), womit ein Einfluss dieser Parameter auf die zu analysierenden Parameter minimiert werden sollte. Mittels eines Urbanisationsindex (UI) (Jochner et al. 2012) wurde der Urbanisationsgrad der Birkenstandorte definiert. Der UI diente zudem der Einteilung der Birken in urbane und rurale Bäume. Zusätzlich wurden die Standorte mittels Temperatur-, NO₂- und Ozon-Messungen charakterisiert.

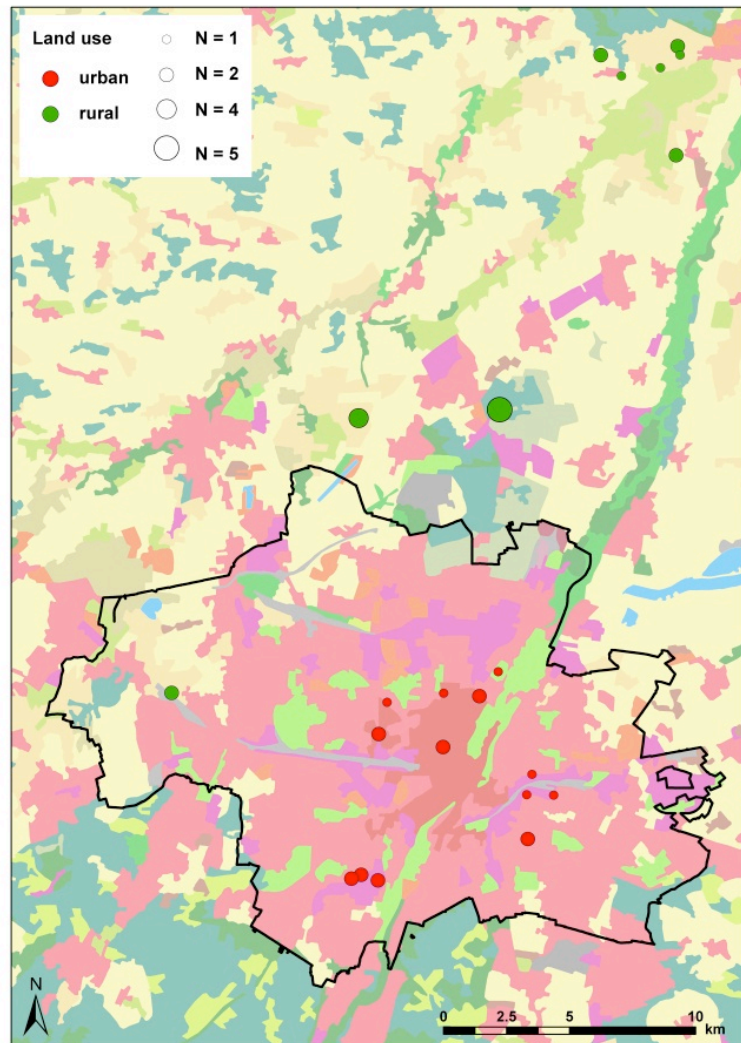


Abb. 9: Lage der ausgewählten Birken (n=40) in München und dessen nördlichen Umland. Urban: n=20, rural: n=20; Kreisgröße symbolisiert die Anzahl der Birken pro Standort. Hintergrund: Corine Landcover 2000 (EEA 2000), rot: urbane Landnutzung, grün: Waldgebiete, beige: Acker, blau: Flüsse und Seen.

Phänologische Beobachtungen und Birkenkartierschlüssel

Um den Einfluss des Entwicklungsstandes der Kätzchen und somit den Reifegrad des Pollen auf die zu untersuchenden Parameter zu minimieren, wurden phänologische Beobachtungen der zu beprobenden Birken durchgeführt. Diese stellten sicher, dass sich alle Kätzchen bei Sammlung im selben und zudem maturen Entwicklungsstadium befanden. Die phänologischen Beobachtungen erfolgten alle 1 bis 3 Tage und die phänologische Entwicklung wurde anhand eines auf der Grundlage des BBCH-Codes entwickelten Birkenkartierschlüssels bestimmt (Abb. 10). Die Kätzchensammlung der 40 beprobten Birken erfolgte im Entwicklungsstadium Code 60 und 61. Code 60 definierte das Stadium, in dem Kätzchen vereinzelt Pollen frei geben, Code 61 das Stadium, in dem bis zu 10% der Kätzchen Pollen frei geben. Die Stadien 60 und 61 wurden gewählt, da es sich bei dem Pollen dieser Stadien um mature Pollen handelt und gleichzeitig die Bestimmung der Pollenmenge möglich macht.

Code	Visuelle Darstellung	Erläuterung der Phase
50		Winterruhe: Kätzchen braun und nicht gestreckt
51		Einsetzen des Wachstumsvorgangs: erste grüne Stellen sichtbar, jedoch unbedeutende Streckung
52		stärkere Dehnung der Kätzchen, leichte Dehnungsrisse, Pollenanlagen nur durch Biegen sichtbar
55		starke Dehnungsrisse erkennbar, braune Deckschuppen lösen sich, Pollenanlagen bereits ohne Biegen sichtbar
59		maximale Streckung erreicht, Pollenanlagen sind deutlich sichtbar, Blütenstaub wird jedoch noch nicht freigegeben
60		nur ganz vereinzelt geben Kätzchen Pollen frei
61		Beginn der Blüte: etwa 10 % der Kätzchen stäuben leicht
63		mehr als 10 %, aber weniger als 50 % der Kätzchen stäuben
65		Vollblüte: über 50 % der Kätzchen stäuben
67		abgehende Blüte: weniger als 50 % der Kätzchen stäuben noch
68		nur noch wenige Kätzchen stäuben, der Großteil stäubt nicht mehr
69		Ende der Blüte: Kätzchen stäuben nicht mehr, sind aber noch nicht abgefallen
69n	X	Großteil der Kätzchen bereits abgefallen

Abb. 10: Birkenkartierschlüssel zur Bestimmung des Reifegrades der Kätzchen, nach einer Erweiterung des BBCH-Codes von Jochner S

Pollensiebung und Bestimmung der Kätzchencharakteristika

Nach der Sammlung wurden die Kätzchen zunächst für 24 Std. getrocknet, im Anschluss gezählt, gewogen und zerkleinert. Zur Gewinnung des Pollens wurden die zerkleinerten Kätzchen nacheinander durch zwei Siebe der Größen 100 µm und 71 µm gesiebt. Der erhaltene Pollen wurde nach der Siebung ebenfalls gewogen und bis zu den weiteren Analysen bei -80°C eingefroren.

Die bestimmten Kätzchencharakteristika waren (1) Einzelkätzchengewicht, (2) das Gewichtsverhältnis von Pollen zu Kätzchen (Ratio Pollen/Kätzchen) und (3) die Menge Pollen pro Kätzchen (Pollen [g]/Einzelkätzchen).

Die Kätzchencharakteristika wurden wie folgt berechnet:

$$(1) \text{ Einzelkätzchengewicht [g]} = (\text{Kätzchengewicht [g]} - \text{Pollen [g]}) / \text{Kätzchenanzahl [n]}$$

$$(2) \text{ Ratio Pollen/Kätzchen} = \text{Pollen [g]} / (\text{Kätzchengewicht [g]} - \text{Pollen [g]})$$

$$(3) \text{ Pollen/Einzelkätzchen [g]} = \text{Pollen [g]} / \text{Kätzchenanzahl [n]}$$

5.3 Bestimmung atmosphärische Konzentration NO₂ und Ozon

Mittels Ozon- und NO₂-Passivsammlungen wurde die Ozon- und NO₂-Belastung der ausgewählten Birken bestimmt. Die Bestimmung diente der Standortcharakterisierung und wurde zur Analyse des Zusammenhangs von Ozon- und NO₂-Konzentration mit den Parametern der Kätzchencharakteristika als auch den Parametern der Allergenität verwendet. Zum Weiteren diente die NO₂-Konzentration als Indikator der Verkehrsbelastung der Standorte. Die Passivsammlungen wurden für alle 40 Standorte parallel im Zeitraum vom 11.05.-18.05.2010 durchgeführt.

Passivsammlung NO₂

Die NO₂-Bestimmung erfolgte mittels Passivsammler direkt an den zu beprobenden Birken. Pro Baum wurden zwei Passivsammler (Plexiglasröhrchen) angebracht, aus denen ein Mittelwert berechnet wurde. Die Passivsammler enthielten drei Edelstahlnetze, welche mittels Triethanolamin-Lösung beschichtet wurden. Das Prinzip ist die Bindung von NO₂ an die beschichteten Edelstahlnetze durch Ausbildung eines Triethanoldiamin-NO₂-Komplexes. Zum Schutz vor Witterungseinflüssen wurden die Röhrchen in einer Aufhängedose angebracht, die in zwei bis drei Metern Höhe am Baum befestigt wurde. Zum Start der NO₂-Messung wurde die untere Verschlusskappe geöffnet und der genaue Expositions-Start-

Zeitpunkt notiert. Nach einem einwöchigen Expositionszeitraum wurden die Passivsammler wieder verschlossen und das Ende der Messung notiert.

Vor Exposition (Beschichtung der Netze):

Zur Beschichtung wurden die Edelstahlnetze (40 Maschen/inch, 11 mm Durchmesser) für 10 Sekunden in eine Triethanolamin-Lösung getaucht (1:7) und anschließend für 10 Minuten luftgetrocknet. Drei Edelstahlnetze wurden in eine Verschlusskappe gegeben, welche auf dem Passivsammler angebracht wurde. Mit einer zweiten Verschlusskappe wurde der Passivsammler luftdicht verschlossen.

Nach Exposition (Analyse):

Für die Analyse der Röhren wurden Wasser und zwei Reagenzien im Verhältnis 1:1:0,1 vermischt (Reagenz 1: 2 g Sulfanilamid in 5 ml Phosphorsäure gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, Reagenz 2: 70 mg N-1-Naphtylendiamindihydrochlorid in 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst). Die drei Edelstahlnetze pro Passivsammler wurden in 2,1 ml dieser Lösung für 30 Minuten geschüttelt. Die Extinktion wurde in einem Beckmann Photometer bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Für die Auswertung der Analyseergebnisse wurde eine Standardkurve mit 0-50 nmol NO₂ erstellt. Durch Kontrollröhren, welche nach Präparation nicht geöffnet wurden, wurde das bei der Röhrenvorbereitung adsorbierte Stickstoffdioxid bestimmt.

Die Bestimmung des im Passivsammler gebundenen Stickstoffdioxids erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$C = (Q \times Z \times M \times 1000) / (D \times A \times T)$$

in der folgende Parameter berücksichtigt waren:

C: NO₂ in µg/m³

Q: adsorbiertes NO₂ [nmol]

Z: Diffusionsweg 7,5 cm

M: Molgewicht 46

D: Diffusionsquotient Stickstoffdioxid 0,154 cm²/s

A: Diffusionsquerschnitt 0,785 cm²

T: Expositionszeit in Sekunden

Passivsammlung Ozon

Die Ozon-Messungen erfolgten ebenfalls nach dem Prinzip der Passivsammlung. Im Gegensatz zu den Passivsammlern für NO₂ wurden die Passivsammler für Ozon nicht selbständig präpariert, sondern von der Passam AG (Männedorf, Schweiz) bezogen und ebenfalls nach Exposition analysiert. Die Passivsammler für Ozon wurden bis zur Exposition (max. 2 Tage) bei 4°C gelagert und in Folge parallel mit den NO₂-Passivsammlern am Baum angebracht (2 Ozon-Passivsammler-Röhrchen pro Birke). Die Ozonsammler wurden nach Anbringung am Baum ebenfalls geöffnet und der genaue Startzeitpunkt der Exposition wurde notiert. Nach 7-tägiger Exposition wurden die Ozon-Passivsammler wieder verschlossen und der genaue Endzeitpunkt notiert. Im Anschluss wurden die Passivsammler zur Analyse zurück an die Passam AG geschickt.

5.4 Temperaturmessungen und Urbanisationsindex

Die vorliegende Studie wurde in Kooperation mit Susanne Jochner (Fachgebiet Ökoklimatologie, TU München, Freising) durchgeführt. S. Jochner führte die Temperaturmessungen an ausgewählten Birkenstandorten durch und errechnete den UI der Birkenstandorte.

Temperaturmessungen

Für die Temperaturmessungen (S. Jochner) wurden 15 Birken mit Datenloggern für Temperatur ausgestattet (HOBO U23-001, Onset Computer Corporation, Southern MA, USA). Die Apparatur wurde in einem Strahlungsschutz auf der nördlichen Seite des Baumes in 3 m Höhe angebracht. Die Lufttemperatur wurde alle 10 Minuten gemessen und es wurde eine Durchschnittstemperatur für den Messzeitraum vom 1. Juli 2009 bis zum 5. Mai 2010 berechnet.

Urbanisationsindex

Es wurde ein UI mittels ArcGIS 9.3 auf Basis der CORINE Land Cover2000 Daten (EEA 2000) ermittelt (Jochner et al. 2012). Der Index gibt Art und Ausmaß bebauter Fläche (z. B. kontinuierliche und nicht kontinuierliche urbane Landnutzung, Industrie oder kommerzielle Einheiten) innerhalb eines Radiuses von 2 km wieder. Der Index bewegt sich zwischen 0 und 1, wobei (0) einen niedrigen und (1) einen hohen Urbanisierungsgrad darstellt. Urbane Standorte wurden mit einem UI 0,5-1 und rurale Standorte mit einem UI <0,5 definiert.

5.5 Generierung und Weiterverarbeitung wässriger Pollenextrakte

Zur Charakterisierung der Pollen wurden wässrige Pollenextrakte hergestellt. Hierbei wurden drei unterschiedliche Pollenextrakte, jeweils mit optimierten Bedingungen für die einzelnen Analysen, hergestellt.

Ammoniumbicarbonatextrakte für PALMs- und Bet v 1-Bestimmung

Je 10 mg Pollen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen eingewogen, 10 Minuten bei 1200xg zentrifugiert und in 2 ml Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 8,14) aufgenommen. Die Suspension wurde eine Minute gevortext und anschließend für 4 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln überkopf geschüttelt. Der Extrakt wurde in 2 ml Eppendorfgefäßen umgefüllt und 10 min bei 17000xg zentrifugiert.

Für die Bestimmung von PALM_{LTB4} und PALM_{PGE2} wurde der wässrige Extrakt aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gefroren.

Die Extrakte für die Bet v 1-Bestimmung wurden zusätzlich mit BSA versetzt (0,1% BSA), gevortext, abzentrifugiert und für mindestens 30 Minuten bei -80°C eingefroren, um im Anschluss über Nacht lyophilisiert zu werden. Bis zur Bet v 1-Bestimmung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

PBS-Extrakte für Pricktestung, Migrationsassays und Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Zur Herstellung von PBS-Extrakten für Pricktestung und Migration wurden je 10 mg Pollen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abgewogen. Im Anschluss wurde 1 ml PBS zugegeben, 30 Sekunden gevortext und der Extrakt bei 37°C für 30 min inkubiert. Während der Inkubation wurden die Pollenextrakte alle 10 min gevortext. Anschließend wurde der Extrakt bei 400xg abzentrifugiert und anschließend durch einen Sterilfilter filtriert.

Ultrazentrifugation

Zur näheren Charakterisierung sowie Identifizierung immunstimulatorischer Substanzen im Pollenextrakt wurde durch Ultrazentrifugation von PBS-Extrakten über einen 3 kDA cut-off Filter eine Hoch- und eine Niedermolekulare Fraktion des Pollenextraktes generiert.

Zur Reinigung des Filters wurden vor Filtration 2 ml Aqua ad. injectabilia auf den Filter gegeben und bei 4000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Aqua ad. injectabilia wieder vom Filter und aus dem Tube entfernt und der WPE auf den Filter gegeben. Dieser wurde bei 4000 g, 60 Minuten bei 4°C zentrifugiert und im Anschluss Konzentrat (>3kDA) und Filtrat (<3kDA) steril filtriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Extrakte bei -80°C gelagert.

Herstellung der Pricklösungen zur Testung niedermolekularer Substanzen und Adenosin

Zur Herstellung von mit niedermolekularen Substanzen angereicherten Pricklösungen für Pricktestungen von Birkenpollenallergikern wurde die >3kDa Fraktion mit PBS oder mit der niedermolekularen Fraktion verdünnt (Abbildung 11). Für Pricktestungen mit Adenosin wurde die >3kDa Fraktion mit PBS oder in einer Adenosinlösung in der Konzentration $1 \cdot 10^{-6}$ M verdünnt. Für die Gräserpollenallergiker wurden entsprechend verfahren, nur dass anstelle der >3kDa Fraktion das Allergen Phlp6 verwendet wurde.

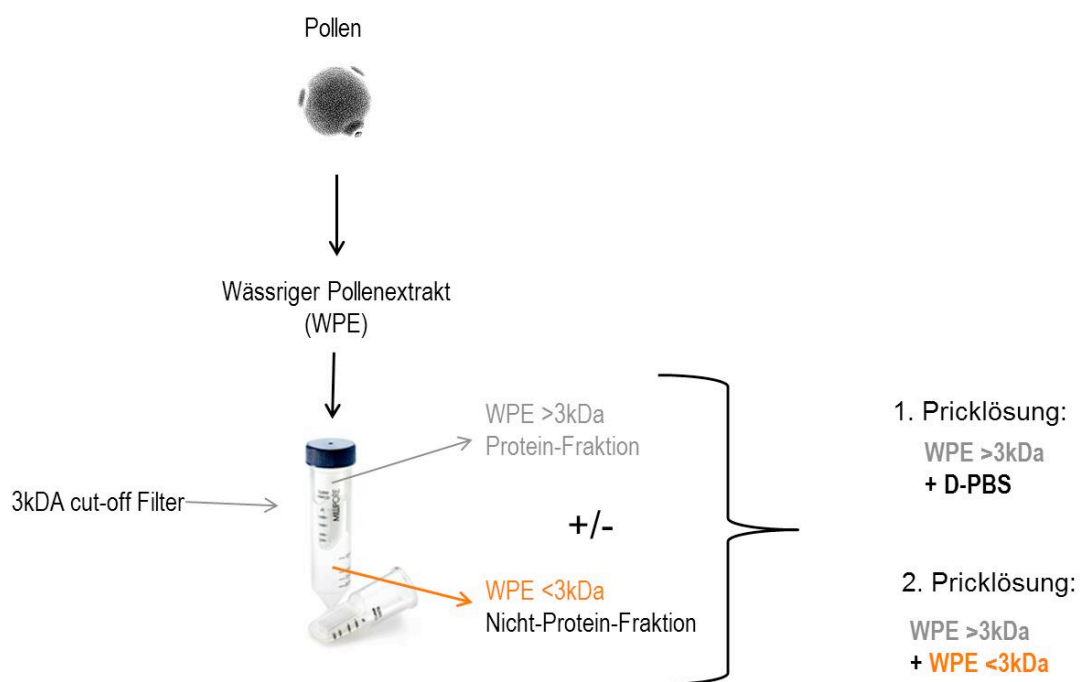


Abb. 11: Herstellung von Pricklösungen an- und abgereichert mit Substanzen kleiner 3 kDa.

5.6 Isolation und Generierung verschiedener Zellpopulationen

Isolation von PBMZs

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden Periphere Blut-mononukleäre Zellen (PBMZs) aus humanem Vollblut isoliert. Hierfür wurden 25 ml Heparin-Blut in 25 ml D-PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ verdünnt, anschließend auf 10 ml Lymphoprep (Axis-Shield) geschichtet und für 15 min bei 2000rpm (ohne Bremse) zentrifugiert. Nach Zentrifugation befinden sich die Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Falcons, während sich PBMZs (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) in der Interphase zwischen Lymphoprep und Plasma befinden. Die Interphase mit den sich darin befindlichen Zellen wurde entfernt und

mehrmals mit 5 mM EDTA in D-PBS w/o gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Trypanblau gezählt.

Isolation von Monozyten

Monozyten wurden aus PBMZs (siehe 3.2.13) mittels magnetischer Zellseparation (MACS; Miltenyi Biotec) isoliert. Hierbei wurden die Zellen mit magnetischen MicroBeads, welche an Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD14 gekoppelt waren, inkubiert und mittels Positivselektion mit dem MACS separiert.

Isolation von Neutrophilen Granulozyten

Für die Isolierung von humanen Neutrophilen Granulozyten (PMN) wurden 50 ml EDTA-Vollblut aus der Armvene von gesunden Probanden entnommen. Mittels zweifacher Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die PMN abgetrennt. In ein 50 ml Falcon wurden 13 ml des Histopaques 1119 (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA) vorgelegt und darauf 13 ml Histopaque 1077 (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA) geschichtet. Auf die zwei Histopaqueschichten wurden anschließend 20 ml EDTA-Vollblut geschichtet. Nach der Dichtezentrifugation bei 754xg für 45 min in einer Megafuge 1.0R trennten sich die verschiedenen Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Von oben nach unten hatten sich folgende Schichten ausgebildet: Plasma, mononukleäre Zellen, Histopaque 1077, polymorphonukleäre Zellen, Histopaque 1119 und Erythrozyten. Die obersten drei Schichten wurden verworfen, dann die polymorphonukleären Zellen mit einer Pipette abgesaugt und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Über mehrfache Waschschrte mit PBS wurden die Zellen gereinigt. Die polymorphonukleären Zellen wurden in 50 ml PBS aufgenommen, anschließend bei 409xg für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in 20 ml PBS resuspendiert. Der Vorgang der Zentrifugation und das Absaugen des Überstandes wurden wiederholt. Danach wurden residuale Erythrozyten durch einen osmotischen Schock mit 1 ml Aqua dest. lysiert. Im direkten Anschluss wurde die Salzkonzentration durch Zugabe einer doppelphysiologischen Natriumchlorid-Lösung (1,8%, 1 ml) angeglichen. Die 2 ml Zelllösung wurden auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 301xg für 10 min abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zell-Pellet in 5 ml Migrationsmedium resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit Trypan-Blau verdünnt und die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellen wurden auf 1 Million Zellen pro ml Medium eingestellt.

Isolation von CD4⁺ T-Zellen

PBMZs wurden, wie in bei der Isolation von PBMZs beschrieben, isoliert. CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend mit dem CD4⁺ T Cell Isolation Kit (#130-094-131) von Miltenyi iso-

liert. Nicht-CD4⁺ T cells (CD8⁺ T cells, γ/δ T cells, B cells, NK cells, dendritic cells, monocytes, granulocytes, and erythroid cells) werden durch eine Mischung biotin-konjugierter Antikörper gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TZR γ/δ und CD235a (glycophorin A) markiert. Diese Zellen werden anschließend mit Anti-Biotin MicroBeads magnetisch für die Depletion markiert. Somit werden nach Separation nicht-markierte CD4⁺ T-Zellen erhalten.

Isolation von naiven CD4⁺ T-Zellen

PBMZs wurden wie in 3.2.13 beschrieben isoliert. Naive CD4⁺ T-Zellen wurden anschließend mit dem Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit (#130-094-131) von Miltenyi isoliert. Für die magnetische Depletion von Memory CD4⁺ T-Zellen und nicht-T-Zellen werden die PBMZs mit einem Cocktail von biotinylierten CD45RO, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, anti-TCR γ/δ , anti-HLA-DR und CD235a (glycophorin A) Antikörpern inkubiert. Diese Zellen werden anschließend mit Anti-Biotin MicroBeads magnetisch für die Depletion markiert. Somit werden nach Separation nicht-markierte naive CD4⁺ T-Zellen erhalten.

Generierung von Dendritischen Zellen

Aus Monozyten generierte Dendritische Zellen (MoDZs) wurden aus Monozyten (siehe „Isolation von Monozyten“) durch Zugabe von GM-CSF (500U/ml) und IL-4 (500U/ml) generiert. Die Zellen wurden hierfür für 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in HU-DC (+IL-4/+GM-CSF) inkubiert. Am Tag 5 wurden die Zellen geerntet, gezählt und mittels FACS-Färbung charakterisiert (CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD1a).

5.7 Zellassays

Stimulation von MoDZs mit WPE

Die Stimulation der MoDZs mit wässrigen Pollenextrakten (WPE) erfolgte in einer 96-Well-Platte. Das Stimulationsmedium war HU-DC Medium und die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Well. Die Zellen wurden mit den Endkonzentration WPE von 10 mg/ml, 5 mg/ml, 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0,3 mg/ml plus LPS (100 ng/ml) stimuliert, wobei das Endvolumen pro Well 200 μ l betrug. Die Positivkontrolle war LPS (100 ng/ml; ohne WPE), die Negativkontrolle war das Medium. Nach Zugabe der Stimulanzien wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden 100 μ l Überstand zur IL-6 und IL-12 Bestimmung (ELISA) abgenommen. Die restlichen Zellen wurden zur Bestimmung der Überlebensrate im FACSCalibur PI-gefärbt.

Migrationsassay

Die Migrationsassays wurden in 96-Well-Migrationsplatten der Firma NeuroProbe durchgeführt. Die Migrationsplatte besteht aus einer unteren Kammer, in welche die zu testenden Substanzen sowie das Chemoattraktanz eingebracht werden und einer sich darauf befindlichen Membran (Porengröße 3 μm). Ein hydrophober Ring begrenzt die Fläche der Membran über den Wells. In diesen hydrophoben Ring wird die Zellsuspension in Tropfenform eingebracht.

Zur Analyse der chemoattraktischen Kapazität der WPE wurden die unteren Kammern der 96 well Migrationsplatte mit 30 μl D-PBS, LTB_4 oder wässrigem Pollenextrakt gefüllt. Daraufhin wurde die Membran auf die 96-Well-Platte gegeben und 50 μl der Zellsuspension der Neutrophilen Granulozyten (1 Mio Zellen/ml) auf die Membran pipettiert. In Folge wurden die Zellen 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 1 h wurden die Zellsuspensions-Tropfen von der Platte entfernt und die Platte abzentrifugiert (Quick run; 30 sec). Anschließend wurde die Membran abgenommen. Die sich in der Platte befindlichen Zellen wurden in 200 μl FACS-Puffer aufgenommen und im FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gezählt. Bei der Auswertung durch die Software CellQuestPro (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden die neutrophilen Granulozyten durch Gatesetzung von den übrigen Partikeln, wie Pollenresten, herausgefiltert und die migrierten Zellen bestimmt.

Stimulation der Mastzelllinie LAD2

An Tag 1 wurde die Mastzelllinie LAD2 mit IgE sensibilisiert. Hierfür wurden die Zellen bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert, in Vollmedium aufgenommen und anschließend IgE (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 , je nach Zellzahl in 24/12/6 Well mit IgE inkubiert.

An Tag 2 wurden die Zellen dann stimuliert. Dafür wurden die Zellen bei 1000rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen (zur Entfernung von IgE). Im Anschluss wurden die Zellen in Tyrodes-Puffer aufgenommen und je 50 μl (entspricht 50 000 Zellen) in 96 Well Platten ausgesät. Zu jedem Well wurden 25 μl Anti-IgE und das Stimulanz (WPE) oder Tyrodes als Kontrolle gegeben. Die Platte wurde 60 min im Schüttelwasserbad (37°C) inkubiert. Währenddessen wurden 50 μl der Substratlösung (pNAG in Citratpuffer) in die 96 well Platte (Überstandsplatte und Sedimentplatte) vorgelegt. 50 μl des Überstandes wurden auf 50 μl pNAG pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100 μl Triton X 10%ig resuspendiert. 50 μl des Zellaufschlusses wurden ebenfalls auf 50 μl pNAG pipettiert. Als Blank wurden 50 μl pNAG + 50 μl Tyrodes-Puffer mitgeführt. Die Platten wurden dann bei 37°C für 90 min inkubiert und im Anschluss 100 μl Glycinpuffer pro Well pipettiert. Die Proben wurden bei 405 nm gemessen. In Folge wurde der Anteil ausgeschütteter β -Hexosaminidase in Prozent berechnet.

Hierfür wurde zunächst die Gesamtdegranulation bestimmt, welche sich aus der Summe intrazellulärer und ausgeschütteter β -Hexosaminidase berechnet. Der Anteil der ausgeschütteten β -Hexosaminidase ergibt sich durch Division der intrazellulären β -Hexosaminidase durch die Gesamtdegranulation multipliziert mit 100.

Hormonstimulation von Monozyten

Die durch Dichtezentrifugation und anschließende MACS Separation (siehe „Isolation und Generierung verschiedener Zellpopulationen“) erhaltenen $CD14^+$ Monozyten wurden für die Hormonstimulation in hormonreduziertes T-Zellmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Hormonkonzentration auf $2,75 \cdot 10^{-5}$ M 17β -Östradiol, $2,75 \cdot 10^{-5}$ M Testosteron und $1,95 \cdot 10^{-7}$ M Leptin eingestellt. Zudem fand eine Parallelstimulation der Hormone 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) und Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) sowie Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) und Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) statt.

Hormonbedingungen waren:

- (1) 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M)
- (2) 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) + Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)
- (3) Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M)
- (4) Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) + Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)
- (5) Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)

Die Kontrollen waren Medium und Ethanol. Die Ethanolkontrolle der 17β -Östradiol-Inkubation war 0,028% Ethanol, die Ethanolkontrolle der Testosteron-Inkubation war 0,0028% Ethanol. Alle Hormonkonzentrationen sowie die Mediumkontrolle und Ethanolkontrollen wurden mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Nach 24h wurde die Überlebensrate der Zellen mittels PI Färbung im FACS (FACSCalibur) analysiert und die Überstände im IL-10-, TNF- α -, IL-6-, IL-12-, IL-23- und GM-CSF ELISA eingesetzt.

Hormonstimulation von $CD4^+$ T-Zellen

Die $CD4^+$ T-Zellen wurden für die Hormonstimulation in hormonreduziertes T-Zellmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Hormonkonzentration $2,75 \cdot 10^{-5}$ M 17β -Östradiol, $2,75 \cdot 10^{-5}$ M Testosteron und $1,95 \cdot 10^{-7}$ M Leptin eingestellt. Zudem fand eine Parallelstimulation der Hormone 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) und Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) sowie Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) und Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) statt.

Hormonbedingungen waren:

- (1) 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M)
- (2) 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) + Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)
- (3) Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M)
- (4) Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) + Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)
- (5) Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)

Kontrollen waren Medium und Ethanol (0,028%). Die Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen fand mit Anti-CD3/Anti-CD28 statt. Nach 3 Tagen wurde die Überlebensrate der Zellen mittels PI Färbung im FACS analysiert und die Überstände im IL-10-, TNF- α -, IL-17-, IL-22-, IFN- γ -, IL-13- und GM-CSF ELISA analysiert. Zusätzlich wurde die Proliferation mittels H^3 -Inkorporationsassay bestimmt.

Hormonstimulation von naiven $CD4^+$ T-Zellen

Die naiven $CD4^+$ T-Zellen wurden für die Hormonstimulation in hormonreduziertes T-Zellmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Hormonkonzentration $2,75 \cdot 10^{-5}$ M 17β -Östradiol, $2,75 \cdot 10^{-5}$ M Testosteron und $1,95 \cdot 10^{-7}$ M Leptin eingestellt. Zudem fand eine Parallelstimulation der Hormone 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) und Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) sowie Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) und Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) statt.

Hormonbedingungen waren:

- (1) 17β -Östradiol E2 ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M)
- (2) 17β -Östradiol ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) + Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)
- (3) Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M)
- (4) Testosteron ($2,75 \cdot 10^{-5}$ M) + Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)
- (5) Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M)

Kontrollen waren Medium und Ethanol (0,028%). Die Stimulation der naiven $CD4^+$ T-Zellen fand mit Anti-CD3/Anti-CD28 statt. Nach 7 Tagen wurde die Überlebensrate der Zellen mittels PI Färbung im FACS analysiert, die Überstände in IL-10-, TNF- α -, IL-17-, IL-22-, IFN γ -, IL-13- und GM-CSF ELISA analysiert sowie die Proliferation mittels H^3 -Inkorporationsassay bestimmt.

5.8 Prick Test

Für die Prick-Testung wurden 5 µl der Pricklösungen auf dem Unterarm aufgetragen, woraufhin ein gerader Einstich mit einer Lanzette (90° zur Hautoberfläche) für mindestens 1 Sekunde durch die Allergenlösung hindurch statt fand. 15 min nach Einstich erfolgt die Messung von Quaddel und Erythem mittels Lineal. Es wurde der größte Durchmesser (Durchmesser 1) und der senkrecht dazu stehende Durchmesser (Durchmesser 2) einer jeden Quaddel und jeden Erythems gemessen und danach der Mittelwert mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Quaddeldurchmesser 1 [mm]} \times \text{Quaddeldurchmesser 2 [mm]} / 2 = \text{Quaddelgröße [mm}^2\text{]}$$

$$\text{Erythemdurchmesser 1 [mm]} \times \text{Erythemdurchmesser 2 [mm]} / 2 = \text{Erythemgröße [mm}^2\text{]}$$

Die Reaktion wurde als positiv gewertet sobald ein Durchmesser ≥ 3 mm gemessen wurde.

5.9 ELISA

Bet v 1 ELISA

Pro Standort wurden zwei unabhängige Proben im Doppelansatz vermessen. Hierbei wurde in jedes Well einer Mikrotiterplatte 100 µl Coating-Antikörper (1:10) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit Waschpuffer. Im Anschluss wurde die Platte mit 1%-iger BSA Lösung für ½ h geblockt, gefolgt von einem erneuten Waschschrte. Darauf wurden 100 µl Probe bzw. Standards im Doppelansatz für eine Stunde in der Mikrotiterplatte unter Schütteln bei RT inkubiert und durch dreimaliges Waschen die überschüssigen Substanzen entfernt. Der Überschuss des danach zugegebenen 100 µl biotinylierten Zweit-Antikörpers (1:6000, 1 Stunde) wurde ebenfalls durch dreimaliges Waschen entfernt. Danach wurde 100 µl Streptavidin-Peroxidase (1:16000) zugesetzt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl TMBSsubstrat zugegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion mittels Stopplösung abgestoppt. Die Auswertung erfolgte mittels Standardkurve im MRX TC Revalation Mikrotiterplatten Reader der Firma Thermo (Engelsbach, Deutschland) mit der Wellenlänge 492 nm. Die Bet v 1-Konzentration wurde auf 10 mg Pollen berechnet.

PGE₂- und LTB₄ ELISA

Die Pollen-assoziierten Lipidmediatoren PALM_{PGE₂} und PALM_{LTB₄} wurden mittels käuflicher PGE₂- und LTB₄ ELISA nach Angaben des Herstellers im wässrigen Pollenextrakt bestimmt.

Zytokin ELISA

Die Konzentrationen der Zytokine IFN- γ , IL-17, IL-22, IL-4, IL-10, TNF- α , GM-CSF und IL-6 wurden durch kommerzielle Sandwich ELISA Kits aus zellfreiem Überstand bestimmt.

5.10 Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Adenosinkonzentration der WPE wurde mittels Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem 2996 Photodioden-Array (Waters, Eschborn, Deutschland) analysiert (Gilles et al. 2011). Die Analysen wurden durch die Abteilung Analytische BioGeoChemie (Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Die Adenosinkonzentrationen der WPE wurde durch den Vergleich der Peak-Flächen der WPE mit den Peak-Flächen von Standards mit bekannten Konzentrationen ermittelt.

5.11 Statistische Analysen

Normalverteilungstest

Da die Verteilungsform der Daten oftmals für die Verwendung eines bestimmten statistischen Verfahrens ausschlaggebend ist, wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Daten eingangs mit dem Kolmogorov-Smirnoff Test auf Normalverteilung geprüft. Überschreitet dabei die Signifikanz den Wert von 5 %, ist eine Normalverteilung der Daten anzunehmen [363].

Mittelwertsvergleiche

Sofern die Daten normal verteilt waren, wurde für vergleichende Analysen (Mittelwertsvergleiche), z.B. zwischen urbanen und ruralen Standorten, der T-Test bzw. der gepaarte T-Test, für nicht normal verteilte Variablen der Mann-Whitney-Test bzw. der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Bei P-Werten < 0,05 kann die Nullhypothese, dass sich die Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden, abgelehnt werden kann.

Korrelationsanalysen

Zur Überprüfung von korrelativen Beziehungen zwischen z.B. den pollenbezogenen Parametern und den Umweltvariablen wurden bivariate Korrelationen vorgenommen. Dabei fand

der Pearsonsche Korrelationskoeffizient für metrisch skalierte Variablen Verwendung, der Rangkorrelationskoeffizient Spearmans Rho für ordinalskalierte Variablen. Der Korrelationskoeffizient r kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Der Zusammenhang ist dabei umso stärker, je näher der Betrag des Korrelationskoeffizienten an 1 liegt, wobei negative Werte eine gegenläufige Beziehung darstellen, positive Werte eine gleichläufige Beziehung [363]. Korrelationen mit P-Werten $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

Für alle statistischen Methoden wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet.

6 Ergebnisse

6.1 Extrinsische Immunmodulation der allergischen Antwort

6.1.1 Modulation der Allergenität von Birkenpollen durch Umweltfaktoren

Zunehmende Urbanisierung und veränderte Umweltbedingungen beeinflussen neben dem Menschen, ebenfalls die sich darin befindlichen Pflanzen, von besonderem Interesse, die allergenen Pflanzen. Es stellt sich die Frage, ob durch die veränderten Umweltbedingungen der zunehmenden Urbanisierung möglicherweise Wirkungen auf den Allergenträger bestehen, die dessen Allergenität erhöhen und somit zur zunehmenden Allergieprävalenz beitragen. Um diese Frage zu klären wurden Birkenpollen, als allergologisch relevante Pollenart, auf ihre Allergenität in Abhängigkeit ihrer Umweltbedingungen untersucht.

6.1.1.1 Charakterisierung der Birken nach verschiedenen Umweltfaktoren

Es wurden 40 Birken im Großraum München für die Studie ausgewählt (Abb. 11) und die in der Studie eingeschlossenen Parameter der Urbanisierung (UI, NO₂-Konzentration, Ozonkonzentration, Temperatur) zwischen den ausgewählten urbanen und ruralen Birkenstandorten verglichen (Abb. 12). Hierbei zeigten sich signifikant höhere NO₂-Konzentrationen sowie Temperaturen für die in urbanen Gebieten lokalisierten Birken (Abb. 12, A, C). Der errechnete UI unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen den ausgewählten Birken (Abb. 12, G) und stand in direktem Zusammenhang zu sowohl Temperatur als auch NO₂-Konzentration (Abb. 12, B, D).

Für die Ozonkonzentration konnte kein Zusammenhang zum UI beobachtet werden (Abb. 12, F). Im ruralen-urbanen Vergleich zeigte sich für die Ozonkonzentrationen ein zu NO₂ und Temperatur gegenläufiger Trend, mit höheren Ozonkonzentrationen für rural lokalisierte Birken (Abb. 12, E; p=0,12).

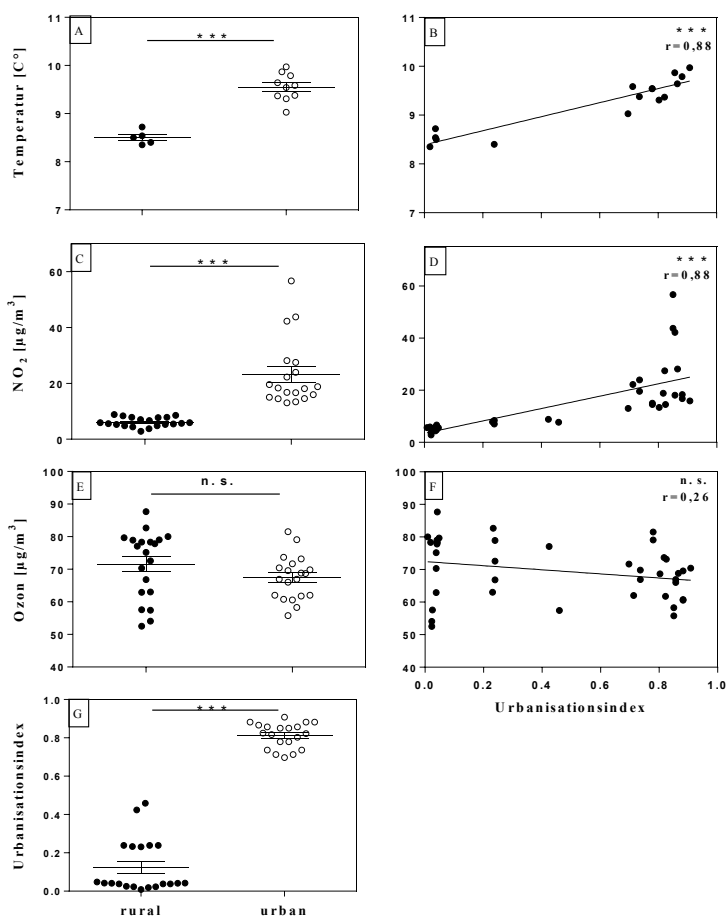


Abb. 12: Charakterisierung der Birkenstandorte hinsichtlich Temperatur, NO₂-Konzentration, Ozonkonzentration und UI. Mittelwertvergleiche der Temperatur (A; n=16; T-Test (zweiseitig)), NO₂- (C; n=40; Mann-Whitney Test (zweiseitig)) und Ozonkonzentration (E; n=40; Mann-Whitney Test (zweiseitig)) sowie des UI (G; n=40; Mann-Whitney Test (zweiseitig)) zwischen urbanen und ruralen Birkenstandorten (Mittelwert ± Standardfehler) sowie Korrelationen (Spearman (zweiseitig)) der Umweltvariablen Temperatur (B), NO₂-Konzentration (D) und Ozon-Konzentration (F) mit den UI; n. s.: p>0,05, ***: p<0,001

Die NO₂-Konzentration wurde in dieser Studie als Maß für die Verkehrsbelastung verwendet, wohingegen Ozon als eigenständiger Faktor betrachtet wurde. Ozon ist ein sekundärer Schadstoff, dessen Konzentration komplexen Vorgängen unterliegt [364, 365]. Die wichtigste Vorläufersubstanz für den Ozonaufbau ist NO₂, womit NO₂ und Ozon in engem Zusammenhang stehen [364, 365]. Um den Zusammenhang von Ozon und NO₂ an den in dieser Studie ausgewählten Standorten zu untersuchen, wurden die Schadstoffe in Beziehung gesetzt (Abb. 13). Hierbei zeigte sich in der Gesamtheit der Birken in urbanen und ruralen Gebieten (n=40) eine nicht signifikant negative Korrelation von NO₂ und Ozon (Abb. 12 A). Die getrennte Analyse urbaner und ruraler Standorte hingegen zeigte unterschiedliche Relationen in urbanen und ruralen Gebieten. In ruralen Gebieten standen hohe NO₂-Konzentrationen in Zusammenhang mit hohen Ozonkonzentrationen (Abb. 13 B), wohinge-

gen in urbanen Gebieten hohe NO_2 -Konzentrationen begleitet von niedrigen Ozonkonzentrationen waren (Abb. 13 C).

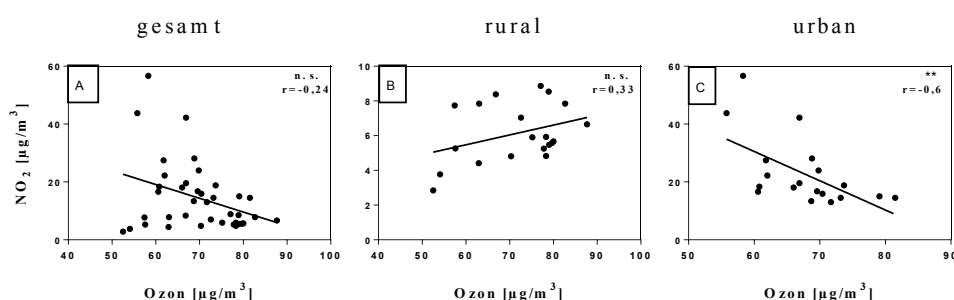


Abb. 13: Korrelation (Spearman (zweiseitig)) von Ozon- und NO_2 -Konzentration (Passivsammler) im gesamten Untersuchungsgebiet (n=40) (A), in ruralen (n=20) (B) und urbanen Gebieten (n=20) (C). n. s.: $p > 0,05$; **: $p < 0,01$

6.1.1.2 Kätzchencharakteristika in Abhängigkeit von Umweltfaktoren

Pollen pro Einzelkätzchen (g Pollen/Kätzchen)

Der Vergleich der Pollenmenge pro Kätzchen für rurale (n=20) und urbane Birken (n=20) zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14 A). Dahingegen fand sich eine signifikant negative Korrelation der Pollenmenge pro Kätzchen mit dem UI (n=40; Abb. 14 B), welcher eine detailliertere Betrachtung des Zusammenhangs ermöglichte. Der UI ist ein Maß für den Grad der Urbanisierung und steht im Zusammenhang mit Temperatur als auch NO_2 -Konzentration (Abb. 12, B, D). Die NO_2 -Konzentration (n=40) und die Temperatur (n=16; 10% Signifikanzniveau) zeigten, entsprechend dem UI, ebenfalls eine negative Korrelation mit der Pollenmenge pro Kätzchen (Abb. 14 C, D). Damit standen hohe NO_2 -Konzentrationen und hohe Temperaturen im Zusammenhang mit geringen Pollenmengen pro Kätzchen. Die gemessenen Ozon-Konzentrationen (n=40) zeigten keine Verbindung zur Pollenmenge pro Kätzchen (Abb. 2 E).

Kätzchengewicht

Neben der Pollenmenge pro Kätzchen wurde das Kätzchengewicht bestimmt. Hierbei konnte für urbane im Vergleich zu ruralen Birken ein signifikant höheres Kätzchengewicht festgestellt werden. Dieses stand hingegen in keinem Zusammenhang zu einem der gemessenen Umweltparameter. Weder für UI, noch Temperatur, NO_2 - oder Ozonkonzentration konnte eine Korrelation zum Kätzchengewicht beobachtet werden (Abb. 14, F-J).

Ratio Pollen/Kätzchen

Ein weiterer bestimmter Parameter der Kätzchencharakteristika war die Ratio Pollen/Kätzchen. Sie gibt an, wie viel g Pollen in einem g Kätzchen produziert werden. Die

Ratio aus Pollen/Kätzchen ergibt sich somit aus g Pollen/g Kätzchen und gibt Aufschluss darüber, in welchem Verhältnis Pollensynthese und Kätzchensynthese zueinander stehen. Hierbei zeigten rurale Birken eine signifikant höhere Ratio Pollen/Kätzchen (Abb. 14, K) und somit eine höhere Pollen- zu Kätzchensynthese als urbane Birken.

Zudem konnte eine negative Korrelation der Ratio Pollen/Kätzchen mit sowohl dem UI (Abb. 14, L) als auch der Temperatur (Abb. 14, M) und der NO_2 -Konzentration beobachtet werden (Abb. 14, N). Ein niedriger UI sowie niedrige Temperaturen und NO_2 -Konzentrationen standen somit im Zusammenhang mit einer hohen Pollen- zu Kätzchensynthese. Für Ozon ließ sich, wie für g Pollen/Kätzchen und das Kätzchengewicht, auch mit der Ratio Pollen/Kätzchen keine Korrelation feststellen (Abb. 14, O). Ozon stand somit zu keinem der bestimmten Kätzchencharakteristika in Verbindung.

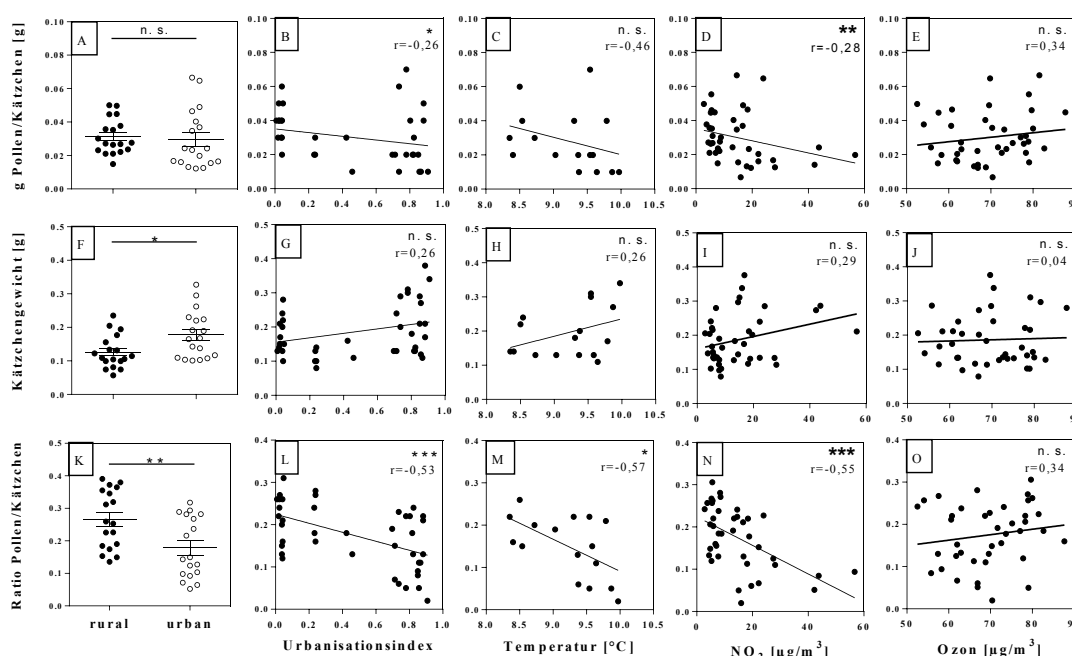


Abb 14.: Zusammenhang der Kätzchencharakteristika mit UI, Temperatur, NO_2 - und Ozonkonzentration. Mittelwertvergleich der Menge Pollen pro Einzelkätzchen (g Pollen/Kätzchen; A; $n=40$), des Kätzchengewichts (F; $n=40$) und des Verhältnisses von Pollen zu Kätzchen (Ratio Pollen/Kätzchen; K; $n=40$) zwischen urbanen und ruralen Birkenstandorten sowie Korrelationen der Kätzchencharakteristika mit den Umweltvariablen UI ($n=40$; B, G, L), Temperatur ($n=16$; C, H, M), NO_2 - ($n=40$; D, I, N) und Ozonkonzentration ($n=40$; E, J, O). Die verwendeten Testverfahren waren der Mann-Whitney Test (zweiseitig; A), der T-Test (zweiseitig; F, K) die Spearman-Korrelation (zweiseitig; B, C, E, D, G, H, I, J, L, N) und die Pearson-Korrelation (zweiseitig; L, O). Der Vergleich urbaner und ruraler Birken ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

6.1.1.3 Allergenität in Abhängigkeit vom Reifegrad

Um Aufschluss über die Entwicklung des Majorallergens Bet v 1, sowie der PALMs mit der Reifung des Pollens und des Kätzchens zu bekommen, fand eine sequentielle Sammlung von

fünf ausgewählten Birken und die Bestimmung von Allergen- und PALMs-Gehalt statt. Hierbei konnte eine inverse Beziehung von PALMs- und Bet v 1-Gehalt beobachtet werden (Abb.15). Während zu Beginn der Reifung die höchsten PALMs- und niedrigsten Bet v 1-Gehalte gemessen werden konnten, ließen sich kurz vor Freisetzung des Pollen mit den Stadien 60-61, die niedrigsten PALMs-, hingegen die höchsten Bet v 1-Gehalte messen. Während die Bet v 1-Gehalte dann wieder abnahmen, nahmen die PALMs-Gehalte wieder leicht zu.

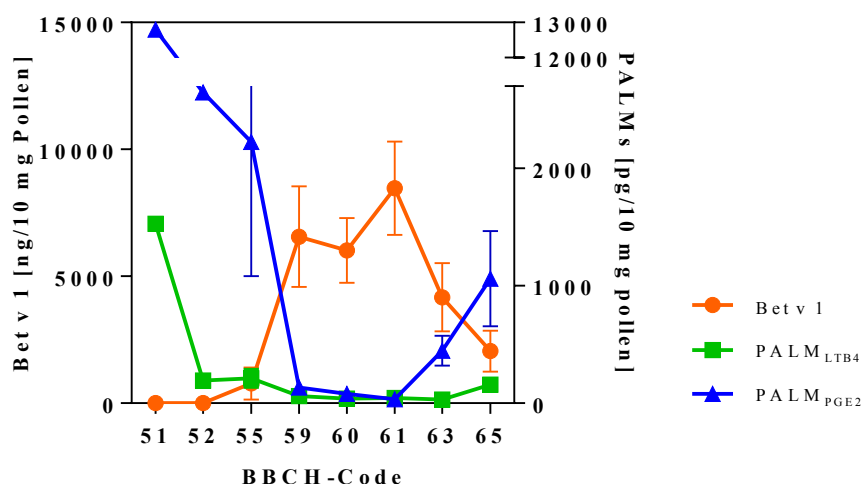


Abb. 15: Abhängigkeit des Bet v 1- und PALMs-Gehaltes vom Reifegrad der Kätzchen. Analysen des Bet v 1- (orange) und PALMs Gehalts (LTB₄=grün; PGE₂=blau) in Abhängigkeit vom Reifegrad (BBCH) der Kätzchen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler von fünf sequentiell beprobten Birken.

6.1.1.4 Allergenität in Abhängigkeit von Umweltfaktoren

Abhängigkeit des Bet v 1 Gehalts von Umweltfaktoren

In den Analysen zeigte sich ein Trend zu höheren Bet v 1-Konzentrationen in ruralen Pollen (Abb. 16, A; $p=0,16$). Ein ähnlicher Trend war bereits für die Ozonkonzentration zu beobachten, welche ebenfalls für rurale Standorte tendenziell erhöht war (Abb. 12, E; $p=0,12$). Bei Betrachtung des Zusammenhangs von Bet v 1-Gehalt und Ozonkonzentration zeigte sich eine signifikant positive Korrelation der Ozonkonzentration mit dem Bet v 1-Gehalt (Abb. 16, E, $p=0,02$). Damit standen hohe Ozonkonzentrationen mit hohen Bet v 1-Konzentrationen in Zusammenhang. Der UI ($n=40$) und die NO₂-Konzentration ($n=40$) standen in keinem Zusammenhang zum Bet v 1-Gehalt (Abb. 16, B, D). Dahingegen ließ sich für die Temperatur ($n=16$), trotz einer Abhängigkeit zum UI (Abb. 12, B), eine negative Korrelation mit der Bet v 1-Konzentration feststellen (Abb. 16, C, $p=0,04$).

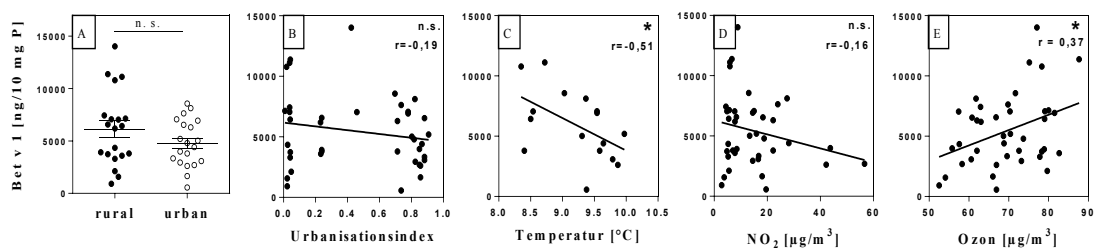


Abb. 16: Analysen des Einflusses von Umweltfaktoren auf den Bet v 1-Gehalt der Birkenpollen. Mittelwertsvergleiche des Bet v 1-Gehaltes zwischen ruralen (n=20) und urbanen (n=20) Birkenpollen (A; T-Test (zweiseitig)) sowie Korrelation (Pearson (zweiseitig)) des Bet v 1-Gehaltes mit den Umweltvariablen UI (B; n=40), Temperatur (C; n=16), NO₂-Konzentration (D; n=40) sowie Ozonkonzentration (E; n=40). Der Vergleich urbaner und ruraler Birken ist dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. P.=Pollen n. s.: p>0,05; *: p<0,05

Abhängigkeit des Adenosin Gehalts von Umweltfaktoren

Zur Bestimmung des Adenosin Gehaltes der Pollen (n=40) wurden WPE generiert und mittels HPLC auf ihren Adenosin Gehalt analysiert.

Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des Adenosin Gehaltes zwischen urbanen und ruralen Pollen (Abb.17, A). Ebenso wenig stand einer der analysierten Parameter mit Adenosin in Verbindung (Abb. 17, B-E).

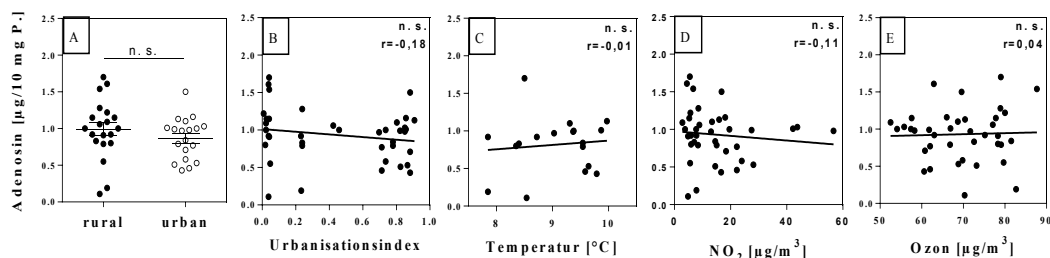


Abb. 17: Analysen zum Einfluss von Umweltfaktoren auf den PALMs-Gehalt. Mittelwertsvergleiche des Adenosin-Gehaltes zwischen ruralen (n=20) und urbanen (n=20) Birkenpollen (A) sowie Korrelation des Adenosin-Gehaltes mit den Umweltvariablen UI (B; n=40), Temperatur (C; n=16), NO₂-Konzentration (D; n=40) sowie Ozonkonzentration (E; n=40). Die verwendeten Testverfahren waren der T-Test (zweiseitig; A), die Pearson-Korrelation (zweiseitig; B) und die Spearman-Korrelation (zweiseitig; C-E). Der Vergleich urbaner und rural Birken ist dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. P.=Pollen ; n. s.: p>0,5

Abhängigkeit des PALM Gehalts von Umweltfaktoren

PALM_{PGE2}-Gehalt

Der PALM_{PGE2}-Gehalt unterschied sich nicht zwischen ruralen und urbanen Pollen (Abb. 18, A). Ebenso wenig konnte eine Abhängigkeit zum UI (Abb. 18, B), der Temperatur (Abb. 18, C) oder der NO₂-Konzentration (Abb. 18, D), direkt in Verbindung stehender Parameter,

beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine hoch signifikant negative Korrelation ($r=-0,68$) von $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ mit der Ozonkonzentration (Abb. 18, E).

$\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ -Gehalt

Für die $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ -Gehalte ließ sich ein Trend zu höheren Konzentrationen in ruralen Pollen feststellen ($p=0,06$; Abb. 18, F), jedoch weder UI (Abb. 18, G), Temperatur (Abb. 18, H), NO_2 - (Abb. 18, I) noch Ozonkonzentration (Abb. 18, J) standen in einem signifikanten Zusammenhang mit den gemessenen $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ -Gehalten.

Ratio $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}/\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$

Beide Lipidmediatoren stehen über dieselbe Vorläufersubstanz, die α -Linolensäure, in engem Zusammenhang, werden hingegen über unterschiedliche Wege gebildet. $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ wird ausschließlich über Autoxidation gebildet, $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ zusätzlich über das Enzym Lipoxygenase [366]. Im Folgenden wurde zusätzlich zu dem Gehalt von $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ und $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ das Verhältnis der Lipide zueinander (Ratio $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}/\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$) bestimmt. Dies sollte Rückschlüsse darüber geben, ob möglicherweise ein Syntheseweg der Lipidmediatoren durch äußere Faktoren beeinflusst werden kann und somit zu einem veränderten Verhältnis der Lipide zueinander führt. Obwohl sich weder die $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ -Gehalte noch die $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ -Gehalte zwischen urbanen und ruralen Pollen unterschieden, zeigten sich dagegen signifikante Unterschiede bezüglich des Verhältnisses der Lipidmediatoren zueinander. Das $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}/\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ -Verhältnis war in ruralen Pollen signifikant erhöht (Abb. 18, K) und zeigte zudem eine signifikante Korrelation mit dem UI (Abb. 18, L), der Temperatur (Abb. 18, M), der NO_2 -Konzentration (Abb. 18, N) als auch der Ozonkonzentration (Abb. 18, O). Hierbei standen hohe $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}/\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ -Gehalte mit einem niedrigen UI, einer niedrigen Temperatur, niedrigen NO_2 -Konzentrationen sowie hohen Ozonkonzentrationen in Verbindung (Abb. 18, L-O).

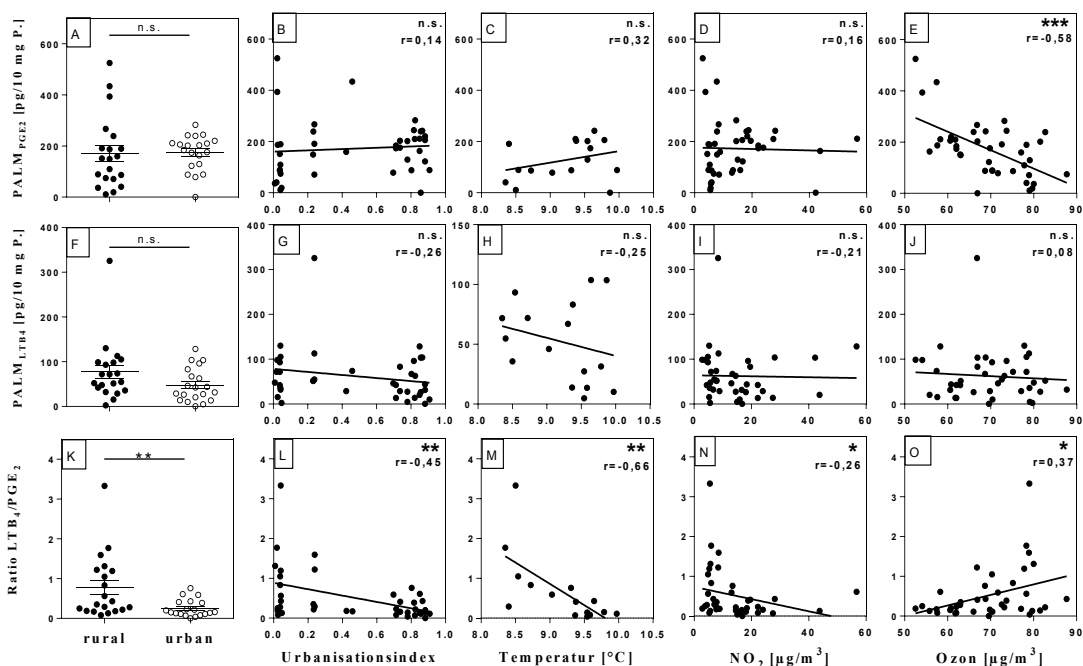


Abb. 18: Zusammenhang des PALM-Gehalts mit Umweltfaktoren. Mittelwertvergleich der $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ -Gehalte (A), $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ -Gehalt (F) und der Ratio $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}/\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ (K) zwischen ruralen ($n=20$) und urbanen ($n=20$) Birkenstandorten sowie Korrelationen der PALM-Gehalte und der Ratio mit den Umweltvariablen UI (B, G, L; $n=40$), Temperatur (C, H, M; $n=16$), NO_2 -Konzentration (D, I, N; $n=40$) sowie Ozonkonzentration (E, J, O; $n=40$). Der Vergleich urbaner und ruraler Birken ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. Die verwendeten Testverfahren waren der Mann-Whitney Test (zweiseitig; A, F, K), die Spearman-Korrelation (zweiseitig; B, D, I, G, L, M, N, O) und die Pearson Korrelation (zweiseitig; C, E, H, J). n. s.: $p>0,05$; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$

6.1.1.5 Immunmodulatorisches und -stimulatorisches von WPE

Mit der Beobachtung, dass Ozon mit mehreren Parametern der Allergenität (Bet v 1; PALMs) in Zusammenhang stand, sollte im weiteren Verlauf der vorliegenden Studie die immunologische Relevanz der mit Ozon in Zusammenhang stehenden, veränderten Allergen- und Lipidgehalte geklärt werden. Dafür wurden die Pollen ausgewählt, welche von den nach Messung jeweils am höchsten und niedrigsten Ozon-exponierten Birken aus urbanen und ruralen Gebieten stammten ($n=4$) und in *in vitro* und *in vivo* Versuchen näher analysiert. Geklärt werden sollte die immunstimulatorische als auch -modulatorische Kapazität dieser Pollen, sowie ihr *in vivo* Potential in der allergischen Hautreaktion. Die ausgewählten Pollen der am höchsten Ozon-exponierten Birken ($n=2$) werden in Folge als „Hoch-Ozon“ Pollen bezeichnet, die Pollen, welche von den am niedrigsten Ozon-exponierten Birken ($n=2$) stammen als „Niedrig-Ozon“ Pollen.

Potential von „Hoch-„ und „Niedrig-Ozon“ Pollen in der Inhibition einer Th1-Antwort

Ozon war positiv mit der Ratio $PALM_{LTB4}/PALM_{PGE2}$ korreliert (siehe Abb. 18, O). Damit stand eine veränderte Lipidzusammensetzung, hin zu einem höheren Anteil immunstimulatorischer zu -modulatorischer PALMs, mit höheren Ozonwerten in Verbindung. Im Folgenden sollte die immunologische Relevanz dieses Verhältnisses getestet werden. Aufgrund des höheren Anteils immunmodulatorischer PALMs in den „Niedrig-Ozon“ Pollen wurde angenommen, dass diese ein stärkeres immunmodulatorisches Potential aufweisen.

Um diese Hypothese zu testen wurden Stimulationsversuche mit aus Monozyten generierten dendritischen Zellen (MoDZ) durchgeführt. Es wurde getestet, inwieweit die LPS induzierte IL-12-Sekretion, somit das Potential eine Th1-Antwort zu induzieren, durch WPE der „Hoch-„ und „Niedrig-Ozon“ Pollen gehemmt werden kann.

In den Stimulationen konnte sowohl für die „Hoch-“ als auch die „Niedrig-Ozon“ Pollen eine konzentrationsabhängige Hemmung der IL-12 Sekretion beobachtet werden. Hierbei hemmte die niedrigste Konzentration von 3 mg/ml WPE bereits mehr als 70% des LPS induzierten IL-12.

Die „Hoch-Ozon“ Pollen zeigten dabei in allen eingesetzten Konzentrationen eine signifikant schwächere IL-12-Hemmung und somit ein signifikant geringeres Potential eine Th1-Antwort zu inhibieren als die „Niedrig-Ozon“ Pollen (Abb. 19). Hierbei konnte eine stärkere Signifikanz in den niedrigeren WPE Konzentrationen von 3 mg/ml und 5 mg/ml festgestellt werden ($p=0,016$), wobei 10 mg/ml ($p=0,031$) WPE die LPS induzierte IL-12 Sekretion fast vollständig hemmten (Abb. 19).

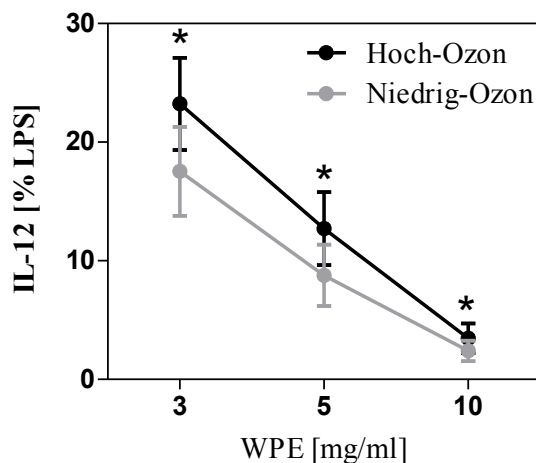


Abb. 19: Potential von „Hoch-Ozon“ Pollen die LPS induzierte IL-12 Sekretion zu hemmen. MoDZ (Spender n=3) wurden in An- und Abwesenheit von WPE („Hoch-Ozon“=schwarz; n=2; „Niedrig-Ozon“=grau; n=2) in den Konzentrationen von 3 mg/ml, 5 mg/ml und 10 mg/ml WPE stimuliert und die IL-12 Sekretion bestimmt. Die IL-12 Sekretion unter LPS und WPE Stimulation wurde bezogen auf die IL-12 Sekretion unter alleiniger LPS Stimulation (=100%). Dargestellt ist die IL-12 Sekretion in % als Mittelwert \pm Standardfehler. Die Signifikanzen wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (einseitig) berechnet. *: $p < 0,05$

Vergleich der Neutrophilen Chemotaxis auf „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen

Um das immunstimulatorische Potential der „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ belasteten Pollen zu testen, wurden Neutrophile Granulozyten aus dem Blut nicht-atopischer Probanden (n=3) isoliert und in Migrationsassays mit WPE von „Hoch-“ (n=2) und „Niedrig-Ozon“ (n=2) Pollen eingesetzt. Aufgrund der Beobachtung das „Hoch-Ozon“ Pollen ein höheres Verhältnis immunstimulatorischer zu modulatorischer PALMs besitzen wurde angenommen, dass diese ein höheres immunstimulatorisches Potential besitzen.

In den Analysen ließ sich eine konzentrationsabhängige Migration der Neutrophilen Granulozyten auf die WPE feststellen, wobei die höchste Migration auf 10 mg/ml zu beobachten war. Im Vergleich der „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen zeigte sich in allen eingesetzten Konzentrationen eine signifikant stärkere Chemotaxis Neutrophiler Granulozyten hin zu „Hoch-Ozon“ Pollen (Abb. 20, A). Bei der Einzelbetrachtung eingesetzter Pollenextrakte (n=4) in Bezug auf die Ozonexposition entsprechender Birken, konnte des Weiteren eine Korrelation der Migration mit der Höhe der Ozonexposition beobachtet werden. Diese Korrelation fand sich für alle eingesetzten WPE Konzentrationen (Abb. 20, B-D).

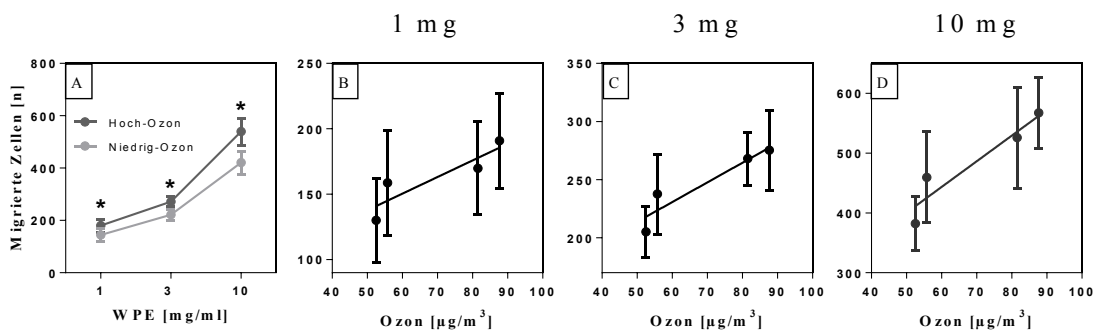


Abb. 20: Vergleich der Neutrophilen Chemotaxis auf „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen. Neutrophile Granulozyten wurden in Migrationsassays mit WPE von „Hoch-“ (n=2; dunkelgraue Punkte und Linie) und „Niedrig-Ozon“ Pollen (n=2; hellgraue Punkte und Linie) eingesetzt. Die WPE wurden in den Konzentrationen 1 mg/ml, 3 mg/ml und 10 mg/ml eingesetzt. Es wurde auf Unterschiede bezüglich der Induktion einer Neutrophilen Chemotaxis zwischen „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen getestet (A) sowie auf Abhängigkeit der Stärke der Migration mit der Höhe der Ozonexposition (B-D; getestet für die eingesetzten Konzentrationen: 1mg/ml (B), 5 mg/ml (C) und 10 mg/ml (D)). Unterschiede in der Neutrophilen Chemotaxis auf „Hoch-“, und „Niedrig-Ozon“ belastete Pollen wurden mittels Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (einseitig) bestimmt. Der Vergleich von „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. *, $p < 0,05$

Allergische kutane Immunreaktion auf „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen

Neben einer veränderten Lipidzusammensetzung konnten ebenfalls höhere Allergengehalte in „Hoch-Ozon“ Pollen beobachtet werden. Die Relevanz dieser erhöhten Allergengehalte sollte anhand der allergischen Immunreaktion in der Haut, induziert durch Pricktestung, untersucht werden.

Beim Vergleich, sowohl der Quaddel- als auch der Erythemgröße der unterschiedlichen Pricklösungen, zeigten sich signifikant größere Quaddeln (Abb. 21, A) und Erytheme (Abb. 21, B) für WPE von „Hoch-Ozon“ Pollen. Betrachtet man die Größe der Quaddeln und Erytheme der einzelnen WPE in Bezug zur Ozonbelastung, gemessen an entsprechender Birke, zeigte sich ähnlich den Migrationsassays eine signifikant positive Korrelation der Quaddel- und Erythemgröße mit der Höhe der Ozonbelastung (Abb. 21, C-D).

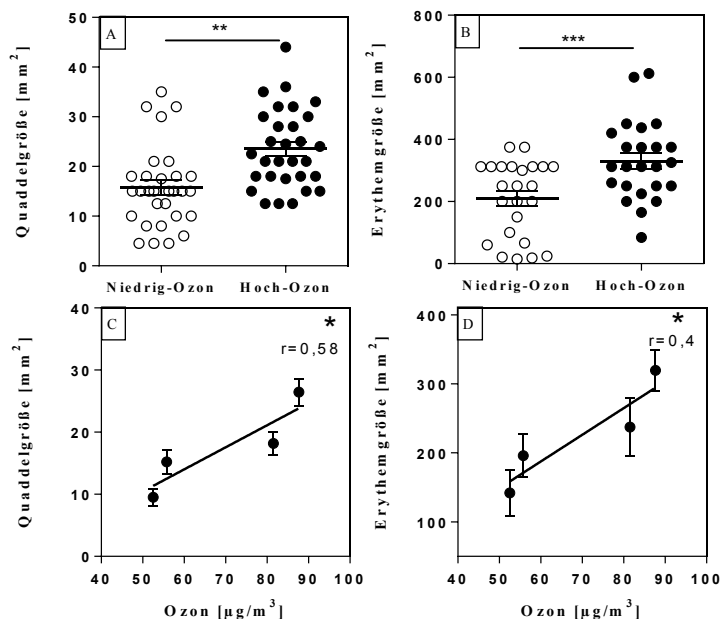


Abb. 21: Quaddelbildung in Pricktestung mit WPE von „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen. Birkensensibilisierte Probanden (n=5) wurden mit WPE von „Hoch-“, (n=2) und „Niedrig-Ozon“ (n=2) Pollen geprickt und Quaddel- und Erythembildung gemessen. (A-B; Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig)). Zudem wurde der Zusammenhang zwischen Ozonexposition und Quaddel- und Erythemgröße analysiert (C, D; Spearman-Korrelation (zweiseitig)). Der Vergleich „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ belasteter Pollen ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

6.1.2 Immunmodulation durch WPE <3kDA

6.1.2.1 Einfluss von WPE auf die humane Mastzelllinie LAD2

Adenosin und PALMs sind Allergen-unabhängige, niedermolekulare Substanzen mit immunmodulatorischer und -stimulatorischer Kapazität die in Pollen identifiziert wurden und deren Zusammenhang mit Faktoren der Urbanisierung im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Im weiteren Verlauf sollte die Bedeutung Allergen-unabhängiger Substanzen aus Pollen in der Auslösephase, der Sofortreaktion, der allergischen Reaktion näher untersucht werden. Eine besondere Rolle in der Auslösephase der allergischen Reaktion nimmt die Mastzelle ein, welche nach Aktivierung zu den typischen Symptomen der Soforttypreaktion führt. Um den Einfluss Allergen-unabhängiger Faktoren aus Pollen auf Mastzellen zu klären, wurde die humane Mastzelllinie LAD2 über 24h mit IgE sensibilisiert und in Folge mit Anti-IgE in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von WPE (1mg/ml, 3 mg/ml, 10 mg/ml) aktiviert. Bestimmt wurde im Anschluss der Anteil ausgeschütteter β -Hexosaminidase.

Die Analysen zeigten, dass eine Anti-IgE vermittelte Aktivierung der Mastzelllinie LAD2 in Anwesenheit von WPE zu einer tendenziell verstärkten β -Hexosaminidase-Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle führt (Abb. 22). Hierbei konnte eine höhere Signifikanz für die niedrigeren WPE Konzentrationen von 1 mg/ml und 3 mg/ml WPE ($p=0,063$) im Vergleich zu 10 mg/ml beobachtet werden ($p=0,13$).

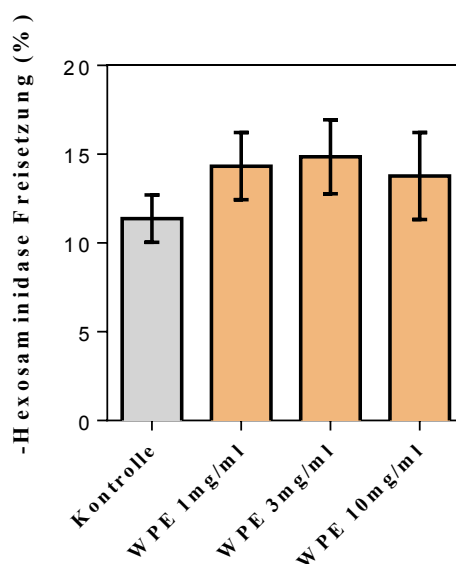


Abb. 22: β -Hexosaminidase-Ausschüttung von LAD2 unter anti-IgE Aktivierung in Anwesenheit von WPE. Die humane Mastzelllinie LAD2 wurde in 4 unabhängigen Versuchen über 24h mit Anti-IgE sensibilisiert und in Folge mit Anti-IgE plus WPE verschiedener Konzentrationen (1 mg/ml, 3 mg/ml und 10 mg/ml; orange Balken) stimuliert. Die Kontrolle war die alleinige Stimulation mit Anti-IgE (grauer Balken). Das verwendete Testverfahren ist der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig). Der Vergleich „Hoch-“ und „Niedrig-Ozon“ belasteter Pollen ist dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler.

6.1.2.2 Einfluss von WPE <3kDa auf die allergischen Hautreaktion

Nachdem eine aggravierende Wirkung des WPE auf die Anti-IgE vermittelte Mastzelldegradation der humanen Mastzelllinie LAD2 beobachtet werden konnte, sollte im Folgenden die Allergen-unabhängige Wirkung des WPE auf die allergische Hautreaktion *in vivo* untersucht werden. Bei den bereits in Pollen identifizierten immunwirksamen Faktoren Adenosin und PALMs handelt es sich um niedermolekulare Moleküle. Aus diesem Grund wurden für die *in vivo* Testung die Möglichkeiten der immunwirksamen Substanzen eingegrenzt und der Fokus auf die Wirkung niedermolekularer Substanzen gelegt. Hierfür wurden Pricktestungen mit WPE ab- und angereichert mit Substanzen kleiner 3 kDa durchgeführt.

Mittels Ultrazentrifugation über 3 kDa cut-off Filter wurden WPE in eine größer (> 3 kDa) und kleiner 3 kDa Fraktion (< 3 kDa) separiert. Die > 3 kDa Fraktion, welche das Allergen enthielt, wurde zum einen mit PBS, zum anderen mit der <3 kDa Fraktion verdünnt. So entstanden 2 Pricklösungen mit gleicher Allergenkonzentration, ab- und angereichert mit Sub-

stanzen kleiner 3 kDa. Es wurde getestet, ob niedermolekulare Substanzen bei selbem Allergengehalt in Pricktestungen Einfluss auf Quaddel- und Erythemgrößen nehmen.

Hierfür wurden zunächst 3 Birkenpollenallergiker repetitiv (2x) mit Pricklösungen (n=4) an- und abgereichert mit Substanzen kleiner 3 kDa geprickt. Die repetitive Pricktestung wurde an zwei Tagen im Abstand von mindestens 24h mit den Birkenpollenextrakten zweier verschiedener Birken (# 5; #17) durchgeführt. Jede Pricklösung wurde dabei 4-5 mal pro Termin und Patient geprickt, das Readout war die Quaddelgröße.

Mit Ausnahme von Patient 3, zum 2. Termin mit dem Standort 5 (Abb. 23, F), zeigte sich bei allen Probanden zu beiden Zeitpunkten und bei beiden WPE (# 5; #17) ein aggravierender Effekt der <3kDa Fraktion auf die allergische Hautreaktion (Abb. 23, A-F). Der Effekt war nach Patient, Standort und Zeitpunkt unterschiedlich ausgeprägt, ebenso wie die Quaddelgröße selbst. Bei Patient 1 zeigte sich mit denselben Pricklösungen eine bis zu 10-fach größere Quaddelbildung (Abb. 23, A, D), wobei Patient 2 und 3 im gleichen Größenbereich lagen (Abb. 23, B-C, E-F).

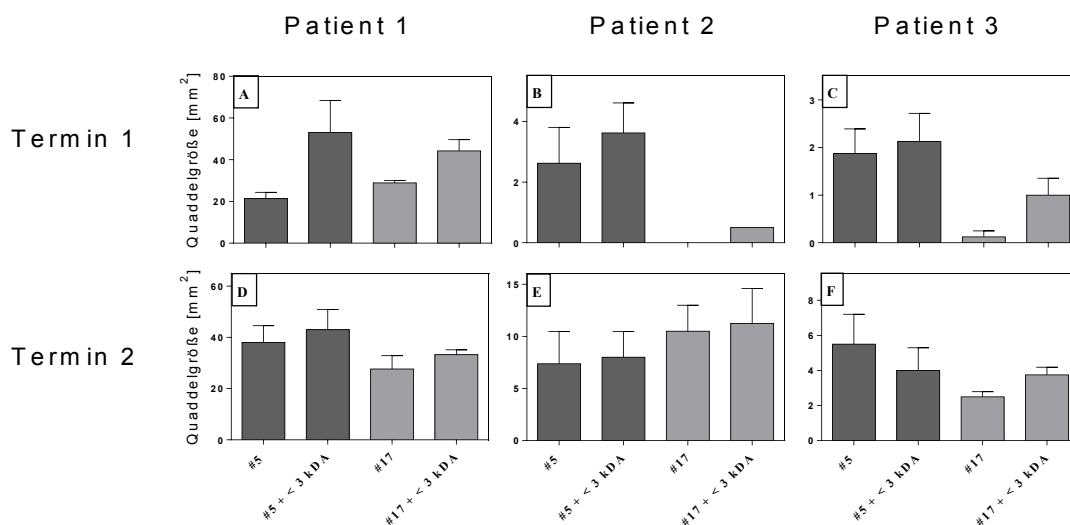


Abb. 23: Wirkung von WPE<3kDa auf die Quaddelgröße in repetitiven Pricktestungen. Es wurden Pricklösungen ab- (+PBS) und angereichert (+< 3kDa) mit niedermolekularen Substanzen von WPE hergestellt und in Pricktestungen an Birkenpollen-sensibilisierten Probanden (n=3) getestet (A-F). Es wurde repetitiv an 2 Terminen getestet. Getestet wurden WPE, hergestellt aus Pollen von 2 verschiedenen Birken (Standort 5=dunkelgraue Balken; Standort 17=hellgraue Balken). Dargestellt ist der Mittelwert der Quaddelgrößen \pm Standardfehler.

Die aggravierende Wirkung der WPE < 3 kDa auf die allergische Hautreaktion wurde in mehreren Probanden weiter untersucht, wobei sich ein signifikant aggravierender Effekt auf die Quaddelgröße zeigte (n=6; Abb. 24, A). Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Effekt um einen vom Sensibilisierungsstatus abhängigen oder um eine allgemein aggravierende

Wirkung auf die allergische Reaktion handelt, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der WPE < 3 kDa auf nicht gegen Birke sensibilisierte Probanden untersucht. Hierfür wurden Gräserpollenallergiker (keine Birkensensibilisierung) mit dem Gräserpollenallergen (n=2) Phl p 6 geprickt. Dieses wurde zum einen in PBS, zum anderen in der WPE <3 kDa gelöst. Somit entstanden wiederum 2 Pricklösungen mit gleichem Allergengehalt mit und ohne niedermolekulare Substanzen.

Auch in den Gräserpollenallergikern zeigte sich eine Aggravation der allergischen Hautreaktion durch die niedermolekulare Fraktion des Birkenpollenextraktes (Abb. 24, B). Trotz selber Allergenkonzentration von Phl p 6 induzierte die Pricklösung angereichert mit niedermolekularen Substanzen des Birkenpollenextraktes eine größere Quaddelbildung in nicht gegen Birke sensibilisierten Gräserpollenallergikern.

Bisherig identifizierte niedermolekulare immunwirksame Substanzen in WPE sind PALMs und Adenosin. Zielzelle der Pricktestung ist die Mastzelle auf der bereits eine Expression verschiedener Adenosinrezeptoren beschrieben wurde. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob Adenosin möglicherweise beteiligt an der aggravierenden Wirkung des WPE <3 kDa in der Pricktestung ist.

Hierfür fanden weitere Pricktestung an Birkenpollen- und Gräserpollen-sensibilisierten Probanden statt. Diesmal wurde die niedermolekulare Fraktion des WPE durch eine Adenosinlösung ersetzt. Für die Pricktestungen mit Birkenpollenallergikern wurde die größer 3 kDa Fraktion zum einen in PBS, zum anderen in einer Adenosinlösung verdünnt. Für die Gräserpollenallergiker wurde Phlp6 ebenfalls in PBS oder einer Adenosinlösung verdünnt. Die Endkonzentration von Adenosin in den Pricklösungen betrug $3 \cdot 10^{-6}$ M. Dies entspricht der Konzentration, welche in WPE gemessen wurde.

Sowohl beim Birken- als auch beim Gräserpollenallergiker induzierte die Pricklösung mit Adenosin eine größere Quaddelbildung (Abb. 24, C-D). Pricktestung mit Adenosin aggravierte somit entsprechend der WPE <3kDa ebenfalls die allergische Hautreaktion.

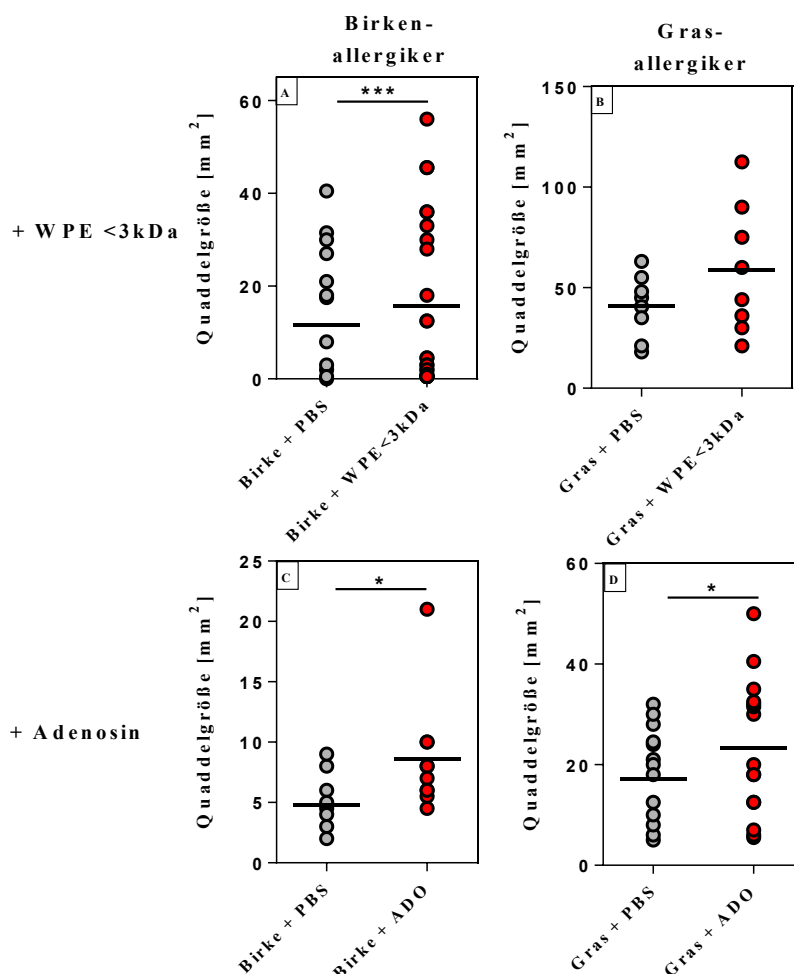


Abb. 24: Wirkung von WPE <3kDa und Adenosin auf die Quaddelgröße in Pricktestungen. Birken- (A, C) und Gräserpollenallergiker (B, D) wurden mit verschiedenen Pricklösungen gleicher Allergengehalte mit unterschiedlichen Gehalten niedermolekularer Substanzen geprickt und in Folge die Quaddelgröße bestimmt. Beim Birkenpollenallergiker wurden hierbei Pricklösungen des Birken-WPE >3kDa ab- (Birke+PBS) und angereichert (Birke+WPE<3kDa) mit Substanzen kleiner 3 kDa verglichen (A; n=6), sowie Birken-WPE >3kDa ohne (Birke+PBS) und mit Adenosin (Birke+ADO) (C; n=3). Beim Gräserpollenallergiker wurden Pricklösungen mit dem Allergen Phlp6 ohne (Gras+PBS) und mit Substanzen kleiner 3kDa (Gras+WPE<3kDa) (B n=2) sowie ebenfalls ohne (Gras+PBS) und mit Adenosin (Gras+ADO) verglichen (D; n=4). Das verwendete Testverfahren ist der Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$

6.1.2.3 Einfluss von WPE <3kDa auf Basophile Granulozyten

Neben Mastzellen exprimieren auch Basophile Granulozyten den Fc ϵ RI und auch ihnen wird eine Beteiligung bei der Soforttypallergie zugeschrieben. Aus diesem Grund wurde die Wirkung des WPE <3kDa sowie Adenosin zusätzlich auf diesen Zelltyp analysiert.

Mit Hilfe eines Basophilen Aktivierungstests wurde der Einfluss der WPE <3kDa sowie Adenosin auf die Allergen-abhängige sowie Allergen-unabhängige Aktivierung Basophiler Granulozyten untersucht. Hierfür wurden Basophile Granulozyten aus dem Blut von Allergikern isoliert und in An- und Abwesenheit von WPE <3kDa oder Adenosin mit dem entspre-

chenden Allergen (Bet v 1; Phl p 1) stimuliert. Das Readout war hierbei die prozentuale Expression der Aktivierungsmarker CD63 und CD203.

In Basophilen Granulozyten führte bereits die alleinige Allergen-unabhängige Stimulation mit WPE <3kDa (n=4) zu einer signifikanten Aktivierung, gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von CD63 und CD203. Wurden Basophile Granulozyten parallel mit Allergen und WPE <3kDa stimuliert, zeigte sich eine Aggravation der Allergen-abhängigen Aktivierung (n=2).

Auch Basophile Granulozyten exprimieren Adenosinrezeptoren. Aus diesem Grund wurde getestet, ob Pollen-Adenosin an der Aggravation der Basophilenaktivierung durch WPE <3kDa beteiligt sein könnte. Hierfür wurden Basophile Granulozyten parallel mit Allergen und Adenosin stimuliert. Auch Adenosin war in der Lage die Allergenabhängige Aktivierung der Basophilen Granulozyten zu aggravierern. Die aggravierende Wirkung lag im ähnlichen Bereich wie die der WPE <3kDa, womit Adenosin die aggravierende Wirkung der WPE <3kDa nachbilden konnte.

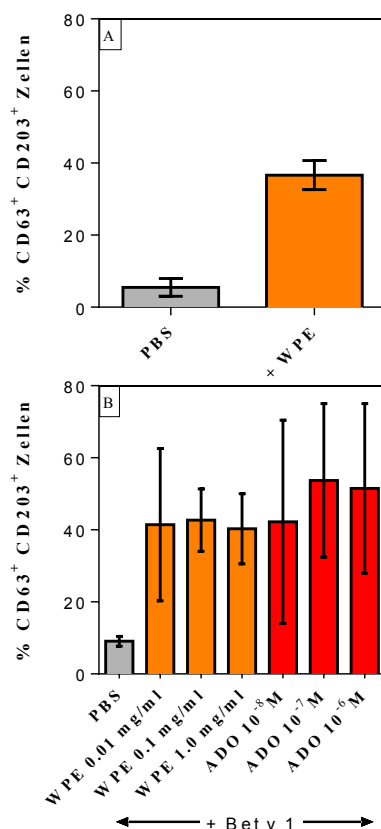


Abb. 25: Aktivierung Basophiler Granulozyten durch WPE <3kDa und Adenosin. Basophile Granulozyten wurden aus dem Blut von Birken- und Gräserpollen-sensibilisierten Probanden isoliert und Allergen-unabhängig (A; n=4; WPE 30 mg/ml) und Allergen-abhängig (B; n=2; WPE 0,01 mg/ml / 0,1 mg/ml / 1 mg/ml) mit WPE stimuliert. Die Allergen-abhängige Stimulation fand zusätzlich mit Adenosin in den Konzentrationen $1 \cdot 10^{-8}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M statt. Das verwendete Testverfahren für die Allergen-unabhängige Aktivierung ist der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig).

6.2 Intrinsische Immunmodulation

Die Antwort des Immunsystems auf ein Antigen wird maßgeblich von parallel vorkommenden Antigen-unabhängigen Faktoren, dem sogenannten Mikromillieu, beeinflusst. Dieses Mikromillieu kann sowohl aus extrinsischen Faktoren als auch intrinsischen Faktoren bestehen. Während sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Immunmodulation durch extrinsische Faktoren beschäftigte, lag der Fokus des zweiten Teils auf der Immunmodulation durch intrinsische Faktoren. Hierbei wurde der Einfluss der Sexualhormone 17β -Östradiol und Testosteron sowie des Adipokins Leptin auf die Immunantwort untersucht.

Immunmodulation durch 17β -Östradiol, Testosteron und Leptin

Epidemiologische Beobachtungen deuten auf eine gesteigerte Immunantwort beim weiblichen Geschlecht hin. Gleichzeitig können höhere Konzentrationen des Adipokins Leptin in Frauen beobachtet werden [300], dessen Konzentration wiederum in Abhängigkeit zu den Sexualhormonen steht. Fraglich ist, welchen immunologischen Zusammenhang die Sexualhormone mit Leptin haben und inwieweit die erhöhten L-Konzentrationen in Frauen mitverantwortlich für deren gesteigerte Immunantwort gemacht werden können.

Um diese Fragen zu klären, sollte der Einfluss der Hormone alleinig als auch in Kombination auf das Immunsystem analysiert werden. Untersucht wurde hierbei die Wirkung auf Zellen des innatens Immunsystems, auf Monozyten, als auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems, auf T-Zellen. Im Hinblick auf T-Zellen sollte sowohl die Wirkung auf naive (RA^+) T-Zellen als auch Gedächtnis (memory) T-Zellen untersucht werden.

6.2.1 Wirkung von 17β -Östradiol, Testosteron und Leptin auf Monozyten

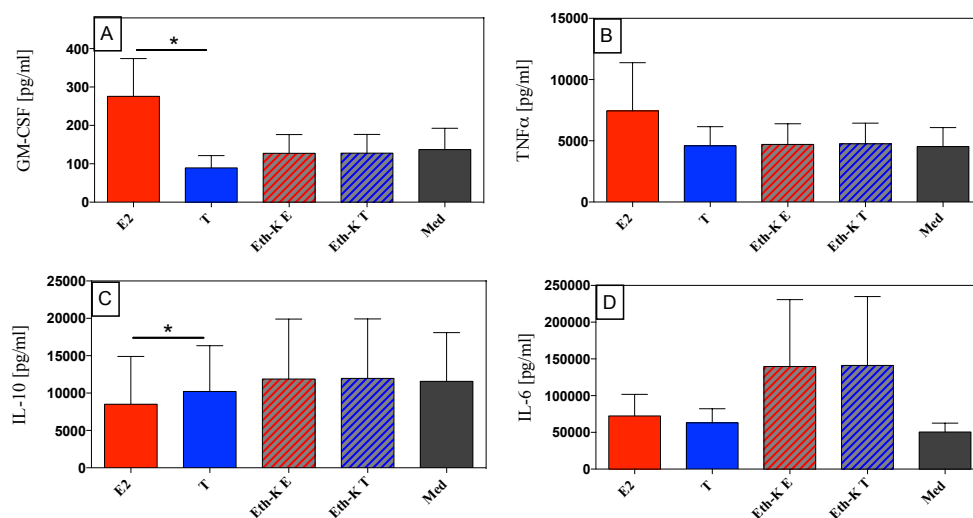
Die Stimulation der Monozyten unter 17β -Östradiol- im Vergleich zur Testosteron-Inkubation zeigte signifikante Unterschiede in der Sekretion der Zytokine GM-CSF und IL-10 (Abb. 26, A, C). Die Stimulation unter 17β -Östradiol-Inkubation führte zu einer signifikant höheren GM-CSF- und niedrigeren IL-10 Sekretion (Abb. 26, A, C). Für die Testosteron-Inkubation konnten nicht signifikant hemmende Effekte auf die GM-CSF Sekretion ($p=0,1165$) und kein Effekt auf die IL-10 Sekretion beobachtet werden (Abb. 26, A,C). Ebenfalls ließ sich ein Trend hin zu einer höheren TNF- α Sekretion unter 17β -Östradiol-Inkubation im Vergleich zur Testosteron-Inkubation feststellen ($p=0,1094$; Abb. 26, B). Für beide Hormonbedingungen unverändert zeigte sich die IL-6 Sekretion (Abb. 26, D). Mitgeführte Kontrollen (Eth-K E; Eth-K T) zeigten keinen Effekt auf die Zytokinsekretion (Abb. 26, A-D).

Zusammenfassend ließ sich die Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils durch 17 β -Östradiol beobachten, welches durch eine höhere GM-CSF und TNF- α und niedrigere IL-10 Sekretion gekennzeichnet war (Abb. 26, A, C-D).

Parallel zur Zytokinsekretion wurde der Einfluss von 17 β -Östradiol und Testosteron auf die Apoptoserate der Monozyten analysiert. Dies gab zudem Aufschluss darüber, ob Unterschiede in der Zytokinsekretion auf unterschiedliche Überlebensraten (Lebendzellzahl) zurückgeführt werden könnten.

Weder 17 β -Östradiol noch Testosteron oder die Lösungsmittelkontrollen zeigten einen Einfluss auf die Überlebensrate der Monozyten (Abb. 26, E). Damit konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die beobachtete unterschiedliche Zytokinsekretion aus unterschiedlichen Überlebensraten resultierte.

I Zytokine



II Überlebensrate

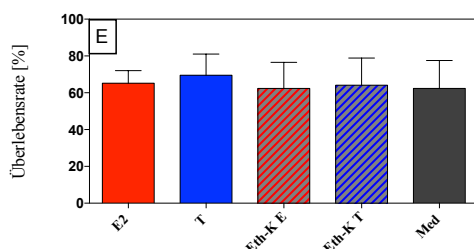


Abb. 26: Zytokinsekretion von Monozyten nach Stimulation unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Monozyten (n=7) wurden unter 17 β -Östradiol- (rote Balken) oder Testosteron-Inkubation (blaue Balken) stimuliert. Es wurden entsprechende Lösungsmittelkontrollen für 17 β -Östradiol (rot gestreifte Balken) und Testosteron (blau gestreifte Balken) und eine Mediumkontrolle (schwarze Balken) mitgeführt. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine (I) GM-CSF (A), TNF- α (B), IL-10 (C) und IL-6 (D) bestimmt. Parallel wurde die Überlebensrate (II) der Monozyten (n=4) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler. E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron; Eth-K E2=Ethanolkontrolle für E2; Eth-K T=Ethanolkontrolle für Testosteron; Med=Medium; *, p<0,05

Tabelle 5: P-Werte der Analysen auf Unterschiede zwischen 17 β -Östradiol- und Testosteroninkubation aus Abb. 26. ¹: gepaarter T-Test (zweiseitig); ²: Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig); dunkelgrau: 5% Signifikanzniveau; hellgrau: 20% Signifikanzniveau; E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron; Eth-K E2=Ethanolkontrolle für E2; Eth-K T=Ethanolkontrolle für Testosteron; Med=Medium;

Bedingung vs Bedingung	E2 vs T	E2 vs Eth-K E2	T vs Eth-K T	Eth-K E2 vs Eth-K T	Eth-KE2 vs Med	Eth-K T vs Med
GM-CSF	0,04 ¹	0,04 ¹	0,12 ¹	0,42 ¹	0,59 ¹	0,61 ¹
TNF- α	0,11 ²	0,30 ²	0,69 ²	0,50 ²	0,58 ²	0,58 ²
IL-10	0,05 ²	0,11 ²	0,30 ²	1 ²	0,94 ²	0,94 ²
IL-6	0,47 ¹	0,22 ²	0,69 ²	1 ²	0,38 ²	0,38 ²
Überlebensrate	0,43 ¹	0,74 ¹	0,28 ¹	0,55 ¹	0,99 ¹	0,29 ¹

Analyse des Zytokinprofils

Zytokine können synergistische als auch antagonistische Effekte haben, womit für den Verlauf einer Immunantwort das Verhältnis der Zytokine zueinander von entscheidender Bedeutung ist. Um diesem Aspekt Rechnung zu tragen, wurde in Folge nicht mehr nur die Konzentration der Zytokine alleinig, sondern im Verhältnis zueinander für die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen betrachtet. Das Verhältnis der Zytokine zueinander wurde als prozentualer Anteil der Summe der bestimmten Zytokine GM-CSF, TNF- α und IL-10 berechnet. Die IL-6 Konzentration war nicht von den Inkubationsbedingungen beeinflusst, weshalb sie nicht in die Berechnung miteinbezogen wurde.

Die Stimulation von Monozyten unter 17 β -Östradiol-Inkubation im Vergleich zur Testosteron-Inkubation führte zu einem Zytokinprofil mit einem höheren Anteil proinflammatorischer Zytokine (Abb. 27, A). Die Stimulation unter 17 β -Östradiol-Inkubation zeigte hierbei einen mehr als 3-fach höheren Anteil GM-CSF, einen 1,4-fach höheren Anteil TNF- α und einen ca. 1/4 geringeren Anteil IL-10 (Abb. 27, A) im Vergleich zur Testosteron-Inkubation (Abb. 27, B). Die Kontrollen hatten keinen Einfluss auf das Zytokinprofil (Abb. 27, C-E).

Im Vergleich zur Kontrolle ließ sich für 17 β -Östradiol eine prozentuale Induktion von GM-CSF und TNF- α und eine Hemmung von IL-10 beobachten (Abb. 27, A, C).

Testosteron zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine schwache GM-CSF und IL-10 Hemmung und leichte TNF- α Induktion (Abb. 27; B, D). Im Vergleich zu 17 β -Östradiol zeigte Testosteron somit nur einen marginalen Einfluss auf das Zytokinprofil (Abb. 27, A-D, Tabelle).

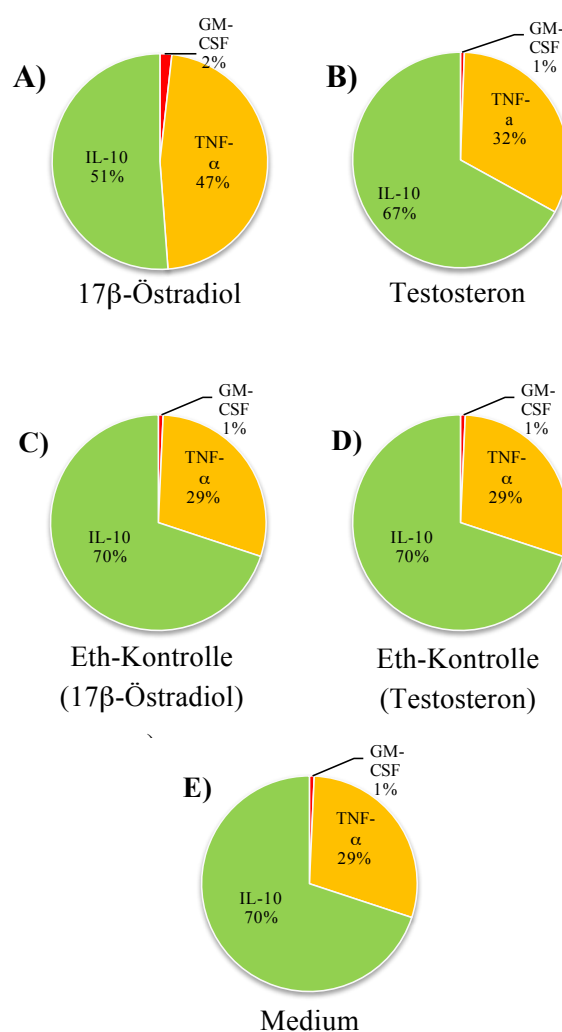


Abb. 27: Zytokinprofil von Monozyten nach Stimulation unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron Inkubation. Monozyten (n=7) wurden unter 17 β -Östradiol (A) - oder Testosteron-Inkubation (B) stimuliert, wobei entsprechende Lösungsmittelkontrollen für 17 β -Östradiol (C) und Testosteron (D) und eine Mediumkontrolle (E) mitgeführt wurden. Im Anschluss wurden aus dem Überstand die Zytokine (I) GM-CSF (rot), TNF- α (B), IL-10 (grün) und IL-6 (nicht dargestellt, da kein Einfluss von 17 β -Östradiol oder Testosteron) bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zytokine GM-CSF, TNF- α und IL-10 berechnet auf ihre Summe.

Wirkung von Leptin allein und in Koinkubation auf Monozyten

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob Leptin synergistische oder antagonistische Effekte mit oder zu 17 β -Östradiol oder Testosteron in Monozyten zeigt. Hierfür wurden parallel Koinkubationen der Sexualhormone mit Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) durchgeführt und mit den Einzelhormoninkubationen verglichen. Eine Leptin-Inkubation sollte den alleinigen Effekt von Leptin klären.

Leptin allein zeigte keinen Einfluss auf die GM-CSF Sekretion hatte. Dahingegen führte die Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin zu höheren GM-CSF Konzentrationen als dies für die alleinige 17 β -Östradiol -Inkubation zu beobachten war. Dies lässt auf einen synergis-

tischer Effekt von Leptin und 17 β -Östradiol bezüglich einer Stimulation der GM-CSF Sekretion schließen (Abb. 28, A). Für Testosteron ließ sich ebenfalls eine Steigerung der GM-CSF Sekretion beobachten. Das Resultat war hingegen, dass die inhibierende Wirkung von Testosteron auf die GM-CSF Sekretion aufgehoben wurde. Damit antagonisierte Leptin den Effekt von Testosteron (Abb. 28, A).

Ebenfalls deutete sich eine synergistische Wirkung von Leptin und 17 β -Östradiol in Bezug auf die IL-10 Sekretion an (Abb. 28, C). So zeigte sich eine verstärkte IL-10 Hemmung von 17 β -Östradiol in Kombination mit Leptin im Vergleich zu 17 β -Östradiol allein an ($p=0,1094$), wobei auch hier für Leptin alleinig kein Effekt auf die IL-10 Sekretion beobachtet werden konnte (Abb. 28, C). Entsprechende Effekte waren für Testosteron und Leptin nicht zu beobachten (Abb. 28, C).

Auf die IL-6 Sekretion hatten weder 17 β -Östradiol noch Testosteron Einfluss und auch die Koinkubation mit Leptin führte zu keiner Veränderung der IL-6 Konzentrationen. Leptin alleinig hingegen führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-6 Sekretion (Abb. 28, D). Der Vergleich der Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin mit der Koinkubation von Testosteron und Leptin zeigte die gleichen Unterschiede, wie sie bereits bei der alleinigen 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubation zu beobachten waren (Abb. 27). Hingegen waren die Effekte tendenziell stärker ausgeprägt und die Signifikanzen höher (Abb. 28, Tabelle). Dies spricht für synergistische Effekte der Sexualhormone mit Leptin. Auch hier induzierte die Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin im Vergleich zur Koinkubation von Testosteron und Leptin ein proinflammatorisches Zytokinmilieu in Monozyten, geprägt von höheren GM-CSF und TNF- α und niedrigeren IL-10 Konzentrationen (Abb. 28).

Bei Betrachtung der Überlebensrate deutete sich für die Koinkubation von Testosteron und Leptin eine reduzierte Überlebensrate gegenüber alleiniger Testosteron-Inkubation an, wobei kein Unterschied zur Kontrolle bestand. Zwischen der Koinkubation von 17 β -Östradiol mit Leptin und alleiniger 17 β -Östradiol-Inkubation ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Überlebensrate der Monozyten (Abb. 28, E).

I Zytokine

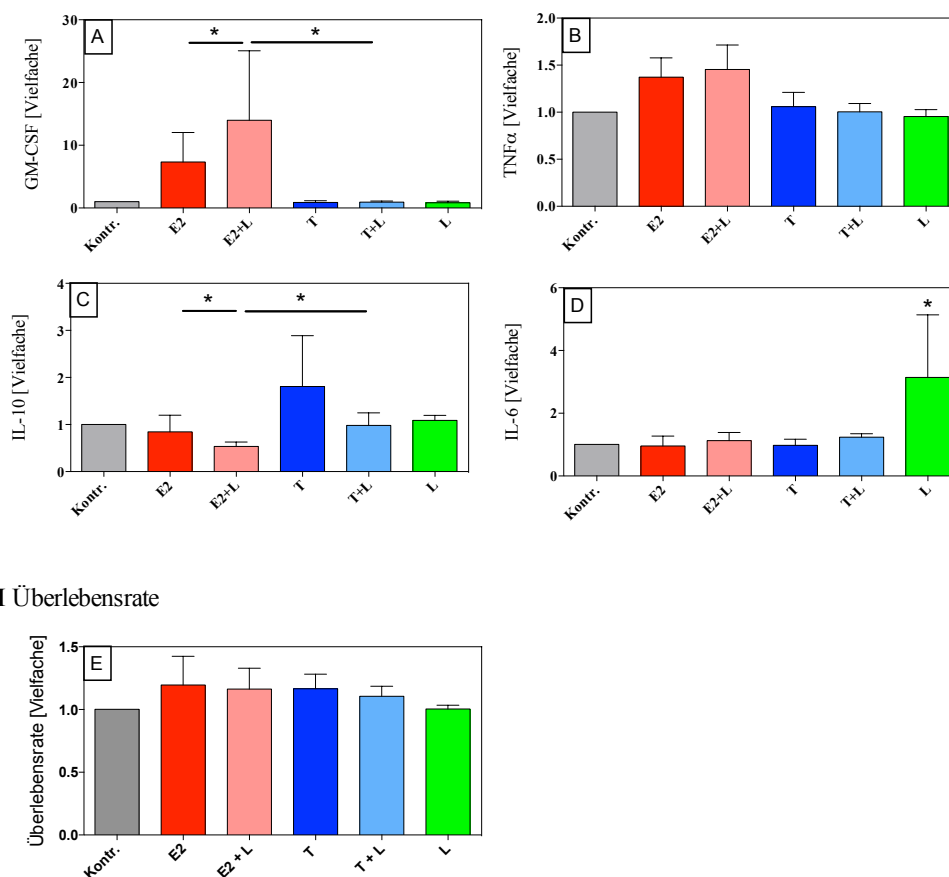


Abb. 28: Einfluss von Leptin auf die Zytokinsekretion von Monozyten unter 17β-Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Monozyten (n=7) wurden unter 17β-Östradiol-Inkubation (rote Balken), Koinkubation von 17β-Östradiol und Leptin (hellrote Balken), Testosteron-Inkubation (blaue Balken), Koinkubation von Testosteron und Leptin (hellblaue Balken), sowie Leptin Inkubation für 24h stimuliert. Im Anschluss wurden aus dem Überstand die Zytokine (I) GM-CSF (A), TNF-α (B), IL-10 (C) und IL-6 (D) bestimmt. Parallel wurde die Überlebensrate (II) der Monozyten (n=4) ermittelt. Dargestellt ist das Vielfache der Kontrollen. Kontr.=Kontrolle, E2=17β-Östradiol, T=Testosteron, E2+L=Koinkubation 17β-Östradiol und Leptin, T+L=Koinkubation Testosteron und Leptin, L=Leptin; *: p<0,05

Tabelle 6: P-Werte der Analysen auf Unterschiede zwischen Einzelhormoninkubation mit 17β-Östradiol und Testosteron und Koinkubation mit Leptin aus Abb. 28. (dunkelgrau=5% Signifikanzniveau; mittelgrau=10% Signifikanzniveau; hellgrau=20% Signifikanzniveau)

Bedingung vs Bedingung	E2 vs E2 + L	T vs T + L	E2 + L vs T + L	L vs Med	E2 + L vs Eth-K E2	T + L vs Eth-K T	Eth-K E2 vs Eth-K T	Eth-K E2 vs Med	Eth-K T vs Med
GM-CSF	0,02 ¹	0,08 ¹	0,02 ¹	0,30 ²	0,02 ¹	0,22 ¹	0,42 ¹	0,59 ¹	0,61 ¹
TNF-α	0,58 ²	0,99 ¹	0,08 ²	0,94 ²	0,22 ²	0,94 ²	0,50 ²	0,58 ²	0,58 ²
IL-10	0,11 ²	0,47 ²	0,02 ²	0,22 ²	0,03 ²	0,16 ²	1 ²	0,94 ²	0,94 ²
IL-6	0,38 ²	0,58 ²	0,22 ²	0,03 ²	0,69 ²	0,11 ²	1 ²	0,38 ²	0,38 ²
Überlebensrate	0,84 ¹	0,13 ¹	0,70 ¹	0,84 ¹	0,63 ¹	0,42 ¹	0,55 ¹	0,99 ¹	0,29 ¹

¹: gepaarter T-Test (zweiseitig); Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig)

Analyse des Zytokinprofils

Um synergistischen und antagonistischen Effekten von Zytokinen Rechnung zu tragen, wurde entsprechend der Einzelhormoninkubationen auch für die Koinkubationen das Verhältnis der Zytokine zueinander bestimmt. Dieses Verhältnis wurde ebenso als prozentualer Anteil der Summe der Zytokine GM-CSF, TNF- α und IL-10 berechnet.

Betrachtet man das Verhältnis der Zytokine, zeigte sich, dass Leptin das durch 17 β -Östradiol induzierte pro-inflammatorische Zytokinprofil weiter verstärkte (Abb. 29, A, C). Eine Koinkubation mit 17 β -Östradiol und Leptin im Vergleich zu 17 β -Östradiol alleinig führte zu einem weiteren Erhöhung des GM-CSF- und TNF- α -Anteils und einer weiteren Reduzierung des IL-10-Anteils (Abb. 29, A, C).

Für die Koinkubation von Testosteron und Leptin waren ähnliche Tendenzen zu beobachten, jedoch schwächer ausgeprägt (Abb. 29, B, D). Leptin alleinig zeigte wenig Einfluss auf das Zytokinprofil (Abb. 29, C, E), wobei sich eine leichte Steigerung des IL-10 Anteils und Erniedrigung des TNF- α Anteils im Vergleich zur Kontrolle (Med) beobachten ließ.

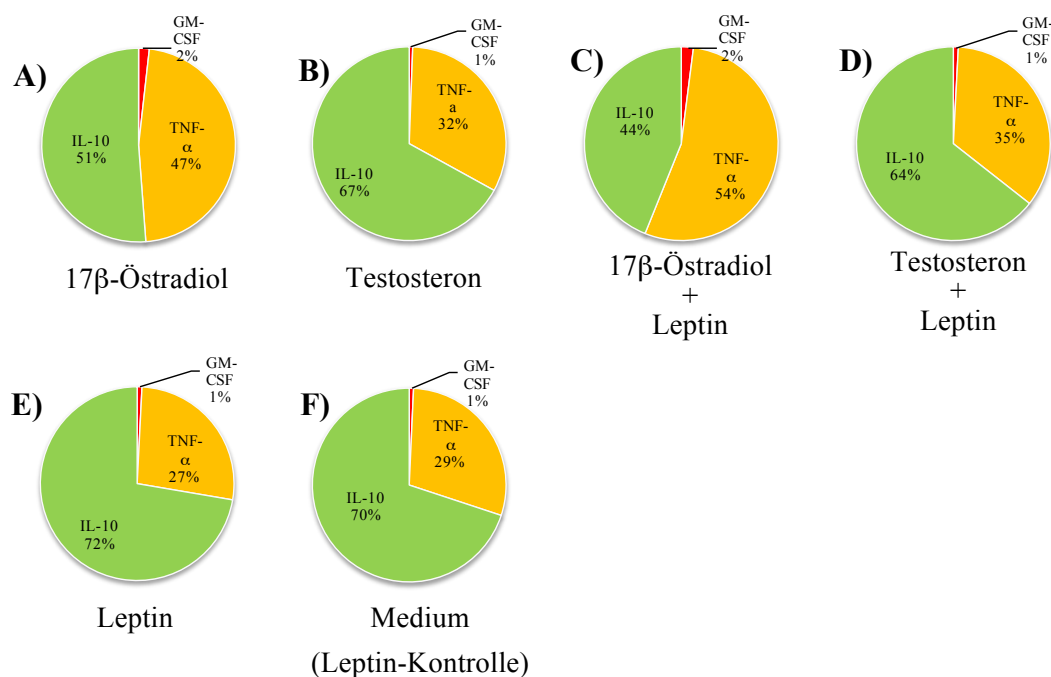


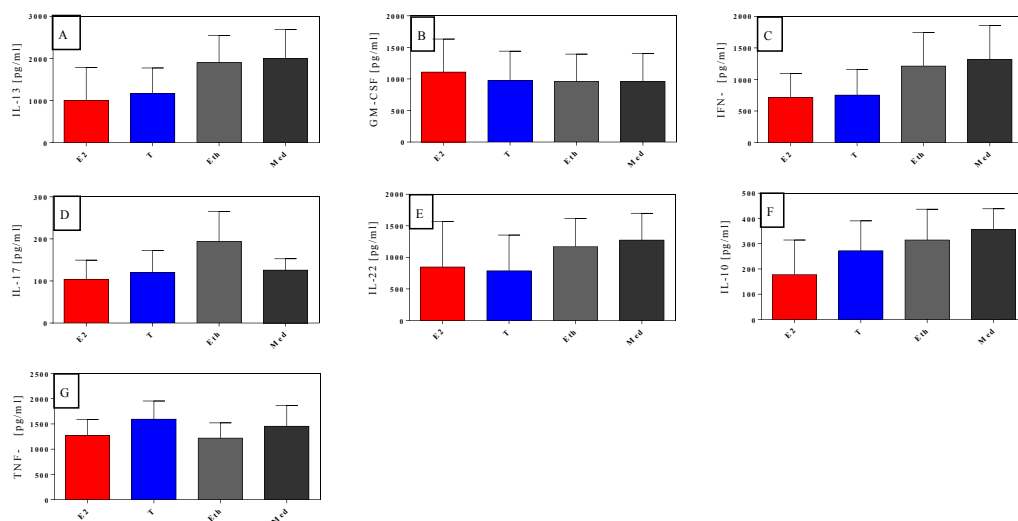
Abb. 29: Einfluss von Leptin auf das Zytokinprofil von Monozyten unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Monozyten wurden unter unterschiedlichen Hormoninkubationen stimuliert und das Zytokinprofil analysiert. Dargestellt sind die Zytokine GM-CSF (rot), TNF- α (orange) und IL-10 (grün) in Prozent. Die untersuchten Hormonbedingungen waren eine Stimulation unter 17 β -Östradiol-Inkubation (A), unter Testosteron-Inkubation (B), unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin (E2+L; D), unter Koinkubation von Testosteron und Leptin (T+L; E) sowie unter Leptininkubation (L; F). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zytokine GM-CSF, TNF- α und IL-10 berechnet auf ihre Summe.

6.2.2 Wirkung von 17 β -Östradiol, Testosteron und Leptin auf naive T-Zellen

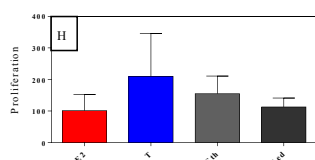
Bei der Stimulation naiver T-Zellen unter 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubation zeigten sich primär hemmende Effekte auf die Zytokinsekretion (Abb. 30, A, C-F). Die n-Zahl der Versuche war mit 4 hingegen verhältnismäßig gering und alle beobachteten Effekte erreichten nicht das Signifikanzniveau. Für beide Hormone ließ sich hingegen gleichermaßen eine nicht signifikante IFN- γ - (Abb. 30, C) sowie IL-17-Hemmung (Abb. 30, D) beobachten, wobei die IL-17-Hemmung für 17 β -Östradiol stärker ausgeprägt war (Abb. 30, Tab.). Für Testosteron ließ sich zudem eine tendenzielle IL-10-Hemmung beobachten (Abb. 30, F Tab). Unterschiede zwischen 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubation zeigten sich für GM-CSF (Abb. 30, B) und TNF- α (Abb. 30, G). Hierbei waren unter 17 β -Östradiol- im Vergleich zur Testosteron-Inkubation tendenziell höhere GM-CSF- und niedrigere TNF- α Konzentrationen zu beobachten.

Während Testosteron keinen Effekt auf die Proliferation und Überlebensrate zeigte (Abb. 30, H-I), konnte für 17 β -Östradiol eine Proliferationshemmung und ein Trend hin zu einer reduzierten Überlebensrate beobachtet werden. Die Aussagekraft über die Überlebensrate ist hingegen aufgrund einer sehr geringen n-Zahl (n=2) schwach (Abb. 30; H-I).

I Zytokine



II Proliferation



III Überlebensrate

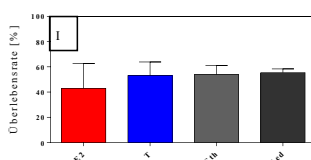


Abb. 30: Zytokinsekretion naiver T-Zellen nach Stimulation unter 17β-Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Naive T-Zellen (n=4) wurden unter 17β-Östradiol- (rote Balken) oder Testosteron-Inkubation (blaue Balken) stimuliert, wobei entsprechende Lösungsmittelkontrollen für 17β-Östradiol /Testosteron (grauer Balken) sowie eine Mediumkontrolle (schwarze Balken) mitgeführt wurden. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine (I) IL-13 (A), GM-CSF (B), IFN-γ (C) IL-17 (D), IL-22 (E), IL-10 (F) und TNF-α (G) bestimmt. Parallel (II) wurde die Proliferation (H; n=4) und die Überlebensrate (I; n=2) der T-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler. E2=17β-Östradiol, T=Testosteron; Eth=Ethanolkontrolle für E2 und T; Med=Medium

Tabelle 7: P-Werte der Analysen auf Unterschiede zwischen 17β-Östradiol- und Testosteron-Inkubation aus Abb. 30. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitige Testung) ermittelt. E2=17β-Östradiol, T=Testosteron; Eth=Ethanolkontrolle für E2 und T; Med=Medium; hellgrau=20% Signifikanzniveau

Bedingung vs Bedingung	E2 vs T	E2 vs Eth-K	T vs Eth-K	Eth-K vs Med
IL-13	0,875	0,375	0,375	0,625
GM-CSF	0,125	0,875	0,875	1
IFN-γ	0,375	0,25	0,25	0,375
IL-17	0,375	0,125	0,25	0,625
IL-22	0,875	0,625	0,375	0,625
IL-10	0,625	0,375	0,125	0,625
TNF-α	0,125	1	0,625	0,625
Proliferation	0,25	0,25	1	1
Überlebensrate	0,5	1	1	1

Analyse des Zytokinprofils

Aufgrund synergistischer als auch antagonistischer Effekte bestimmter Zytokine und der sich daraus ergebenden Bedeutung des Verhältnisses der Zytokine zueinander, wurde auch für die naiven T-Zellen das Verhältnis der Zytokine zueinander als prozentualer Anteil der Summe aller bestimmten Zytokine ermittelt (Abb. 31, A-C).

Bei Betrachtung des Zytokinprofils der unter unterschiedlichen Hormonbedingungen stimulierten naiven T-Zellen zeigten sich ähnliche Effekte für 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubation (Abb. 31, A, B). Diese waren hingegen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Für sowohl 17 β -Östradiol als auch Testosteron ergab sich ein erniedrigter Anteil IL-13 und IFN- γ . Die Erniedrigung des IL-13-Anteils war unter 17 β -Östradiol-Inkubation stärker ausgeprägt, die Erniedrigung des IFN- γ -Anteils war unter Testosteron-Inkubation marginal stärker ausgeprägt. Für beide Hormone gleichermaßen erniedrigt war der IL-17-Anteil. Ebenfalls erniedrigt war der IL-22-Anteil, marginal unter 17 β -Östradiol-, verstärkt unter Testosteron-Inkubation.

Der prozentuale Anteil TNF- α zeigte sich für beide Hormone induziert, für Testosteron deutlich stärker ausgeprägt. Der Anteil GM-CSF war ebenfalls für beide Hormone induziert, wobei hier die Induktion unter 17 β -Östradiol-Inkubation deutlich stärker ausgeprägt war.

Die 17 β -Östradiol Inkubation zeigte zudem eine Reduzierung des IL-10-Anteils.

I Naive CD4⁺ T-Zellen

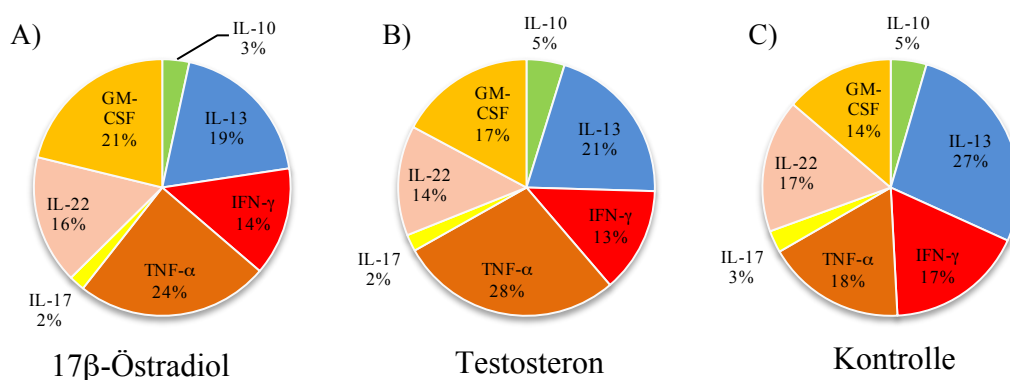


Abb. 31: Zytokinprofil naiver T-Zellen nach Stimulation unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Naive T-Zellen (n=4) wurden unter 17 β -Östradiol (A) - oder Testosteron-Inkubation (B) stimuliert, wobei entsprechende Kontrollen (Ethanol) für 17 β -Östradiol und Testosteron (C) mitgeführt wurden. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine IL-10 (grün), IL-13 (blau), IFN- γ (rot), TNF- α (orange), IL-17 (gelb), IL-22 (hellrot) und GM-CSF (hellorange) bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zytokine berechnet auf ihre Summe.

Wirkung von Leptin alleinig und in Koinkubation auf naive T-Zellen

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob Leptin synergistische oder antagonistische Effekte mit oder zu 17 β -Östradiol oder Testosteron in naiven T-Zellen zeigt. Hierfür wurden Koinkubationen der Sexualhormone mit Leptin ($1,95 \cdot 10^{-7}$ M) durchgeführt und mit den Einzelhormoninkubationen verglichen. Eine Leptin-Inkubation sollte den alleinigen Effekt von Leptin klären.

In den Analysen zeigten sich keine bis antagonistische Effekte von Leptin mit den Sexualhormonen in naiven T-Zellen. Für die Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin ergab sich eine niedrigere GM-CSF-Sekretion unter Koinkubation im Vergleich zu alleiniger 17 β -Östradiol-Inkubation. (Abb. 32, B). Zudem wurde die 17 β -Östradiol induzierte IL-17-Hemmung abgeschwächt (Abb. 32, D). Ebenfalls deuteten sich marginal höhere IL-10-Konzentrationen unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin im Vergleich zur Einzelinkubation von 17 β -Östradiol an (Abb. 32, F).

Für Testosteron und Leptin zeigten sich gegensätzlich zu 17 β -Östradiol marginal höhere GM-CSF-Konzentrationen unter Koinkubation im Vergleich zu Stimulation unter alleiniger Testosteron-Inkubation (Abb. 32, B). Gleichzeitig war ein Trend hin zu einer höheren IL-22 Sekretion unter Koinkubation zu erkennen (Abb. 32, E).

Leptin alleinig induzierte eine höhere IL-17 sowie IL-10 Sekretion (Abb. 32, D, F).

Die Ethanolkontrolle hatte keinen Effekt auf die Zytokinsekretion (Abb. 32, Tabelle).

Die Analyse der Proliferation der Koinkubation von Leptin mit den Sexualhormonen im Vergleich zur Einzelinkubation der Hormone zeigte keine Unterschiede. Auch die Überlebensrate der Koinkubation im Vergleich zur Einzelinkubation der Hormone unterschied sich nicht.

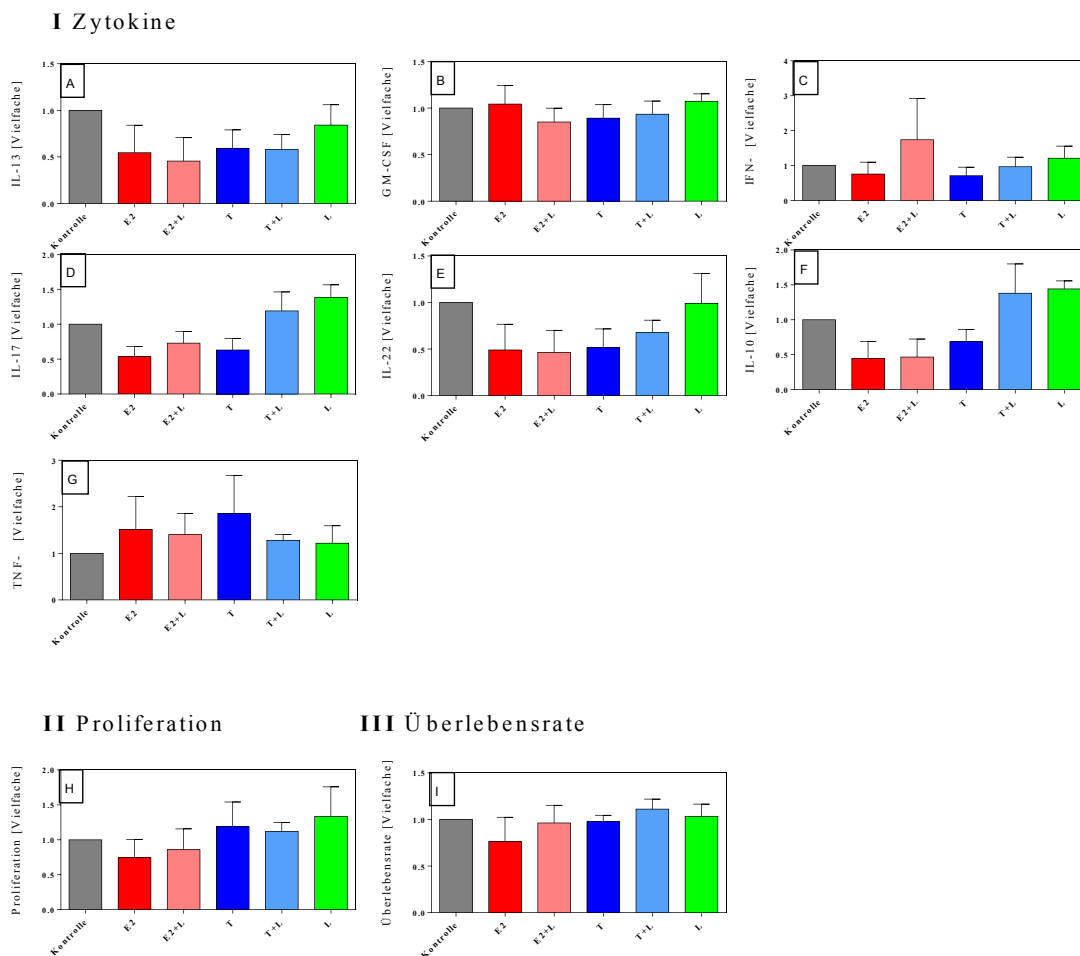


Abb. 32: Einfluss von Leptin auf die Zytokinsekretion von naiven T-Zellen unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Naive T-Zellen (n=4) wurden unter 17 β -Östradiol-Inkubation (rote Balken), 17 β -Östradiol+Leptin- Inkubation (hellrote Balken), Testosteron-Inkubation (blaue Balken), Testosteron + Leptin-Inkubation (hellblaue Balken) sowie Leptin-Inkubation stimuliert. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine (I) IL-13 (A), GM-CSF (B), IFN- γ (C), IL-17 (D), IL-22 (E) IL-10 (F) und TNF- α (G) bestimmt. Parallel (II) wurde die Proliferation (H; n=4) und die Überlebensrate (I; n=2) der T-Zellen ermittelt. Dargestellt ist das Vielfache der Kontrollen. Kontr.=Kontrolle, E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron, E2+L=Koinkubation 17 β -Östradiol und Leptin, T+L=Koinkubation Testosteron und Leptin, L=Leptin

Tabelle 8: P-Werte der Analysen auf Unterschiede zwischen Einzelhormoninkubation mit 17 β -Östradiol und Testosteron und Koinkubation mit Leptin aus Abb. 32. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig) ermittelt. (hellgrau=20% Signifikanzniveau)

Bedingung vs Bedingung	E2 vs E2 + L	T vs T + L	E2 + L vs T + L	L vs Med	E2 + L vs Eth-K E2	T + L vs Eth-K T	Eth-K Vs Med
IL-13	0,38	0,63	0,63	0,88	0,38	0,13	0,63
GM-CSF	0,13	0,63	0,25	0,88	0,63	0,88	1
IFN- γ	0,38	0,63	1	1	0,88	0,38	0,38
IL-17	0,13	0,13	0,13	0,13	0,63	0,63	0,63
IL-22	0,63	0,25	0,63	1	0,38	0,38	0,63
IL-10	0,25	0,38	0,13	0,13	0,63	0,63	0,63
TNF- α	0,88	1	0,88	0,88	0,63	0,25	0,63
Proliferation	0,88	1	0,25	0,63	0,25	0,63	1
Überlebensrate	0,50	0,50	0,50	1	1	0,5	1

Analyse des Zytokinprofils

Auch für die Koinkubation der Sexualhormone mit Leptin in den naiven T-Zellen wurde das Zytokinprofil berechnet. Für das Zytokinprofil wurden die Zytokine als prozentualer Anteil der Summe aller Zytokine bestimmt.

Bei Betrachtung des sich ergebenden Zytokinprofils naiver T-Zellen durch Koinkubation von 17 β -Östradiol mit Leptin im Vergleich zur Einzelinkubation von 17 β -Östradiol, zeigte sich für die Koinkubation eine weitere Reduzierung des IL-13- und IL-22-Anteils (Abb. 33). Gleichzeitig wurde die marginale 17 β -Östradiol-induzierte IFN- γ -Hemmung durch Leptin aufgehoben und der IFN- γ Anteil deutlich erhöht. Der IFN- γ -Anteil der Koinkubation lag damit deutlich über dem der Kontrolle.

Ebenfalls antagonisiert wurde die 17 β -Östradiol-induzierte Erhöhung von GM-CSF. Diese wurde durch Leptin deutlich abgeschwächt, lag hingegen dennoch über dem GM-CSF Anteil der Kontrolle. Gleichzeitig wurde die unter 17 β -Östradiol-Inkubation beobachtete Reduzierung des IL-17 Anteils durch Koinkubation mit Leptin aufgehoben und entsprach wieder dem der Kontrolle. Auf den IL-10-Anteil konnte im Zytokinprofil kaum ein Effekt beobachtet werden, es zeigte sich nur eine 0,2% Erhöhung von IL-10 unter Koinkubation (Abb. 33; 17 β -Östradiol: 3,4%; 17 β -Östradiol+Leptin: 3,6%).

TNF- α , welches unter alleiniger 17 β -Östradiol-Inkubation erhöht war, wurde durch Koinkubation weiter erhöht.

Zusammengefasst führte die Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin zu einem erniedrigten Anteil des Th2-spezifischen Zytokins IL-13 und einem erhöhten Anteil des Th1-spezifischen Zytokins IFN- γ .

Die Koinkubation von Testosteron und Leptin führte zu einem Zytokinprofil mit einem erhöhten Anteil IL-10. Der IL-13-Anteil war ähnlich dem der 17 β -Östradiol- und Leptin-Inkubation unter Koinkubation ebenfalls erniedrigt. Für IFN- γ ließ sich eine marginale Erhöhung unter Testosteron und Leptin im Vergleich zu alleiniger Testosteron-Inkubation beobachten. TNF- α war gegenteilig zu 17 β -Östradiol und Leptin Inkubation unter Koinkubation von Testosteron und Leptin im Vergleich zur Einzelinkubation von Testosteron erniedrigt. Der IL-17 und IL-22-Anteil waren unter Koinkubation leicht erhöht während der GM-CSF-Anteil marginal erniedrigt war.

Die alleinige Leptin-Inkubation führte zu einem höheren Anteil IL-10, einem fast um ein Drittel erniedrigten Anteil IL-13 und hatte keinen Effekt auf den IFN- γ -Anteil. Des Weiteren führte Leptin zu einer Erhöhung des TNF- α - und IL-17-Anteils sowie einer marginalen Erniedrigung des IL-22-Anteils. Auf den GM-CSF-Anteil hatte Leptin keinen Effekt.

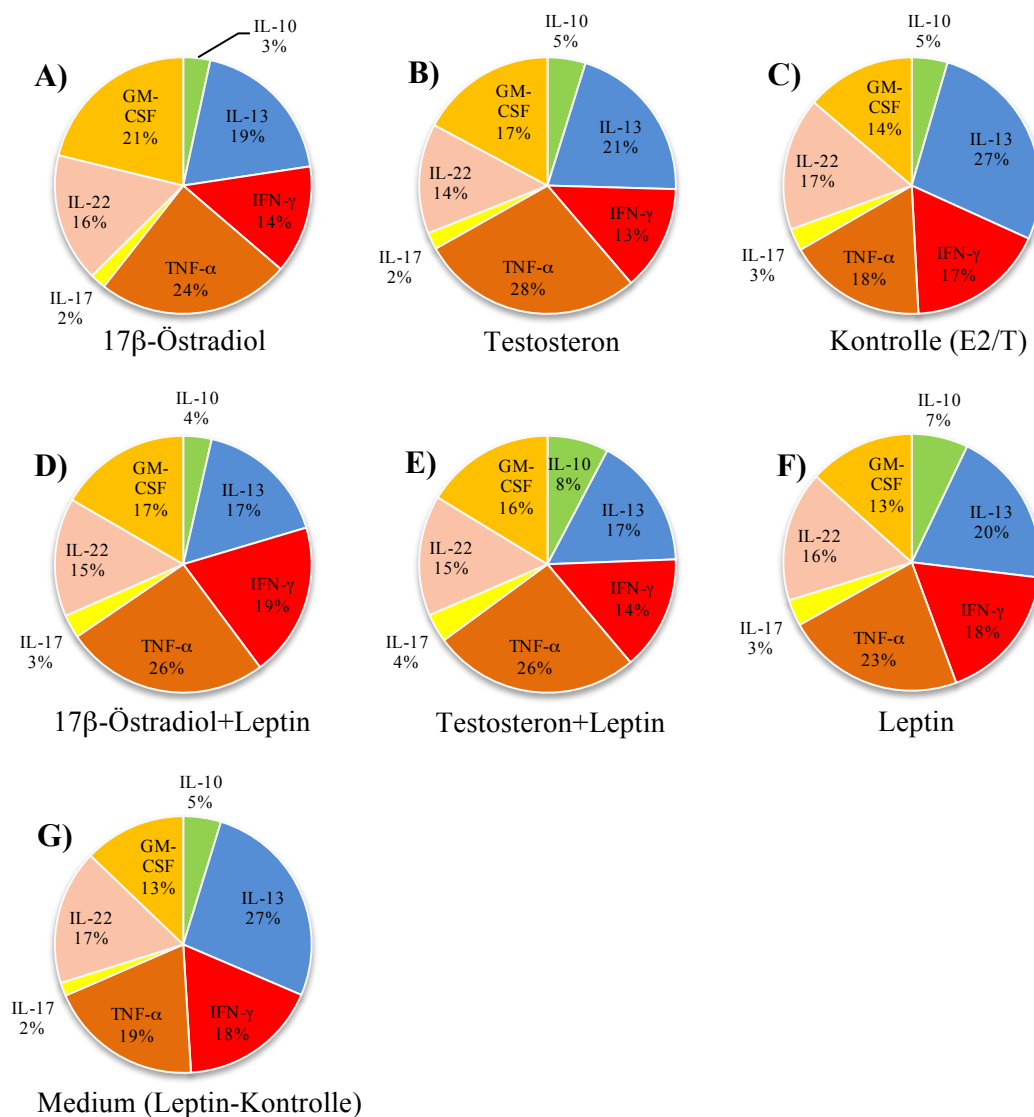


Abb. 33: Einfluss von Leptin auf das Zytokinprofil von naiven T-Zellen unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Naive T-Zellen (n=4) wurden unter 17 β -Östradiol-Inkubation (A), Testosteron-Inkubation (B); Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin (D), Koinkubation von Testosteron und Leptin (E), sowie alleiniger Inkubation von Leptin (F) stimuliert. Hierbei wurde eine Lösungsmittelkontrolle für 17 β -Östradiol/Testosteron (C) und eine Mediumkontrolle (gleichzeitig Leptinkontrolle; G) mitgeführt. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine IL-10 (grün), IL-13 (blau), IFN- γ (rot), TNF- α (orange), IL-17 (gelb), IL-22 (hellrot) und GM-CSF (hellorange) bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zytokine, berechnet aus der Summe aller bestimmten Zytokine (=100%). E2=17 β -Östradiol; T=Testosteron

6.2.3 Wirkung von 17 β -Östradiol, Testosteron und Leptin auf memory T-Zellen

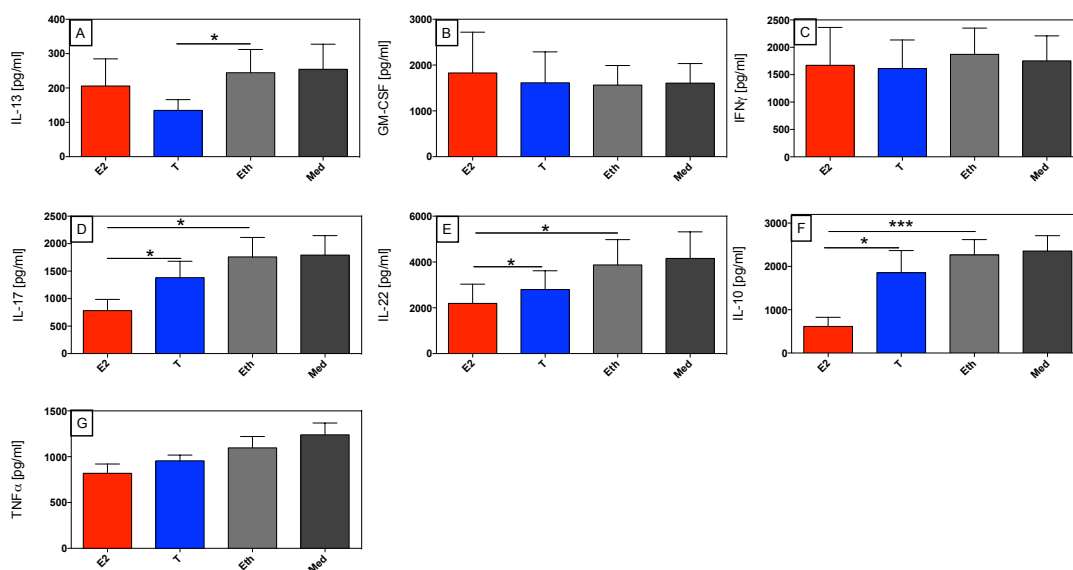
In den Analysen konnten unterschiedliche Wirkungen von 17 β -Östradiol und Testosteron auf die Zytokinsekretion von memory T-Zellen festgestellt werden. Während eine Stimulation unter 17 β -Östradiol-Inkubation zu unveränderten Konzentrationen der Zytokine IL-13, GM-CSF und IFN- γ führte (Abb. 34, A-C), zeigte sich eine signifikante Hemmung von IL-17, IL-22 und IL-10. (Abb. 34, D-F) Ebenfalls ließ sich eine leichte Hemmung für TNF- α beobachten ($p=0,166$, Abb. 34, G).

Gegensätzlich zu 17 β -Östradiol ließ sich für Testosteron eine signifikante Hemmung von IL-13 beobachten und auf dem 10%-Signifikanzniveau ebenfalls für IFN- γ ($p=0,062$). Ähnlich 17 β -Östradiol zeigte Testosteron ebenfalls hemmende Effekte auf die IL-17 und IL-22-Sekretion. Dennoch lagen die IL-17 und IL-22-Konzentrationen der 17 β -Östradiol-Inkubationen signifikant unter denen der Testosteron-Inkubation. TNF- α wurde durch Testosteron ebenfalls schwach gehemmt. Auf die IL-10 Sekretion zeigte Testosteron keinen Effekt und signifikant höhere Werte im Vergleich zur 17 β -Östradiol-Inkubation.

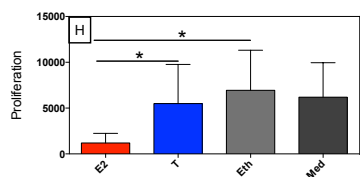
Die Ethanolkontrolle zeigte alleinig auf die IL-22 Sekretion einen leicht hemmenden Effekt ($p=0,15$).

Neben dem Zytokinprofil wurde ebenfalls der Einfluss der Hormone auf die Proliferation sowie die Überlebensrate der Zellen analysiert. Hierbei zeigte 17 β -Östradiol eine um mehr als 80%-ige signifikante Hemmung der Proliferation, hatte hingegen keinen Effekt auf die Überlebensrate. Testosteron zeigte keinen Effekt auf die Proliferation, hingegen ließ sich auf dem 10% Signifikanzniveau eine schwach ausgeprägt bessere Überlebensrate beobachten.

I Zytokine



II Proliferation



III Überlebensrate

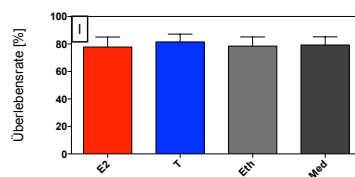


Abb. 34: Zytokinsekretion von memory T-Zellen nach Stimulation unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Memory T-Zellen (n=6) wurden unter 17 β -Östradiol- (rote Balken) oder Testosteron-Inkubation (blaue Balken) stimuliert, wobei eine Lösungsmittelkontrollen für 17 β -Östradiol/Testosteron (grauer Balken) sowie eine Mediumkontrolle (schwarze Balken) mitgeführt wurden. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine (I) IL-13 (A), GM-CSF (B), IFN- γ (C) IL-17 (D), IL-22 (E), IL-10 (F) und TNF- α (G) bestimmt. Parallel (II) wurde die Proliferatation (H; n=6) und die Überlebensrate (I; n=5) der T-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler. E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron, Eth=Ethanol, Med=Medium; *: p<0.05

Tabelle 9: P-Werte der Analysen auf Unterschiede zwischen 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubation aus Abb. 34. E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron; Eth=Ethanolkontrolle für E2 und T; Med=Medium; (dunkelgrau=5% Signifikanzniveau; mittelgrau=10% Signifikanzniveau; hellgrau=20% Signifikanzniveau)

Bedingung vs Bedingung	E2 vs T	E2 vs Eth-K	T vs Eth-K	Eth-K vs Med
GM-CSF	0,6875 ²	0,6171 ¹	1 ²	0,3201 ¹
IL-13	0,2893 ¹	0,632 ¹	0,0428¹	0,4611 ¹
IL-22	0,0398¹	0,0311¹	0,0635 ¹	0,154 ¹
IL-17	0,0316¹	0,0315¹	0,1663 ¹	0,6184 ¹
TNF- α	0,166 ¹	0,0994 ¹	0,1294 ¹	0,3455 ¹
IL-10	0,0222¹	0,0007¹	0,2665 ¹	0,293 ¹
IFN- γ	0,8438 ²	0,3125 ²	0,0625 ²	0,2188 ²
Proliferation	0,0313²	0,0313²	0,5625 ²	1 ²
Überlebensrate	0,0963 ¹	0,6039 ¹	0,0907 ¹	0,3444 ¹

¹: gepaarter T-Test (zweiseitig); ²: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig)

Analyse des Zytokinprofils

Aufgrund synergistischer sowie antagonistischer Wirkungen bestimmter Zytokine wurde auch für memory T-Zellen das Verhältnis der Zytokine als prozentualer Anteil der Summe aller bestimmten Zytokine ermittelt.

In memory T-Zellen hatten 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubation größtenteils unterschiedliche Effekte auf das Zytokinprofil (Abb. 35, A, B).

17 β -Östradiol-Inkubation führte zu einem um mehr als die Hälfte reduzierten Anteil IL-10, während Testosteron keinen Effekt auf den prozentualen Anteil IL-10 hatte. Des Weiteren zeigte sich eine prozentuale Erhöhung von IL-13 unter 17 β -Östradiol-Inkubation sowie ein um ein Drittel erhöhter Anteil IFN- γ . Gegenteilig war der IL-13 Anteil unter Testosteron-Inkubation erniedrigt und der IFN- γ Anteil nur marginal erhöht. Der TNF- α Anteil zeigte sich für beide Hormone geringfügig erhöht, für 17 β -Östradiol tendenziell stärker ausgeprägt. Auf den Anteil IL-17 zeigte 17 β -Östradiol eine deutliche Hemmung, während Testosteron keinen Effekt hatte. Für beide Hormone gleichermaßen deutlich erniedrigt war der IL-22-Anteil. GM-CSF war für beide Hormone prozentual erhöht, für 17 β -Östradiol hingegen deutlich stärker ausgeprägt. Die Lösungsmittelkontrolle Ethanol zeigte maximale Abweichungen von 1% von der Mediumkontrolle, hatte somit nahezu keinen Effekt auf das Zytokinprofil (Abb. 35, C).

Zusammenfassend ließ sich für die Stimulation von memory T-Zellen unter 17 β -Östradiol-Inkubation die Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils beobachten. Dieses war geprägt von einem erniedrigten Anteil IL-10, sowie einem erhöhten Anteil sowohl Th1- (IFN- γ) als auch Th2- (IL-13) spezifischer Zytokine. Ebenfalls erhöht waren die Zytokine TNF- α und GM-CSF.

Testosteron beeinflusste das Zytokinprofil gegenüber 17 β -Östradiol vergleichsweise schwach.

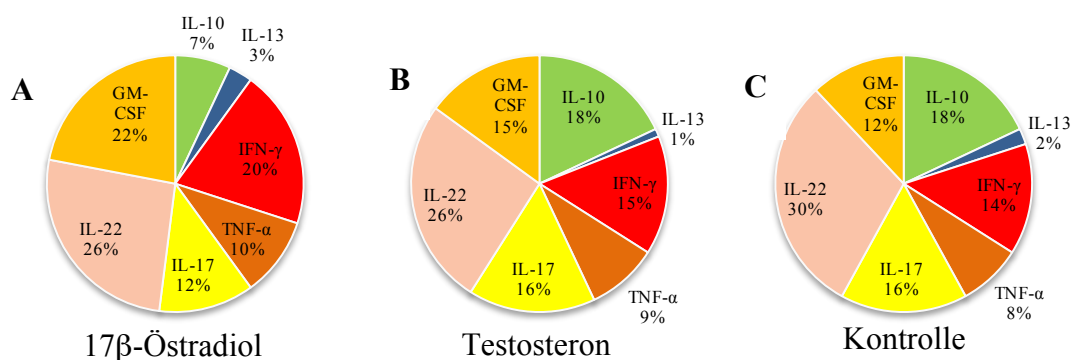


Abb. 35: Wirkung von 17β-Östradiol und Testosteron auf das Zytokinprofil von memory T-Zellen. Memory T-Zellen (n=4) wurden unter 17β-Östradiol (A) - oder Testosteron-Inkubation (B) stimuliert, wobei entsprechende Lösungsmittelkontrollen für 17β-Östradiol/Testosteron (C) und eine Mediumkontrolle (Tabelle Med) mitgeführt wurden. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine IL-10 (grün), IL-13 (blau), IFN-γ (rot), TNF-α (orange), IL-17 (gelb), IL-22 (hellrot) und GM-CSF (hellorange) bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zytokine, berechnet aus der Summe aller bestimmten Zytokine (=100%).

Wirkung von Leptin allein und in Koinkubation auf memory T-Zellen

Um zu klären, ob Leptin synergistische oder antagonistische Effekte mit oder zu 17β-Östradiol oder Testosteron in memory T-Zellen zeigt, wurden Koinkubationen der Sexualhormonen mit Leptin durchgeführt und mit den Einzelhormoninkubationen verglichen. Eine L-Inkubation sollte den alleinigen Effekt von Leptin klären.

Bei Betrachtung der Koinkubationen der Sexualhormone mit Leptin zeigten sich ähnlich naiven T-Zellen primär antagonistische Effekte. Für 17β-Östradiol und Leptin ließ sich hierbei eine deutliche Abschwächung der 17β-Östradiol induzierten IL-17-Hemmung durch Leptin beobachten (Abb. 36). Zudem war eine leichte Hemmung der IL-13-Sekretion durch 17β-Östradiol und Leptin zu beobachten. Für Testosteron und Leptin zeigte sich eine Abschwächung der von Testosteron induzierten GM-CSF-Sekretion. Ebenfalls abgeschwächt wurde der hemmende Effekt von Testosteron auf die IL-22 und TNF-α-Sekretion.

Für eine alleinige Leptin-Inkubation ließ sich eine leichte Induktion der IL-22-Sekretion feststellen, wobei sich auf kein anderes Zytokin Effekte zeigten.

Auf die Proliferation sowie Überlebensrate zeigte die Koinkubation mit Leptin keinen Effekt. Auch Leptin alleinig hatte keinen Effekt auf die Proliferation oder Überlebensrate.

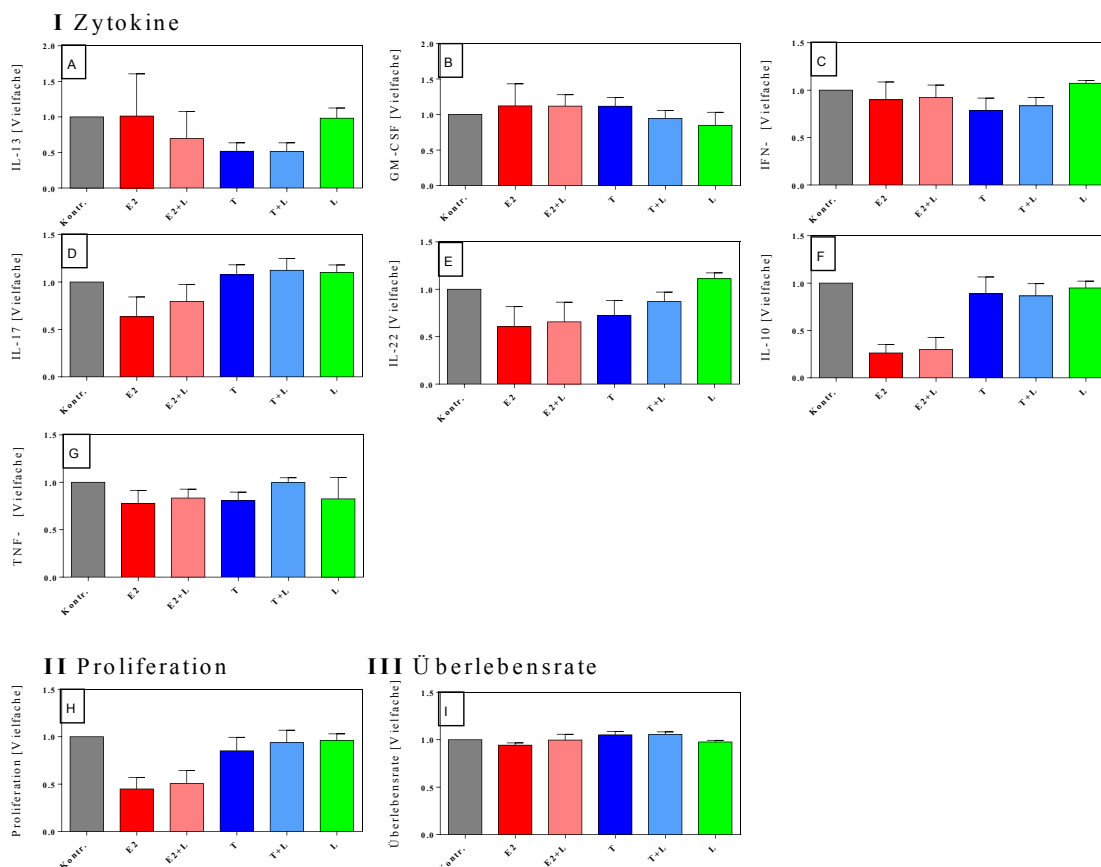


Abb. 36: Einfluss von Leptin auf Zytokinsekretion von memory T-Zellen unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Memory T-Zellen (n=4) wurden unter 17 β -Östradiol-Inkubation (rote Balken), 17 β -Östradiol+Leptin-Inkubation (hellrote Balken), Testosteron-Inkubation (blaue Balken), Testosteron+Leptin-Inkubation (hellblaue Balken), sowie Leptin-Inkubation stimuliert. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine (I) IL-13 (A), GM-CSF (B), IFN- γ (C) IL-17 (D), IL-22 (E), IL-10 (F) und TNF- α (G) bestimmt. Parallel (II) wurde die Proliferation (H; n=4) und die Überlebensrate (I; n=3) der T-Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler als Vielfaches der Kontrolle. Kontroll.=Kontrolle, E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron, E2+L=Koinkubation 17 β -Östradiol und Leptin, T+L=Koinkubation Testosteron und Leptin, L=Leptin

Tabelle 10: P-Werte der Analysen auf Unterschiede zwischen Einzelhormoninkubation mit 17 β -Östradiol und Testosteron und Koinkubation mit Leptin aus Abb. 36. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitige Testung) ermittelt. E2=17 β -Östradiol, T=Testosteron; L=Leptin, E2+L= Koinkubation mit E2 und L; T+L= Koinkubation mit T und L; Eth-K E2=Ethanolkontrolle für E2; Eth-K T=Ethanolkontrolle für T; Med=Medium; (hellgrau=20% Signifikanzniveau).

Bedingung vs Bedingung	E2 vs E2 + L	T vs T + L	E2 + L vs T + L	L vs Med	E2 + L vs Eth-K E2	T + L vs Eth-K T	Eth-K Vs Med
IL-13	0,25	1	0,875	0,875	0,25	0,125	0,25
GM-CSF	0,625	0,125	0,625	0,875	0,625	0,875	0,375
IFN- γ	0,625	0,875	0,625	0,375	0,875	0,125	0,625
IL-17	0,125	0,625	0,25	0,875	0,625	1	0,375
IL-22	0,375	0,125	0,25	0,25	0,125	0,375	0,375
IL-10	0,875	1	0,125	1	0,125	0,875	0,875
TNF- α	0,375	0,125	0,375	0,875	0,125	0,625	1
Proliferation	0,375	0,375	0,125	0,875	0,125	0,875	1
Überlebensrate	0,5	0,75	0,5	0,5	1	0,5	0,25

Analyse des Zytokinprofils

Um mögliche synergistische oder antagonistische Effekte der Zytokine zu berücksichtigen, wurde für die Koinkubation der Sexualhormone mit Leptin in den memory T-Zellen ebenfalls das Zytokinprofil berechnet. Für das Zytokinprofil wurden die Zytokine als prozentualer Anteil der Summe aller bestimmten Zytokine ermittelt.

Bei Betrachtung des sich ergebenden Zytokinprofils durch Koinkubation mit Leptin im Vergleich zur Einzelinkubation der Sexualhormone, zeigte sich für E2 und Leptin eine leichte Abnahme des IFN- γ -, IL-13- und GM-CSF-Anteils sowie Zunahme des IL-17- und IL-22- und TNF- α -Anteils.

Für Testosteron und Leptin ließ sich ebenfalls eine Abnahme des GM-CSF-Anteils sowie Zunahme des IL-22-Anteils beobachten.

Bei der alleinigen L-Inkubation zeigte sich ebenfalls eine prozentuale Zunahme von IL-22 und IFN- γ sowie Abnahme von GM-CSF und TNF- α .

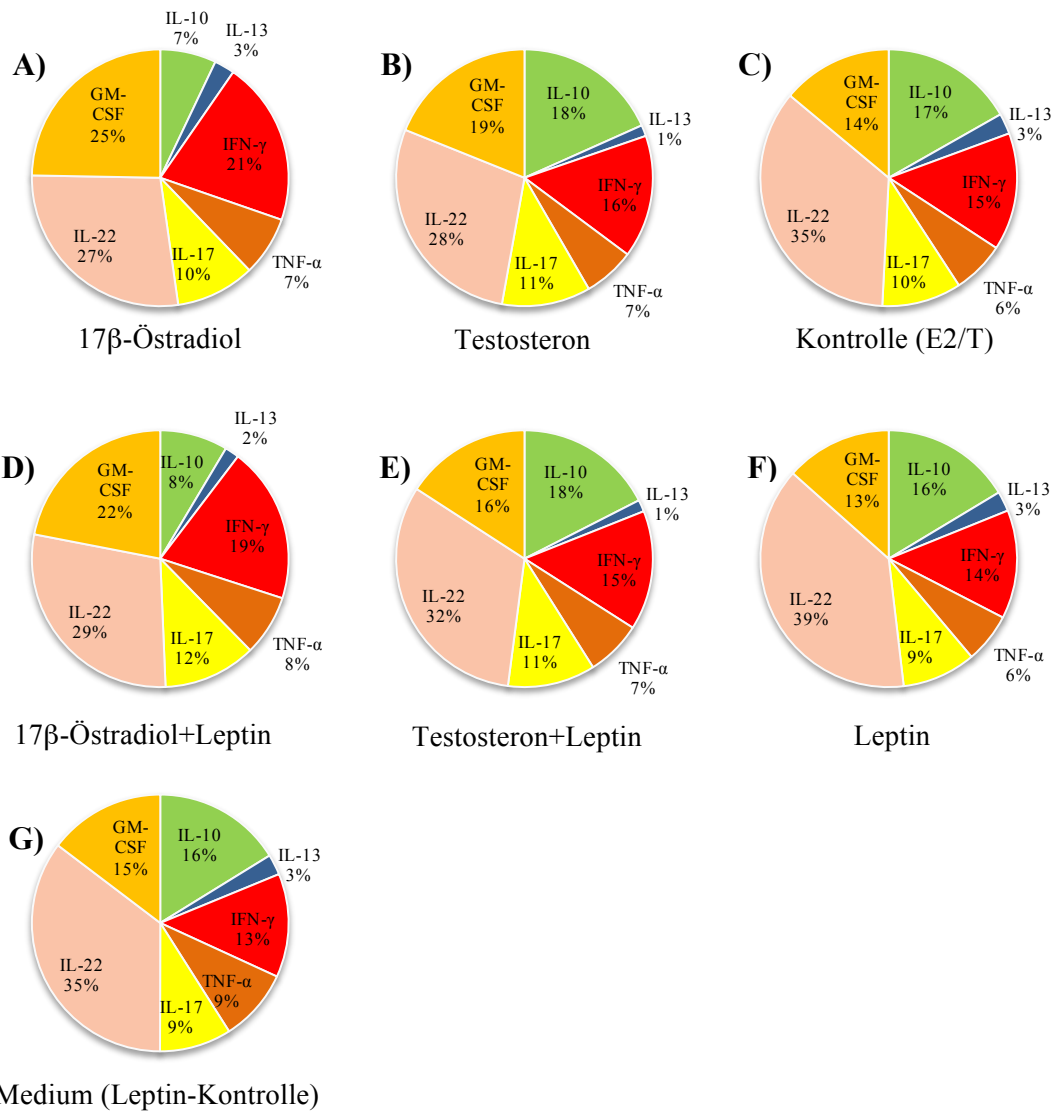


Abb. 38: Einfluss von Leptin auf das Zytokinprofil von memory T-Zellen unter 17 β -Östradiol- oder Testosteron-Inkubation. Memory T-Zellen (n=4) wurden unter den Inkubationsbedingungen: 17 β -Östradiol (A), Testosteron (B), 17 β -Östradiol + Leptin (D), Testosteron + Leptin (E) oder Leptin (F) stimuliert, wobei entsprechende Lösungsmittelkontrollen für 17 β -Östradiol/Testosteron (C) und eine Mediumkontrolle (G) mitgeführt wurden. Im Anschluss wurden aus den Überständen die Zytokine IL-10 (grün), IL-13 (blau), IFN- γ (rot), TNF- α (orange), IL-17 (gelb), IL-22 (hellrot) und GM-CSF (hellorange) bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zytokine, berechnet aus der Summe aller bestimmten Zytokine (=100%).

7 Diskussion

7.1 Extrinsische Immunmodulation der allergischen Antwort

7.1.1 Modulation der Allergenität des Allergenträgers durch Umweltfaktoren

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hatte zum Ziel den Einfluss der Urbanisierung auf die immunogenen Eigenschaften von Birkenpollen zu untersuchen.

Hierfür wurden 40 Birken von unterschiedlichen Standorten ausgewählt, ihre Umweltbedingungen durch Schadstoff- und Temperaturmessungen sowie die Erstellung eines UI näher charakterisiert und in Bezug zu verschiedenen Parametern der Allergenität des Pollens gesetzt.

Hierbei konnte Ozon als maßgeblicher Einflussfaktor auf die Allergenität von Birkenpollen identifiziert werden. Ozon stand sowohl im Zusammenhang mit dem Allergengehalt als auch der PALMs-Zusammensetzung der Pollen. Mit steigenden Ozonkonzentrationen konnte eine Erhöhung des Gehaltes an Bet v 1 sowie einer Erhöhung des Verhältnisses immunstimulatorischer zu -modulatorischer PALMs beobachtet werden.

Die Relevanz veränderter Allergen und PALMs-Gehalte wurde in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen weiter analysiert. Hierfür wurden Pricktestungen sowie Migrationsassays mit Neutrophilen Granulozyten und Stimulationsversuche mit MoDZ durchgeführt.

Die Relevanz der erhöhten Allergengehalte in „Hoch-Ozon“ Pollen konnte durch größere Quaddel- und Erythembildung in Pricktestungen bestätigt werden. Die veränderte Lipidzusammensetzung hin zu einem höheren Anteil immunstimulatorischer zu -modulatorischer PALMs von „Hoch-Ozon“ Pollen zeigte sich in der Induktion einer verstärkten Chemotaxis in Neutrophilen Granulozyten sowie einer verminderten IL-12 Hemmung in MoDZs.

7.1.1.1 Unterschiede in Temperatur und NO₂-Konzentration zwischen urbanen und ruralen Birken

Bei der Auswahl der in der Studie eingeschlossenen Birken wurde darauf geachtet, dass die urbanen Birken, eine gewisse Straßennähe zeigten sowie einen möglichst hohen Versiegelungsgrad aufwiesen und rurale Birken eine gewisse Entfernung zu Straßen zeigten und sich in einem Gebiet mit geringem Versiegelungsgrad befanden.

Die geeignete Auswahl zeigte sich mit der Ermittlung des UI, der sich signifikant unterschied, hingegen befanden sich dennoch vereinzelt Birken in Randgebieten. Damit kam den Korrelationsanalysen im weiteren Verlauf besondere Bedeutung zu, um auch schwache Zusammenhänge und mögliche Einflussfaktoren zu identifizieren.

Die in der Studie ausgewählten und nach Urbanisationsgrad in urban und rural eingeteilten Birkenstandorte zeigten signifikante Unterschiede für die NO_2 -Belastung und die Temperatur: An urbanen Birkenstandorten konnten erwartungsgemäß signifikant höhere NO_2 -Konzentrationen sowie Temperaturen gemessen werden.

Höhere Temperaturen sind ein typisches Charakteristikum städtischer Gebiete und werden als sogenannter „urban heat island effect“ (Wärmeinseleffekt) bezeichnet [367, 368]. Unter anderem verantwortlich für die positive Temperaturanomale im Vergleich zum ruralen Umland sind die Bebauung, das Fehlen von Vegetation sowie die Wärmeproduktion durch Industrie, Haushalte und Verkehr. In besonderem Maß trägt zudem der erhöhte Versiegelungsgrad urbaner Gebiete zu diesem Effekt bei [369, 370]. In Abhängigkeit vom Material haben versiegelte Flächen u.a. eine veränderte spezifische Wärmekapazität und einen veränderten Wärmeleitfähigkeits-, Temperaturleitfähigkeits- und Wärmeeindringkoeffizienten. Viele urbane Oberflächen, wie etwa asphaltierte Flächen, speichern somit ein höheres Maß an Wärme als dies für unversiegelte Flächen der Fall ist. Damit bedingt eine höhere Versiegelung in den meisten Fällen auch höhere Temperaturen [370]. In ruralen Gebieten findet sich mehr Vegetation, welche durch Transpiration zu einer Abkühlung beiträgt. [370].

Die signifikanten Unterschiede für Temperatur, NO_2 -Konzentration sowie den UI (siehe 4.1.1.2) geben Hinweis, dass die ausgewählten Birken eine entsprechend gute urbane und rurale Population darstellen und Vergleiche zwischen diesen Populationen sinnvoll sind. Trotzdem können schwache Effekte überdeckt werden, womit den Korrelationsanalysen im späteren Verlauf besondere Bedeutung zukommt.

Neben NO_2 -Konzentration und Temperatur wurde ebenfalls die Ozonkonzentration der Standorte gemessen. Für die Ozonkonzentration ließ sich ein zu Temperatur und NO_2 gegenläufiger Trend beobachten. Die Ozonkonzentration war für rurale Gebiete höher, hingegen erreichten gemessene Unterschiede zwischen urbanen und ruralen Gebieten nicht das Signifikanzniveau. Aufgrund eines geringeren Abbaus von Ozon in ruralen Gebieten und dem Aufbau von Ozon durch biogene flüchtige organische Substanzen (BVOC, z.B. Terpene), welche aus der Vegetation freigesetzt werden, finden sich hier oftmals höhere Konzentrationen. Zudem trägt das aus urbanen Gebieten stammende NO_2 zum weiteren Ozonaufbau bei [364, 365]. In urbanen Gebieten wird mit NO_2 parallel auch NO emittiert, welches zu einem schnellen Abbau von Ozon beiträgt. Die relativ hohe Stabilität von NO_2 kann zu einem Transport von NO_2 aus der Stadt in rurale Gebiete führen, womit in urbanen Gebieten emittiertes NO_2 zur Ozonbildung auf dem Land beitragen kann [364, 365]. Aufgrund seiner hohen Reaktivität und damit verbundenen Kurzlebigkeit findet hingegen kein Transport von NO aus der Stadt in rurale Gebiete statt. Mit dem Transport Ozon-aufbauender, hingegen keiner Ozon-abbauender Substanzen von urbanen Gebieten in rurale Gebiete, können urbane Emissionen somit zu einer Erhöhung der Ozonkonzentration auf dem Land beitragen [364,

365]. Dies zeigte sich in dieser Studie in einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Ozonerhöhung für rurale Birkenstandorte.

Zudem wurde in den Korrelationsanalysen ein unterschiedlicher Zusammenhang zwischen Ozon und NO_2 in urbanen und ruralen Gebieten deutlich: Es zeigte sich eine negative Korrelation von NO_2 und Ozon in urbanen Gebieten und eine positive in ruralen Gebieten. Mit NO_2 wird in urbanen Gebieten parallel auch NO emittiert, womit entstehendes Ozon rasch wieder abgebaut wird. Somit können hohe NO_2 mit hohen NO -Konzentrationen und niedrigen Ozonkonzentrationen in Verbindung stehen. In ruralen Gebieten hingegen steht NO_2 , teilweise aus urbanen Gebieten transportiert, möglicherweise nicht oder in geringerem Maß mit NO in Verbindung, wodurch der Abbau vergleichsweise gering ist. Somit können hohe NO_2 -Konzentrationen mit hohen Ozonkonzentrationen auftreten. Nicht-signifikante Unterschiede zwischen urbanen und ruralen Gebieten bezüglich der Ozonkonzentration sind möglicherweise auf eine zu geringe n-Zahl, sowie die bereits beschriebenen Randstandorte der Studie zurückzuführen.

7.1.1.2 Zusammenhang von Kätzchencharakteristika und Umweltfaktoren

Neben der Allergenität von Pollen ist ebenfalls die Quantität entscheidend für Bestehen und Ausmaß der Symptomatik von Pollenallergikern, weshalb in dieser Studie neben der Allergenität der Pollen ebenfalls die Pollenmenge analysiert wurde. Zudem wurden die Kätzchencharakteristika (Kätzchengewicht, Ratio Pollen/Kätzchen) näher bestimmt.

Pollenmenge pro Kätzchen

Die Pollenmenge pro Kätzchen zeigte keine Unterschiede zwischen urbanen und ruralen Birken. Hingegen fand sich eine signifikant negative Korrelation der Pollenmenge pro Kätzchen mit dem UI, welcher eine präzisere Betrachtung des Zusammenhangs der Pollenmenge pro Kätzchen mit dem Urbanisationsgrad ermöglichte. Dabei ließ sich nur eine schwache Korrelation der Pollenmenge pro Kätzchen mit dem UI und keine mit der Temperatur feststellen. Dahingegen fand sich eine deutlich stärkere und zudem hoch signifikante Korrelation mit der Konzentration des Schadstoffes NO_2 . Betrachtet man NO_2 als Maß für die Schadstoffbelastung, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass entweder NO_2 selbst oder ein anderer mit NO_2 und der Verkehrsbelastung in Zusammenhang stehender Faktor, die Pollenmenge pro Kätzchen negativ beeinflusst.

Dies steht im Gegensatz zu Studien, die eine verstärkte Pollenproduktion mit höheren CO_2 -Konzentrationen beschreiben und in Folge steigende CO_2 -Konzentrationen aus Verkehrsbelastung und Industrie mit der Zunahme an Allergien in Zusammenhang bringen [371]. Problematisch bei diesen Studien ist die Betrachtung des einzelnen Schadstoffes und die künstli-

che Exposition mit dem Einzelschadstoff. Untersuchungen in Städten, bei denen sich multiple Einflüsse ergeben, bringen somit neben steigenden CO₂-Konzentrationen aus beispielsweise Verkehrsbelastung auch steigende Konzentrationen von u. a. NO₂, NO, PM und weiteren Schadstoffen mit sich. Unterschiedliche Schadstoffe können divergente bis gegenläufige Effekte auf Pflanzen haben [10, 372]. Aus diesem Grund sind Studien mit experimentellen Designs (z.B. mit nur CO₂-Begasung) für Aussagen über Exposition unter natürlichen Bedingungen unzureichend und geben keinen Hinweis auf die Pollenproduktion unter verstärkter Verkehrsbelastung oder generell erhöhter Schadstoffexposition.

Gefolgt wurden diese Studien von einer Studie von Ziska et al. (2003), durchgeführt entlang eines urbanen-ruralen Gradienten in Baltimore, USA. In dieser wurde ein positiver Zusammenhang von Pollenmenge und Temperatur sowie CO₂ in Ambrosiapflanzen beschrieben [373]. Möglich wäre, dass sich die konträren Ergebnisse der vorliegenden Studie aufgrund der unterschiedlichen Pflanzenarten, ergeben haben. Die Birke ist eher an die kalten Klimate der höheren Breiten angepasst. Es ist anzunehmen, dass höhere Temperaturen sowie Schadstoffbelastung die Physiologie der Birke und somit ihre Pollenproduktion negativ beeinflussen [374, 375]. Die optimalen Wachstumsbedingungen sowie Resistenzeigenschaften unterscheiden sich zwischen Pflanzenarten, u. a. Trockenresistenz, Hitzeresistenz, Nährstoffverfügbarkeit oder Temperaturoptima. So ist es durchaus möglich, dass unterschiedliche bis gegenläufige Effekte zu erwarten sind. Dies lässt keine einheitliche Aussage eines Temperatur- oder Schadstoffeffektes über verschiedenen Pflanzenarten zu.

Ein weiterer kritischer Punkt der Studie von Ziska et al. (2003) ist, dass keine natürlich gewachsenen Pflanzen verwendet wurden, statt dessen wurden die Pflanzen auf einem urbanen-ruralen Gradienten gepflanzt, womit Adaptationsmechanismen der Pflanzen nicht mit einbezogen werden konnten. Zudem ist ein schnelleres Wachstum der urbanen Ambrosiapflanzen beschrieben. Eine andere Studie wiederum konnte einen Zusammenhang der Größe von Glaskraut mit der Pollenmenge zeigen [376]. Somit sind die von Ziska et al. (2003) beobachteten höheren Pollenmengen möglicherweise ausschließlich auf schnelleres Wachstum und größere Pflanzen zurückzuführen und nicht auf CO₂-Konzentration oder Temperatur.

Abschließend lässt sich sagen, dass die in der vorliegenden Studie beobachteten abnehmenden Pollenmengen pro Kätzchen mit steigenden NO₂-Konzentrationen die Vermutung zulassen, dass NO₂ selbst oder mit NO₂ in Verbindung stehende Faktoren aus Verkehrsbelastung einen Streßfaktor für Birken darstellen. Es kann angenommen werden, dass eine hohe Verkehrsbelastung zu niedrigeren Pollenmengen in Birken beiträgt und dass aufgrund der vorliegenden Studie in urbanen Gebieten somit nicht mit einer höheren Birkenpollen-Exposition zu rechnen ist.

Kätzchengewicht

Es zeigten sich signifikant schwerere Kätzchen bei urbanen Birken. Dennoch war kein signifikanter Zusammenhang zu einem der gemessenen Umweltparameter zu finden. Es ließ sich lediglich eine Korrelation mit der NO_2 -Konzentration auf dem 10%-Signifikanzniveau (0,066) beobachten und weder UI noch Temperatur oder Ozonkonzentration zeigten einen Zusammenhang mit dem Kätzchengewicht.

Dies steht im Gegensatz zu vergangenen Studien, die einen Einfluss von CO_2 und Ozon auf Kätzchengröße und -gewicht beschrieben. Darbuh et al. (2007) untersuchten den Einfluss von CO_2 und Ozon auf Kätzchengröße und -gewicht, wobei sie einen positiven Einfluss von CO_2 und einen negativen von Ozon dokumentierten [372]. Ein positiver Einfluss von CO_2 auf Sproß, Wurzel und Biomasse allergener Pflanzen konnte in weiteren Studien gezeigt werden [371]. Gregg et al. (2003) stellte eine Wachstumsretardierung von Baumklonen in ruralen Gebieten fest und identifizierte Ozon als negativen Wachstumsregulator [377]. Zusammenfassend ließe sich somit ein positiver Einfluss von CO_2 und ein negativer Einfluss von Ozon auf die Biomasse vermuten.

In der vorliegenden Studie zeigte sich kein Zusammenhang des Kätzchengewichts mit der Ozonkonzentration, hingegen eine Korrelation auf dem 10%-Signifikanzniveau mit NO_2 . NO_2 stellt u. a. ein Maß für die Schadstoffbelastung dar und steht damit in Verbindung mit CO_2 . Möglich wäre, dass hier höhere CO_2 -Konzentrationen in urbanen Gebieten verantwortlich für die schwereren Kätzchen sind.

Die Ursache, dass keine signifikant positive Korrelation mit NO_2 oder aber eine negative Korrelation mit Ozon gefunden werden konnte, könnte das parallele Vorkommen beider Schadstoffe unter natürlichen Bedingungen sein, wie sie in der vorliegenden Studie gegeben waren.

Somit bestehen unter natürlicher Exposition parallel induzierende (CO_2) als auch hemmende (Ozon) Wirkungen, womit möglicherweise vielmehr das Verhältnis von Ozon zu CO_2 über den resultierenden Effekt entscheidet.

Ein weiterer die Analysen erschwerender Aspekt ist, dass zudem in urbanen und ruralen Gebieten ein unterschiedlicher Zusammenhang zwischen Ozon und NO_2 besteht. Damit könnten Zusammenhänge aufgrund einer unterschiedlichen Abhängigkeit der Störfaktoren (CO_2 , Ozon) zueinander erschwert sichtbar werden.

Es wird deutlich, dass ein Effekt, der unter künstlicher Exposition sichtbar wird, möglicherweise unter natürlicher Exposition nicht sichtbar wird, da er überlagert wird. Die parallele Analyse verschiedener Umweltparameter unter natürlichen Bedingungen als auch in Expositionsstudien ist nötig, um Wirkung und Relevanz verschiedener Umweltbedingungen zu bestimmen.

Es wäre hingegen ebenso möglich, dass ein weiterer Störfaktor in der vorliegenden Studie hinzu kommt. So könnten ein oder mehrere andere in dieser Studie nicht eingeschlossene Parameter weitere Einflussfaktoren auf das Kätzchengewicht sein und als Störfaktoren für ausbleibende Korrelationen von Ozon und NO_2 mit dem Kätzchengewicht verantwortlich sein.

Ratio Pollen/Kätzchen

Abschließend wurde neben Pollenmenge und Kätzchengewicht das Verhältnis von Pollengewicht zu Kätzchengewicht betrachtet, somit Pollensynthese zu Kätzchensynthese. Hierbei zeigten rurale Birken eine signifikant höhere Ratio Pollen/Kätzchen, welche sowohl mit der Temperatur als auch mit dem UI und der NO_2 -Konzentration negativ korreliert war.

Ursächlich für die Korrelation mit NO_2 könnte auch hier anstelle von NO_2 ein mit NO_2 in Verbindung stehender Faktor sein. Vergangene Studien deuten hierbei auf CO_2 hin [371].

Es könnte somit angenommen werden, dass ein mit der Verkehrsbelastung in Verbindung stehender Faktor zu geringeren Pollenmengen mit gleichzeitig schwereren Kätzchen führt. Dabei ist nicht auszuschließen, dass bei diesem gegenläufigen Verhältnis von Kätzchen zu Pollen, das Kätzchen eine Art Schutzhülle für den Pollen darstellt. Hierbei könnte es sich bei NO_2 oder einem mit NO_2 vorkommenden Faktor, eher um einen Streßfaktor handeln, welcher zu geringeren Pollenmengen und mehr als Schutzfunktion zu schwereren, den Pollen umgebenden, Kätzchen führt.

Beschrieben ist eine Ablagerung von Schadstoffen auf Pollen sowie eine Voraktivierung von Pollen in urbanen Gebieten [36]. Auch eine Art Film, der urbane Pollen umgibt, konnte beobachtet werden. Möglicherweise ist die den Pollen umgebende Kätzchenmasse ein Adaptationsmechanismus urbaner Birken, um den Pollen vor der Freisetzung aus den Pollensäcken weitestgehend vor Voraktivierung und Ablagerungen zu schützen.

Weitere Forschungsarbeiten sind nötig, um Effekte und Wirkungen einzelner Schadstoffe als auch Schadstoffgemische zu analysieren. Expositionsstudien mit verschiedenen Schadstoffen könnten helfen, die für die Effekte verantwortlichen Faktoren zu identifizieren und einen besseren Einblick in die Wirkungen von Schadstoffen auf Birken und deren Pollenproduktion zu gewinnen. Parallele Studien unter natürlichen Expositionsbedingungen sind unerlässlich, um künstliche Expositionsstudien zu überprüfen und die Relevanz ermittelter Ergebnisse zu bestimmen.

7.1.1.3 Abhängigkeit des Bet v 1- und PALMs-Gehalts vom Reifegrad

Der Freisetzung des Birkenpollens aus dem Kätzchen geht (nach der Dormanzphase) eine bis zu mehrere Wochen dauernde Reifung des Pollens und des Kätzchens voraus. Um die Entwicklung und Abhängigkeit der Allergenität vom Reifegrad der Kätzchen zu untersuchen, fand eine sequentielle Sammlung von fünf ausgewählten Birken mit gleichzeitiger Allergenitätsbestimmung statt.

Hierbei zeigten sich steigende Bet v 1-Gehalte mit steigender Reifung. Dieser Zusammenhang wurde bereits in der Studie von Buters et al. (2008) [378] beobachtet und konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. In der vorliegenden Studie wurden zudem die PALMs-Gehalte berücksichtigt, welche eine inverse Beziehung zum Allergen Bet v 1 zeigten. So wurden hohe PALMs-Gehalte in frühen Reifestadien und niedrige kurz vor Freisetzung der Pollen festgestellt.

Die inverse Beziehung von Bet v 1 und PALMs lässt die Hypothese zu, dass hier möglicherweise eine Bindung der PALMs an Bet v 1 statt findet. In Folge können die PALMs möglicherweise nicht mehr im ELISA detektiert werden. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Annahme verschiedener Wissenschaftler, dass es sich bei Bet v 1 möglicherweise um ein Lipidtransferprotein handelt [379, 380].

Lipidtransferproteine sind eine weit verbreitete pflanzliche Proteinfamilie in einer Größenordnung von 9 kDA mit hoher Hitze- und Säurestabilität [381]. Sie sind die Major-Allergene bei Patienten mit Sensibilisierung auf Früchte der Rosacea-Familie und können zu schweren Nahrungsmittelallergien führen. Ihre Funktion in Pflanzen ist der Transfer von Phospholipiden und anderen Fettsäuren zwischen Zellmembranen [382]. Ähnlich den Lipidtransferproteinen ist auch Bet v 1 in der Lage, verschiedene Liganden zu binden u. a. Lipide, Flavonoide und Cytokinine [379, 380]. Hierbei werden mindestens zwei Bindungsstellen diskutiert. Es kommen unterschiedliche Bindungsaffinitäten mit unterschiedliche Isotypen vor, welche gleichzeitig für die physiologische Funktion von Bedeutung zu sein scheinen [380]. Sofern man von einer Lipidbindung von Bet v 1 ausgeht, wird ebenfalls die Bindung der PALMs wahrscheinlich, was die inverse Beziehung von Bet v 1 mit den PALMs erklären würde. Ungeklärt ist die Bedeutung dieser Bindung. Diskutiert wird eine Rolle von Bet v 1 im Hydrationsprozess [383] mit Freisetzung von Lipiden und Flavoniden auf der Stigmaoberfläche [380].

Die physiologische Relevanz für den Menschen, die genaue Ligandenbindung, als auch die Frage unter welchen Umständen die Liganden wieder freigesetzt werden, ist bislang hingegen ungeklärt. Möglich wäre auch, dass die Bindung nicht im Pollen sondern möglicherweise erst durch Elution des Pollens in der wässrigen Lösung stattfindet.

Mit zunehmenden Reifestadien der Kätzchen sanken die Bet v 1-Gehalte wieder und die PALMs-Gehalte stiegen. Beim folgenden Abfall von Bet v 1 und PALMs kann angenommen

werden, dass es sich hierbei um Pollen handelt, die den Reifeprozess nicht abgeschlossen haben. Möglicherweise platzen nur Pollensäcke von reifen Pollen auf. Es wäre möglich, dass es sich bei dem gesammelten Pollen der späteren Blühphase (späteren Reifestadien) um unreifen oder „unvitalen“ Pollen gehandelt hat, weshalb kein Platzen der Pollensäcke stattgefunden hat. Die am Ende im Kätzchen gefundenen Pollen spiegeln möglicherweise nur die Anfangsstadien wieder, womit die U (Bet v 1) und V (PALMs) -förmige Kurvenform zustande kam.

Alle in dieser Studie gesammelten Birkenkätzchen befanden sich in den Entwicklungsstadien 60 und 61. Die Bestimmung des Maturationsgrades der Pollen wurde durch tägliche Beobachtungen gewährleistet, hingegen kann trotzdem ein gewisser Fehler nicht ausgeschlossen werden. Die Auswahl einer größeren Birkenanzahl wäre hier geeignet, um diesen Fehler zu minimieren.

Dies ist jedoch die erste Studie, die eine dementsprechende Reifebestimmung in die Analysen mit einbezogen hat. Aus diesem Grund sollten auch vergangene Studien unter diesem Aspekt kritisch betrachtet werden. Da die vorliegende Arbeit zeigen konnte, dass die Allergen- als auch PALMs-Gehalt maßgeblich vom Reifegrad beeinflusst werden, kann angenommen werden, dass Studien welche den Reifegrad nicht miteinbezogen haben, nicht in der Lage sind, ihre Daten richtig zu interpretieren. Aufgrund der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass sofern der Reifegrad von Pollen nicht berücksichtigt wird, keine vergleichenden Analysen zwischen Pollen verschiedener Bedingungen vorgenommen werden können.

7.1.1.4 Zusammenhang des Bet v 1-Gehalts mit Ozonkonzentration und Temperatur

Das Allergen des Pollens ist primär verantwortlich für die Symptomatik des Pollenallergikers, womit diesem besondere Bedeutung zukommt. Bet v 1 ist das Majorallergen der Birke und in Nordeuropa zeigen über 90 % der Birkenpollenallergiker eine Sensibilisierung auf Bet v 1 [384].

In der vorliegenden Studie wurde der Zusammenhang der Bet v 1-Gehalte von Pollen verschiedener Birken mit urbanisationsbezogenen Parametern untersucht. In den Analysen zeigte sich, dass weder UI noch NO_2 in Zusammenhang zu den Bet v 1-Konzentrationen des Pollens stehen. Dahingegen konnte eine positive Korrelation der Bet v 1-Gehalte mit der Ozonkonzentration und eine negative mit der Temperatur beobachtet werden.

Die detaillierte Analyse der Daten spricht hingegen nur für einen Zusammenhang des Bet v 1-Gehaltes mit Ozon und keinen mit der Temperatur. Die Betrachtung der Literatur (Tashputov 2004) lässt weiter den Schluss zu, dass die Temperatur möglicherweise sogar ein Stör-

faktor ist und der Zusammenhang von Ozon und Bet v 1 stärker ist als es aus den Analysen hervorgeht.

Temperatur und Bet v 1-Gehalt

Die Analyse des Zusammenhangs der Temperatur mit den Gehalten an Bet v 1 zeigte eine signifikant negative Korrelation. Somit standen niedrige Temperaturen in Zusammenhang mit hohen Bet v 1-Gehalten.

Studien zum Einfluss der Temperatur auf die Expression von Bet v 1 sind widersprüchlich. So zeigten Hjelmroos et al. (1995) [385] eine höhere Bet v 1-Expression in Pollen, welche auf der Südseite von Birken gesammelt wurden. Dies deutet auf einen positiven Einfluss der Temperatur auf die Expression des Majorallergens hin. Ähnliche Ergebnisse berichtete Ahlholm et al. (1998) [386]: Die Autoren brachten ebenfalls höhere Durchschnittstemperaturen mit einer verstärkten Bet v 1-Expression in Zusammenhang.

Im Gegensatz hierzu konnten Helander et al. (1997) eine höhere Bet v 1-Konzentration in im Schatten lokalisierten Birken detektieren [387]. Dies wiederum spricht für einen positiven Einfluss niedriger Temperaturen auf den Bet v 1-Gehalt.

Der größte Störfaktor vergangener Studien dürfte die Methodik der Pollensammlung sein. Die vorliegende Studie überprüfte die Methodik durch eine sequentielle Sammlung 5 ausgewählter Birken. Diese konnte zeigen, dass der gewählte Sammelzeitpunkt die maximale Bet v 1-Konzentration der Birke widerspiegelt.

In vergangenen Studien wurde die Methodik nicht überprüft. Zum einen fand keine exakte Reifebestimmung der Kätzchen statt oder es wurde mit semipermeablen Auffangbeuteln, in denen die Pollen gesammelt wurden, gearbeitet. Die Arbeit mit derartigen Beuteln birgt die Gefahr einer Voraktivierung der Pollen mit vorzeitiger Freisetzung von Allergenen. Die Freisetzung von Allergenen aus Pollen kann durch verschiedene Parameter induziert werden. Hierzu gehören eine hohe Luftfeuchtigkeit, Gewitter, Regen oder Schadstoffe [388]. Ferner besteht zudem eine Temperaturabhängigkeit der Allergenfreisetzung [388]. Wird der Pollen vor Analyse in Auffangbeuteln Morgentau, Regen, weiteren Schadstoffen sowie ebenfalls unterschiedlichen Temperaturen oder gar Gewittern ausgesetzt, kann angenommen werden, dass bereits vor Analyse eine Freisetzung von Bet v 1 aus den Pollen statt findet. Auch die Sammlung von Ästen, welche in Folge in Glasbehältern (Helander 1997) weiter gereift werden scheint ungeeignet, da es wahrscheinlich ist, dass speziell die Umweltbedingungen während der Pollenreifung die Allergengehalte maßgeblich beeinflussen. Unter diesen Gesichtspunkten sind die vergangenen Studien zum Einfluss der Temperatur auf den Bet v 1-Gehalt in Birken kritisch zu betrachten.

In der vorliegenden Studie konnte eine negative Korrelation von Bet v 1 mit der Temperatur beobachtet werden. Für die negative Korrelation von Bet v 1 mit der Temperatur sprechen Studien zur Familie der PR (pathogen-related)-Proteine, zu der auch Bet v 1 gehört (PR_10). Beschrieben ist eine Induktion von PR-Proteine durch Viren, Bakterien, Pilze aber auch durch Kälte [389]. Es wurde festgestellt, dass sich im Winter die höchste Akkumulation der PR10 Proteine in der Zucker-Kiefer und der Westlichen Weymouth Kiefer finden lässt. Auch in Pfirsich und Maulbeere konnte eine Akkumulation der PR-10 Proteine bei kalten Klimabedingungen beobachtet werden [389]. Daten, die für einen positiven Einfluss tiefer Temperaturen auf den Bet v 1-Gehalt sprechen.

Bei einer detaillierten Analyse des Zusammenhangs von Bet v 1 und Temperatur in der vorliegenden Studie sprechen hingegen auch einige Faktoren gegen diesen Zusammenhang. So konnte keine Korrelation von Bet v 1 mit dem UI gefunden werden. Der UI steht in starker Abhängigkeit zur Temperatur ($r=0,88$), womit – sofern eine Korrelation der Temperatur mit Bet v 1 zu finden ist – ebenfalls eine Korrelation mit dem UI zu erwarten gewesen wäre.

Die für die Korrelation zur Verfügung stehende Anzahl an Temperaturmessungen beschränkte sich auf 16, während für den UI 40 Datenpunkte zur Verfügung standen. Damit ist die Aussagekraft des UI gegenüber der Temperatur erhöht. Der UI korreliert mit der Temperatur ($r=0,88$), zeigt hingegen keine Korrelation mit Bet v 1. Dies spricht dafür, dass auch die Temperatur in keiner Abhängigkeit zu Bet v 1 steht und sich eine zufällige Korrelation der Temperatur mit Bet v 1 aufgrund der geringen n-Zahl ergeben hat.

Des Weiteren unterschied sich die Temperatur zwischen Stadt- und Landstandorten hochsignifikant (Temperatur: $p<0,0001$), die Bet v 1-Gehalte hingegen nicht. Würde die Temperatur den Bet v 1-Gehalt maßgeblich beeinflussen, wären auch für Bet v 1 signifikante Unterschiede zwischen Stadt- und Landbirken zu erwarten gewesen. Damit ist, sofern vorhanden, von einem verhältnismäßig schwachen Effekt von der Temperatur auf den Bet v 1-Gehalt auszugehen.

Ebenfalls gegen einen positiven Einfluss niedriger Temperaturen auf den Bet v 1-Gehalt spricht eine Studie von Tashpulatov et al. (2004) in der die Aktivität des Bet v 1a-Promoters in Abhängigkeit von Stress und der Temperatur untersucht wurde [390]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen und Stress zu einer verstärkten Aktivität des Promoters führen. Damit würden hohe Temperaturen im Zusammenhang mit hohen Bet v 1-Gehalten stehen.

Die vorliegende Studie konnte ebenfalls eine positive Korrelation von Ozon und Bet v 1-Gehalt zeigen. Ozon und Temperatur zeigen eine nicht signifikant negative Korrelation (Daten nicht gezeigt: $r=-0,5$; $p=0,07$). Damit könnte angenommen werden, dass sich die Korrela-

tion der Temperatur mit den Bet v 1-Gehalten aufgrund der Abhängigkeit der Temperatur zu Ozon ergeben hat.

Aufgrund der Studie zum Einfluss der Temperatur auf den Bet v 1-Promoter könnte weiter angenommen werden, dass die Temperatur in der vorliegenden Studie vielmehr ein Störfaktor ist und der Effekt von Ozon auf den Bet v 1 Gehalt höher ist, als es aus den Analysen hervor geht. Gleichzeitig wird deutlich, dass sofern von einem Temperatureffekt auszugehen ist, dieser im Vergleich zu Ozon als schwach einzuordnen ist.

Um die Frage des Einflusses der Temperatur auf die Bet v 1 Gehalte abschließend zu klären, wären Expositionsstudien nötig.

Ozon und Bet v 1-Gehalt

Der Zusammenhang zwischen der Ozonexposition der Birken und dem Bet v 1-Gehalt in den Pollen ist konform mit Studien von Masuch et al. (1997) [44] und Eckl-Dorna et al. (2010) [45], die eine Erhöhung des Allergengehaltes in Gräserpezies durch Ozon beschreiben. Eckl-Dorna et al. (2010) wählten hierbei künstliche Expositionsbedingungen und bestätigten die Relevanz der erhöhten Allergengehalte in Immunoblots mit Seren von Grasallergikern. Masuch et al. (1997) wählten unterschiedliche Versuchsaufbauten, natürliche Expositionsbedingungen und die künstliche Exposition. Hierbei kritisch zu betrachten ist, dass sich die verglichenen Gebiete der natürlichen Expositionsbedingungen in einer Entfernung von 100 km befanden und zudem unterschiedliche Höhenlagen gegeben waren. Somit kann angenommen werden, dass diese Gebiete weitaus mehr Unterschiede als nur die Ozonkonzentration aufwiesen und Unterschiede nicht primär auf Ozon zurückzuführen sind. Die künstlichen Expositionsstudien dieser Arbeit konnten hingegen ebenfalls eine Erhöhung der Allergengehalte durch Ozon zeigen. Damit ist ein Hinweis auf eine Erhöhung der Allergenität durch Ozon, auch in Grasspezies, gegeben. Dies hebt die Bedeutung von Ozon als relevanten, die Allergenität von Pollen beeinflussenden Faktor, hervor und stützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Die Ursache für die Erhöhung von Allergenen durch Ozon könnte sein, dass dieser Schadstoff einen maßgeblichen Stressfaktor für Pflanzen darstellt [391]. In Folge kommt es zur Induktion bestimmter Proteine, unter diesen möglicherweise auch Allergene. Viele Allergene, wie z.B. Bet v 1, gehören zu den PR-Proteinen, weshalb eine Induktion von PR-Proteinen und somit Allergenen durch Streß Evidenz besitzt.

Gregg et al. (2003) [377] identifizierten Ozon als ursächlichen Faktor für eine Wachstumsretardierung von Baumklonen (Pappelklone) in ruralen Gebieten im Vergleich mit urbanen Gebieten. Auch Pääkkönen et al. (1995) [392] untersuchten den Effekt von Ozon auf Birkenklone und konnten ebenfalls eine Wachstumsretardierung beobachten. Zudem wurden ultrastrukturelle Verletzungen durch Ozon beobachtet [392]. Die ultrastrukturellen Verlet-

zungen als auch die Wachstumsdefizite durch Ozon geben deutliche Hinweise darauf, dass Ozon einen maßgeblichen Stressfaktor für Pflanzen darstellt.

Stress oder Verletzung wiederum führt zur Induktion von PR-Proteinen. Damit könnte eine Induktion von Bet v 1, welches ein PR-Protein darstellt, durch Ozon erklärt werden. In Spargel, Tomate, der Weißen Kiefer als auch Birke wurde eine Akkumulation von PR-10-Proteinen nach Verwundung oder Pathogenbefall gezeigt [389]. Ebenfalls die Studie von Tashpulatov et al. (2004) konnte eine Induktion des Bet v 1-Promotors durch Stress beobachten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, zusammen mit der bestehenden Literatur, geben damit einen starken Hinweis, dass Ozon ein Stressfaktor und in Folge ein maßgeblicher Einflussfaktor auf die Expression des Majorallergens Bet v 1 in Birkenpollen ist.

Aus der Gesamtheit der oben aufgeführten Ergebnisse sowie aufgrund der Literaturlage, ist zu schließen, dass unter den eingeschlossenen Parametern Ozon und nicht die Temperatur der maßgebliche Faktor ist, welcher die Bet v 1-Expression beeinflusst.

Zumal der Korrelationskoeffizient von Ozon und Bet v 1 bei nur $r = 0,37$ lag und Ozon somit nur etwa 11% der Datenvariabilität von Bet v 1 erklären würde, kann dies für eine natürliche Exposition viel sein. In diesem Zusammenhang sollte berücksichtigt werden, dass ebenfalls weitere Faktoren bestehen können, u. a. der genetische Hintergrund, welche den Bet v 1-Gehalt bestimmen. Wie beschrieben, könnte auch die Temperatur ein maßgeblicher Störfaktor sein.

Hingegen wird ebenfalls die Ozonsensitivität, und somit das Ausmaß der Ozonwirkung, durch weitere Faktoren beeinflusst. Trockenstress kann über eine Schließung der Blattspalten die Ozonsensitivität von Pflanzen heruntersetzen, womit die Ozonkonzentration und Wirkung in Abhängigkeit von Trockenstress betrachtet werden müssten [393, 394]. In welchem Ausmaß dies wiederum für die Bet v 1-Expression relevant ist und welchen Einfluss möglicherweise Trockenstress selbst auf die Bet v 1-Gehalte in Pollen hat, bleibt zu klären.

Aus diesem Grund wären auch hier Expositionsstudien zum Einfluss von Ozon auf den Bet v 1-Gehalt sinnvoll. Dies könnte ebenfalls die Identifizierung des relevanten Zeitpunkts mit maßgeblichem Einfluss ermöglichen. Wäre der relevante Zeitpunkt der Ozonexposition geklärt, könnten Ozonmessungen zu definierten Zeitpunkten helfen, Prognosen für die Allergenität der Birkenpollen in der Blühsaison zu treffen und symptomatische Beschwerden vorab abzuschätzen.

Die Differenz der Ozongehalte in dieser Studie bewegte sich aufgrund der lokalen Nähe (München und Umkreis) nur in einer verhältnismäßig kleinen Spanne. Trotzdem konnte ein signifikanter Einfluss von Ozon auf den Bet v 1-Gehalt gezeigt werden. Die Entwicklung der

Ozonkonzentrationen in den nächsten Dekaden ist unklar, hingegen kann aufgrund des Klimawandels sowie der zunehmenden Urbanisierung von einem Anstieg der Ozonkonzentrationen ausgegangen werden. Der Klimawandel bedingt höhere Temperaturen, welche über eine verstärkte Freisetzung flüchtiger organischer Verbindungen (VOC) aus der Vegetation (biogene VOCs, BVOCs) und Verdunstungsprozessen zu einer verstärkten Ozonbildung führen können [364, 395]. Ebenfalls mit dem Klimawandel in Verbindung stehen Hitzeperioden (Schär et al. 2004). UV-Strahlung liefert die Energie für den Ozonaufbau und je länger Warmwetterperioden andauern, desto stärker ist die Akkumulation von Ozon. Diese Faktoren in Kombination mit der zunehmenden Urbanisierung, welche mit verstärkter Freisetzung ozonaufbauender Schadstoffe (CO, NO_x) durch Verbrennung fossiler Energien oder der Emission von VOCs aus bauchemischen Produkten steht, lässt einen weiteren Anstieg der Ozonkonzentrationen vermuten. Eine genaue Klärung des Einflusses von Ozon auf Pollen ist nötig, um Prognosen zur Allergenität von Pollen für mögliche zukünftige Ereignisse zu ermöglichen.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass Ozon unter natürlichen Bedingungen ein Faktor ist, welcher zu steigenden Bet v 1-Gehalten in Pollen führt. Steigende Ozonkonzentrationen könnten über eine verstärkte Expression von Bet v 1 zu einer Aggravation der Symptomatik in Pollen-allergischen Patienten führen. Die vorliegende Studie arbeitete mit einer relativ geringen Spanne von Ozonkonzentrationen und konnte dennoch einen signifikanten Effekt zeigen. Anzunehmen ist, dass aufgrund des Klimawandel sowie der zunehmenden Urbanisierung die Ozonkonzentrationen steigen werden und in Zukunft mit einer Erhöhung der Allergenität von Birkenpollen und einer verstärkten Symptomatik im Allergiker zu rechnen ist.

7.1.1.5 Zusammenhang des Adenosingehalts mit Umweltfaktoren

Adenosin ist bei vielen biochemischen Prozessen im Körper beteiligt. Gilles et al. (2011) [53] konnte zeigen, dass Pollen verschiedener Spezies ebenfalls Adenosin in mikromolaren Konzentrationen enthalten. In vitro führt Pollen-Adenosin in dendritischen Zellen über A₂-Rezeptoren zu einer Induktion von cAMP und Inhibition von IL-12p70. Werden dendritischen Zellen von nicht-Atopikern mit WPE behandelt, zeigen diese eine Adenosin-abhängige verringerte Kapazität Th1-Zellen zu differenzieren und eine verstärkte Kapazität regulatorische Zellen und IL-10 zu induzieren [53]. Bei dendritischen Zellen von Atopikern konnte keine Induktion von IL-10 beobachtet werden, stattdessen wurde in diesen IL-5 und IL-13 induziert [53]. Pollen-Adenosin vermittelt somit divergente Effekte in Atopikern und Nicht-Atopikern.

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss urbanisationsbezogener Parameter auf die Adenosinkonzentration in Pollen untersucht werden. Es bestand kein Zusammenhang zu einem in der Studie eingeschlossenen Parameters auf die Adenosin-Konzentration in Pollen. Eben-sowenig waren Unterschiede zwischen urbanen und ruralen Pollen zu beobachten.

Die Funktion von Adenosin in Pollen ist nicht abschließend geklärt. Beschrieben ist bislang ein aktiver Transporter-abhängiger Import von Nukleosiden, welche als Grundbausteine für die RNA-Synthese während der Pollenkeimung dienen [110, 111]. Der Transport ist kon-zentrationsabhängig sowie sättigbar und nimmt mit der Zeit ab. RNA-Synthese und DNS-Reparaturmechanismen sind frühe Ereignisse der Pollenkeimung. Die Abnahme des Trans-transportmechanismus von Nukleosiden mit der Zeit spricht damit für eine Funktion von u. a. Adenosin als Grundbaustein der RNA-Synthese sowie zur DNA-Reparatur.

Detektiertes Adenosin in frischen Pollen könnte ebenso ein Abbauprodukt von ATP darstel-len, welchem u. a. Bedeutung in der Pollenkeimung und der Pollenschlauchbildung zu-kommt [53].

Im Gegensatz zu Bet v 1 als PR-Protein, kommt Adenosin möglicherweise verstärkt Bedeu-tung in den Grundfunktionen/-physiologie des Pollens zu. Als Grundbaustein für RNA, DNS oder Teil der energiereichen Verbindung ATP wird seine Konzentration möglicherweise wenig durch äußere anthropogene oder natürliche Faktoren beeinflusst und steht somit in keiner oder geringer Abhängigkeit zum UI, der Temperatur, der NO₂- oder der Ozonkonzent-ration.

Um diese Frage abschließend zu klären, wären weitere Expositionsstudien nötig. Durch die natürlichen Bedingungen in dieser Studie bewegten sich die unterschiedlichen Umweltbe-dingungen nur in einer geringen Spanne. Beispielsweise die höchste und niedrigste Durch-schnittstemperatur der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Birken unterschied sich nur um 1,6°C. Größere Differenzen zwischen den Bedingungen würden helfen, auch schwa-che Effekte leichter sichtbar zu machen. In Expositionsstudien mit verschiedenen Schadstof-fen sowie Temperaturen in einem breiten Konzentrationsbereich wären auch geringe Effekte gezielt zu erfassen.

7.1.1.6 Zusammenhang des PALMs-Gehalts mit Umweltfaktoren

Eikosanoide gehören zu den Oxylipinen und sind von der Arachidonsäure abgeleitete Ver-bindungen, die als Immunmodulatoren und Neurotransmitter wichtige physiologische Funk-tionen übernehmen. U. a. sind sie an der Steuerung der Immunantwort beteiligt.

Auch Pflanzen bilden Oxylipine, welche eine bedeutende Rolle in verschiedenen pflanzli-chen Entwicklungsprozessen, sowie bei Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress spielen [396, 397]. Pflanzlichen Oxylipine leiten sich hingegen nicht von der Arachidonsäure

ab, welche in Pflanzen nicht zu finden ist, sondern von Linol- und α -Linolensäure. Trotz unterschiedlicher Vorläufersubstanzen zeigen sie eine starke strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeit zu den menschlichen Eikosanoiden. Aus diesem Grund sind sie relevante Faktoren für die Bestimmung der Allergenität. PGE₂-ähnliche Verbindungen werden mit einer Immunmodulation und einer allergiefördernden Immunitätslage in Verbindung gebracht, LTB₄-ähnliche Verbindungen mit einer Immunstimulation u. a. als Chemoattraktanz für Eosinophile- und Neutrophile Granulozyten [55, 56, 58, 59, 78, 398].

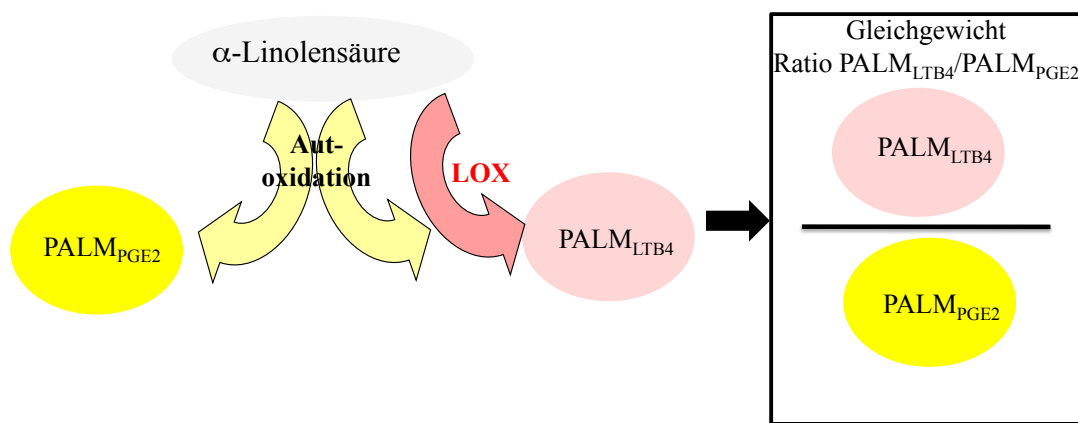
Die Korrelationsanalysen urbanisationsbezogener Parameter mit den PALMs-Gehalten deckten eine hochsignifikante negative Korrelation von PALM_{PGE2} mit Ozon auf. Ansonsten zeigten sich keine Zusammenhänge der Parameter mit den Lipidmediatoren.

Dahingegen konnte ein starker Zusammenhang aller in der Studie einbezogenen Parameter mit dem Verhältnis der Lipide zueinander beobachtet werden. Sowohl Temperatur, Ozon-, NO₂-Konzentration als auch UI korrelierten signifikant mit der Ratio der Lipide. Dies könnte aufgrund der direkten Abhängigkeit der Lipide zueinander erklärt werden.

Synthese von PALM_{LTB4} und PALM_{PGE2} aus selber Vorläufersubstanz

Beide Lipide werden über die gemeinsame Vorläufersubstanz, die α -Linolensäure gebildet (Abb. 39). PALM_{PGE2} entsteht aus α -Linolensäure über Autoxidation, PALM_{LTB4} sowohl über Autoxidation als auch über das Enzym Lyxygenase (Abb. 39, A) [366]. Angenommen werden kann, dass – sofern ein gewisses Gleichgewicht in der Synthese besteht und es zu einer Aktivierung der Lyxygenase kommt – weniger α -Linolensäure für die Synthese von PALM_{PGE2} zur Verfügung steht. Damit wird mehr PALM_{LTB4} und weniger PALM_{PGE2} gebildet und das Verhältnis von PALM_{LTB4} zu PALM_{PGE2} verschiebt sich zugunsten von PALM_{LTB4}. Es entsteht eine höhere Ratio PALM_{LTB4}/PALM_{PGE2} (Abb. 39, B). Aufgrund der Korrelation von Temperatur, Ozon-, NO₂-Konzentration als auch UI kann angenommen werden, dass möglicherweise ein Einfluss dieser Faktoren auf die LOX-Aktivität besteht.

Gleichgewicht



+ Ozon:

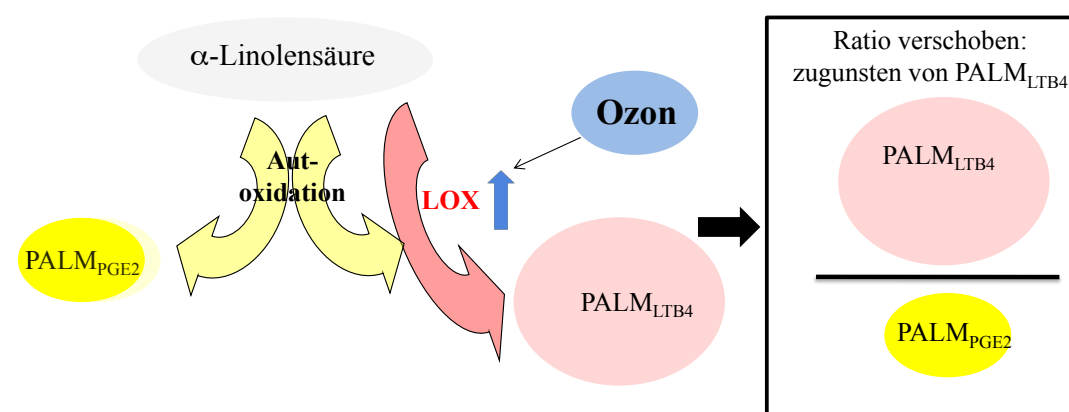


Abb. 39: Gleichgewicht und Verschiebung der $\text{PALM}_{\text{LTB4}}/\text{PALM}_{\text{PGE2}}$ Ratio durch Ozon

LOX wird durch Ozon aktiviert

Maccarrone et al. [399] beschrieben eine Aktivierung der Lipoxygenase durch Ozon. In der vorliegenden Studie konnte eine positive Korrelation von Ozon mit der Ratio $\text{PALM}_{\text{LTB4}}$ zu $\text{PALM}_{\text{PGE2}}$ gezeigt werden. Es kann angenommen werden, dass hohe Ozonkonzentrationen die LOX in Pollen aktivieren und in Folge vermehrt $\text{PALM}_{\text{LTB4}}$ und vermindert $\text{PALM}_{\text{PGE2}}$ gebildet wird. Diese Hypothese wird durch die hochsignifikant negative Korrelation von $\text{PALM}_{\text{PGE2}}$ mit Ozon gestützt. Da keine Korrelation eines anderen Faktors mit $\text{PALM}_{\text{PGE2}}$ beobachtet werden konnte, kann von Ozon als maßgeblichen die Ratio beeinflussenden Faktor ausgegangen werden.

Was sich hingegen in den Analysen nicht zeigte, war eine positive Korrelation von $\text{PALM}_{\text{LTB4}}$ mit Ozon. Die zunächst über die Aktivierung von LOX entstehenden Hydroperoxide stellen hingegen wiederum Vorläufersubstanzen für eine Reihe anderer Produkte sowie Substrate mehrerer Enzyme dar. Über Reductase entstehen die mit $\text{PALM}_{\text{LTB4}}$ in Verbindung stehenden Lipide 9,13 HODE/HOTE. Hingegen können über Enzyme wie Hydroperoxidly-

asen, Epoxyalkoholsynthasen und eine Reihe weiterer Enzyme vielfach andere Produkte entstehen [400].

Es wäre zu hypothetisieren, dass sofern eine Induktion von LOX statt findet, auch parallel andere Enzyme aktiviert werden. Damit wären PALM_{LTB4} (HODE/HOTE) nicht die einzigen durch Ozon induzierten Lipide, weshalb keine direkte Korrelation von PALM_{LTB4} mit Ozon beobachtet werden konnte. Vielfältige andere Lipide könnten generiert werden, unter diesen die Ketone, die Jasmonsäure, „12-oxophytodienoic acid“, und „13-hydroperoxide lyase-derived C6 aldehyde“.

Oxylipine induzieren Pflanzenabwehrgene

Diese gebildeten Oxylipine, wie bereits beschrieben, sind beteiligt an den Abwehrmechanismen in Pflanzen. Sie werden gebildet als Antwort auf biotischen oder abiotischen Stress und sind wiederum wichtige Regulatoren der Genexpression von Pflanzenabwehrgenen und in der Lage diese zu induzieren [401-403]. Bet v 1 gehört zu den Pflanzenabwehrgenen und es konnte ebenfalls ein positive Korrelation von Bet v 1 mit Ozon in der vorliegenden Studie gezeigt werden. Zu hypothetisieren wäre, dass Ozon als Stressfaktor das Enzym LOX aktiviert, was in Folge zur Bildung von Oxylipinen führt, welche wiederum die Bet v 1 Expression induzieren (Abb.40).

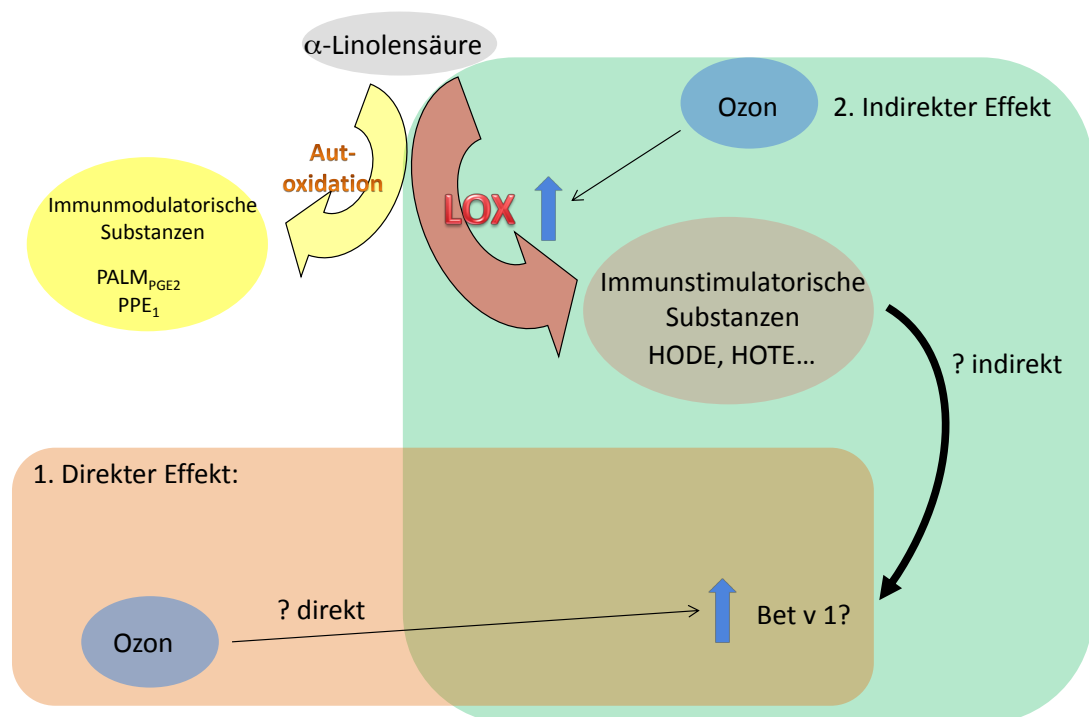


Abb. 40: Indirekter oder direkter Effekt von Ozon auf Bet v 1

Um dies abschließend zu klären, wäre eine detailliertere Bestimmung und Analyse der Pollen verschiedener Umweltbedingungen nötig. Eine umfassende Lipid- als auch Enzymanalyse könnte helfen einen besseren Einblick in die Regulationsmechanismen der Pflanze zu bekommen und den Zusammenhang von Lipiden und dem Allergen Bet v 1 zu klären.

Möglicherweise könnte ein spezifisches Lipid mit der Bet v 1 Expression in Zusammenhang gebracht werden. Damit wäre eine indirekte Bet v 1 Expression über LOX-synthetisierte Lipide zu hypothetisieren. Ebenso könnte Ozon hingegen auch direkt und lipidunabhängig über andere Signalwege zur Bet v 1 Expression führen (Abb. 40). Dies sind Fragen die in weiteren Studien möglicherweise unter Exposition von Ozon mit paralleler LOX-Inhibition geklärt werden müssten.

Verstärkt immunstimulatorische Kapazität durch Ozon

Zumal sich in späteren Zellsays auch eine verstärkte immunstimulatorische Kapazität der „Hoch-Ozon“ belasteten Pollen zeigt, lässt sich vermuten dass neben HODE und HOTE weitere Lipide mit immunstimulatorischer Kapazität gebildet werden. Die immunstimulatorische Kapazität zeigte sich in einer verstärkten Migration auf „Hoch-Ozon“ Pollen. Die Migration korrelierte dabei direkt mit der Höhe der Ozonexposition hingegen nicht mit PALM_{LTB4}. Anzunehmen ist, dass Ozon in direkter Abhängigkeit zur Migration steht. Ozon scheint zur Bildung unbekannter Faktoren, möglicherweise Lipiden, zu führen, welche die Migration induzieren. Eine umfassende Lipidanalyse könnte helfen mögliche Kandidatensubstanzen zu identifizieren.

Gezielte Expositionsstudien mit Ozon mit anschließender Lipid- als auch Enzymanalyse könnten es ermöglichen, den beobachteten Effekt gezielt auf den Schadstoff Ozon zurück zu führen. Ebenfalls wäre es möglich durch die umfassende Analyse gebildeter Produkte die veränderte immunogene Wirkung abzuschätzen und näher zu charakterisieren.

Wie bereits ausgeführt, lassen sich durch den Klimawandel als auch die zunehmende Urbanisierung in den nächsten Jahrzehnten steigende Ozonkonzentrationen erwarten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf eine zunehmende immunstimulatorische Kapazität von Pollen durch steigende Ozonkonzentrationen hin. Anzunehmende Folgen sind eine verstärkte Symptomatik beim Allergiker. Hingegen sind auch proinflammatorische Allergenunabhängige Wirkung auf nicht-Allergiker nicht auszuschließen. Die detaillierte Analyse des Einflusses dieser veränderten Umweltbedingungen auf den wichtigen Allergenträger, den Pollen, könnten helfen zukünftige Entwicklungen hinsichtlich der Pollinosis abzuschätzen und verbesserte Therapie- und möglicherweise präventive Strategien zu entwickeln.

7.1.1.7 Verändertes immunstimulatorisches und –modulatorisches Potential „Hoch-Ozon“ belasteter Pollen

Aus den vorangegangenen Korrelationsanalysen zu Allergen- und PALMs Gehalt mit den Parametern der Urbanisierung zeigte sich ein klarer Zusammenhang der Ozonexposition der beprobten Birken mit der Allergenität der Pollen. Ozon stand sowohl mit dem Allergengehalt als auch der Lipidzusammensetzung in Verbindung.

Mit Zellaassays sowie Pricktestungen sollte die immunologische Relevanz der gemessenen Parameter getestet werden, sowie die Allergenität von „Hoch-“, und „Niedrig-Ozon“ belasteten Pollen näher charakterisiert werden. In den vorangegangenen Allergenitätsanalysen (Bet v 1, PALMs, Adenosin) der Pollen wurden Parameter bestimmt, welche in Pollen bekannt und deren immunologische Relevanz bereits gezeigt werden konnte. Unbekannte Faktoren in Pollen können hierbei hingegen nicht erfasst werden.

Um die physiologische Relevanz einer hohen sowie niedrigen Ozonexposition von Birken zu analysieren, wurden die jeweils aus Stadt und Land jeweils am höchsten und niedrigsten Ozon-belasteten Birken ausgewählt. Diese wurden in Stimulationsversuchen mit dendritischen Zellen, Migrationsassays mit Neutrophilen Granulozyten und Pricktests eingesetzt.

Vermindertes Potential von „Hoch-Ozon“ Pollen eine Th1-Antwort zu inhibieren

Eine entscheidende Rolle bei der Allergieentstehung oder Sensibilisierung spielen Antigen-präsentierende Zellen (APZ). Für die Induktion einer Immunantwort bei Erstkontakt kommt unter den APZ der dendritischen Zelle die größte Bedeutung zu. Die dendritische Zelle vermittelt der naiven T-Zelle Signale, welche ihre Differenzierung bestimmen. Eine Th2-fördernde Immunitätslage ist hierbei Risikofaktor für die Entstehung einer allergischen Erkrankung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass WPE eine Th1-Antwort hemmen und Th2-fördernde Signale vermitteln [59, 65, 404]. Faktoren, welche dafür verantwortlich gemacht werden, werden als PALM_{PGE₂} bezeichnet. Ein Faktor in Pollen, welcher ähnliche Wirkung vermittelt und für diesen Effekt mitverantwortlich gemacht wird, ist PPE1. PPE1 in Konzentrationen wie es in Pollenextrakten gefunden werden kann, ist ebenfalls in der Lage die IL-12 Sekretion zu hemmen [404]. Hingegen zeigt PPE1 nur eine partielle Hemmung im Vergleich zum Gesamt WPE. Dies spricht für weitere unbekannt Faktoren in Pollen mit ähnlicher Wirkung.

Aufgrund starker struktureller Ähnlichkeit zu PGE₂ kann angenommen werden, dass PPE₁ für die Kreuzreaktivität im PGE₂ Elisa verantwortlich ist. Die physiologische Relevanz der PALM_{PGE₂} Werte, welche sich aus Kreuzreaktivität im PGE₂ Elisa ergaben, wurde in Stimu-

lationsversuchen mit MoDZ untersucht. Hierbei wurde die Kapazität die LPS induzierte IL-12 Antwort zu inhibieren, somit die Hemmung einer Th1-fördernden Immunitätslage, analysiert.

Aufgrund der signifikant negativen Korrelation von Ozon und $PALM_{PGE_2}$ wurde angenommen, das „Hoch-Ozon“ belastete Pollen ein vermindertes Potential hinsichtlich einer IL-12 Hemmung haben. Diese Hypothese bestätigte sich, wobei keine direkte Korrelation der IL-12 Hemmung mit den Werten ersichtlich wurde.

Dies ist hingegen nicht überraschend, da eine neue Studie von Gilles et al. zeigen konnte, dass Adenosin in Pollen enthalten ist, welches ebenfalls in der Lage ist die IL-12 Antwort in dendritischen Zellen zu hemmen [53].

Es kann angenommen werden, dass auch Pollen-Adenosin Einfluss auf die IL-12 Sekretion nimmt und sich die Hemmung aus diesem Grund nicht mit dem Einzelfaktor $PALM_{PGE_2}$ korrelieren lässt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass weitere bislang unbekannte Faktoren in Pollen enthalten sind, welche ähnliche Wirkungen vermitteln.

Auch für LTB_4 konnte in Mäusen gezeigt werden, dass sowohl endogenes als auch exogenes LTB_4 in der Lage ist eine LPS induzierte IL-12 Sekretion zu hemmen [405]. Damit könnten ebenfalls LTB_4 -ähnliche Faktoren aus Pollen Einfluss auf die IL-12 Hemmung nehmen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass aufgrund der Ergebnisse eine physiologische Relevanz der gemessenen PGE_2 -Werte evident ist, die IL-12 Hemmung hingegen nicht alleinig erklären kann. Gezeigt werden konnte, dass eine hohe Ozonexposition der Birke zu einer verminderten Fähigkeit eine Th1-Antwort zu inhibieren führt. Überträgt man diese Beobachtung auf die urban-ruralen Ozonunterschiede, könnte hypothetisiert werden, dass Pollen von urbanen Birken ein höheres Potential zur Induktion einer allergischen Erkrankung haben und möglicherweise einen weiteren Faktor für die höhere Allergieprävalenz in urbanen Gebieten darstellen.

Verstärkte Induktion einer Neutrophilen Chemotaxis durch „Hoch-Ozon“ Pollen

Nachdem sich in den Analysen ein höheres Verhältnis immunstimulatorischer (LTB_4 -ähnlicher) zu -modulatorischer (PGE_2 -ähnlicher) Substanzen in „Hoch-Ozon“ Pollen zeigte, wurde eine stärkere immunstimulatorische Wirkung von „Hoch-Ozon“ belasteten Pollen angenommen.

LTB_4 ist ein Leukotrien, welches von Leukozyten als Antwort auf inflammatorische Mediatoren produziert wird und dem große Bedeutung in entzündlichen Prozessen zukommt. LTB_4 induziert dabei die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten am Endothelium, was diesen wiederum die Bindung und Einwanderung in entsprechendes Gewebe erlaubt. Für Neuro-

phile Granulozyten ist es zudem ein starkes Chemoattraktanz und in der Lage die Bildung Reaktiver Sauerstoffradikale und Freisetzung lysosomaler Enzyme in diesen Zellen zu induzieren.

Wie bereits beschrieben enthalten auch Pollen LTB₄-ähnliche Lipide. Es konnte beobachtet werden, dass WPE eine Kreuzreaktivität im LTB₄ ELISA zeigen. Dies deutet auf Lipide mit struktureller Ähnlichkeit zu LTB₄ in Pollen hin, welche als PALM_{LTB4} bezeichnet wurden [25]. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass auf WPE ebenfalls eine Neutrophilen Chemotaxis festzustellen ist, welche durch Blockade des LTB₄-Rezeptors gehemmt werden konnte [78]. Dies spricht dafür, dass den im LTB₄ ELISA identifizierten LTB₄-ähnlichen Lipiden aus Pollen auch eine funktionelle Bedeutung zukommt. Als relevante Chemoattraktien in Pollen mit struktureller Ähnlichkeit zu LTB₄ konnten 13-HODE und 13-HOTE identifiziert werden [58].

Um die immunstimulatorische Kapazität der „Hoch-„ und „Niedrig-Ozon“ Pollen zu testen wurden Migrationsassays mit Neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Zellen, welche im Falle von Entzündungsreaktionen oder inflammatorischen Reizen, in entsprechendes Gewebe rekrutiert werden und für die LTB₄ ein starkes Chemoattraktanz darstellt.

Im Vergleich der „Hoch-„ und „Niedrig-Ozon“ belasteten Pollen zeigte sich eine signifikant höhere Migration Neutrophiler Granulozyten hin zu „Hoch-Ozon“ belasteten Pollen. Dieses Bild zeigte sich für alle eingesetzten WPE Konzentrationen. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass „Hoch-Ozon“ belastete Pollen somit über die Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten und möglicherweise weiterer innater Immunzellen die entzündliche Reaktion, spezifisch die Spättypreaktion, verstärken können. Somit könnte eine erhöhte Ozonexposition von Pollen zu einer verstärkten Symptomatik im Pollen-Allergiker führen. Die direkte Korrelation der Anzahl migrierter Neutrophiler Granulozyten mit der Höhe der Ozonexposition lässt einen direkten Einfluss von Ozon auf chemoattraktiv-wirksame Substanzen in Pollen vermuten.

Wie bereits beschrieben, lässt sich eine Induktion von LOX durch Ozon annehmen. Diese führt zur Generierung verschiedener Oxylipine der Pflanze, welche als Antwort auf biotischen und abiotischen Streß gebildet werden. Da sich eine direkte Korrelation der Ozonexposition mit der Migration zeigte, ist anzunehmen, dass hierbei bisher unbekannte Oxylipine oder aber gänzlich andere Faktoren generiert werden, welche diese Migration induzieren.

Es ist unwahrscheinlich, dass ausschließlich PALM_{LTB4} beteiligt sind, unter diesen HODE und HOTE, da keine direkte Korrelation mit PALM_{LTB4} zu beobachten war. Die direkte Korrelation mit Ozon lässt die Annahme zu, dass die Bildung dieser Substanzen direkt durch Ozon als anzunehmenden Streßfaktor induziert wird.

Des Weiteren deutet es darauf hin, dass mit zunehmender Urbanisierung und möglicherweise steigenden Ozonkonzentrationen nicht nur steigende Allergengehalte zu einer Steigerung der Symptomatik beim Allergiker beitragen, sondern ebenfalls eine erhöhte Allergen-unabhängige immunstimulatorische Wirkung mit Rekrutierung innater Immunzellen die Symptomatik aggraviert.

Um die Wirkung „Hoch-Ozon“ belasteter Pollen weiter zu charakterisieren, wären weitere *in vitro* Zellversuche u. a. mit Keratinozyten, Eosinophilen – und Basophilen Granulozyten sinnvoll, um mögliche Folgen verstärkter Ozonbelastung auf Ebene des Allergenträgers besser zu charakterisieren. Auch wäre eine umfassende Lipidanalyse hilfreich mögliche chemotaktisch- als auch generell immun-wirksamen Substanzen zu identifizieren.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche mit Neutrophilen Granulozyten zeigen Allergen-unabhängig Wirkungen von Pollen. Die Versuche wurden mit Zellen von nicht-Atopikern durchgeführt, weshalb auch für Nicht-Allergiker eine Wirkung innerhalb der Pollensaison nicht auszuschließen sind. Somit erscheinen detaillierte Untersuchungen zur Wirkung verstärkter Ozonexposition auf die immunogenen Effekte von Pollen relevant für die Gesamtbevölkerung.

Durch den Klimawandel und die zunehmende Urbanisierung ist mit einem weiteren Anstieg der Ozonkonzentrationen in den nächsten Dekaden zu rechnen. Um die Wirkung auf den Allergenträger und die gesundheitlichen Wirkungen für Allergiker als auch die Gesamtbevölkerung für zukünftige Entwicklungen abzuschätzen, sowie verbesserte Therapiestrategien zu entwickeln, wären weitere Untersuchungen hilfreich. Durch künstliche Ozonexpositionsstudien mit anschließender Analyse in weiteren Zellassays u. a. Keratinozyten, Eosinophilen Migrationen, weiteren Neutrophilen Migrationen sowie in DZ-Stimulationen mit anschließenden T-Zellkulturen könnte ein umfassenderer Einblick in die veränderten immunogenen Eigenschaften „Hoch-Ozon“ belasteter Pollen gewährt werden.

Verstärkte allergische kutane Immunreaktion durch „Hoch-Ozon“ Pollen

Abschließend wurden die Unterschiede zwischen „Hoch-Ozon“ und „Niedrig-Ozon“ Pollen *in vivo* anhand der allergischen Hautreaktion untersucht. Hierfür wurden Pricktestungen mit „Hoch-“, und „Niedrig-Ozon“ Pollen an Birkenpollen-Allergikern durchgeführt. Es sollte die physiologische Relevanz, primär der veränderten Allergengehalte, untersucht werden.

Hierbei zeigte sich eine stärkere allergische Hautreaktion durch Pricktestung mit „Hoch-Ozon“ Pollen. Es war eine größere Quaddel- als auch Erythembildung durch die „Hoch-Ozon“ Pollen festzustellen, wobei Quaddel- und Erythemgröße direkt mit der Höhe der Ozonexposition der Birke korrelierten. Dies ist ein klarer Hinweis auf eine Verstärkung der Allergenität von Pollen durch Ozon aufgrund erhöhter Allergengehalte.

Diese Beobachtungen sind konform mit vergangener Studie von Eckl-Dorna et al. [45], welche ebenfalls eine Erhöhung der Allergengehalte nach Ozonexposition in Grasspezies postulierten. Die Relevanz entsprechend veränderter Allergengehalte wurde in Immunoblots mit Seren von Grasallergikern untersucht, in denen die IgE-Bindungskapazität getestet wurde. Es konnte eine höhere IgE-Bindung mit Extrakten beobachtet werden, welche von höher Ozon-exponierten Grasspezies stammten.

Ein weiterer durch Ozon beschriebener Effekt ist die Nitrierung von Proteinen in Kombination mit NO₂. Auch hier wird eine verstärkte IgE Bindungsreaktivität postuliert [34, 35]. Diese Daten zusammen mit der vorliegenden als auch der Studie von Eckl-Dorna et al. deuten ebenfalls auf Ozon als die Pollenallergenität verstärkenden Faktor hin.

Hingegen existieren auch konträre Untersuchungen zu Ozon, welche auf eine Verringerung der Allergenität durch Ozon hindeuten [406]. Rogerieux et al. postulierte eine verminderte IgE-Reaktivität nach Ozon, NO₂ und SO₂ Begasung [406]. Als ursächlich diskutiert wurden hier geringere Allergengehalte, aber auch posttranslationale Modifikationen der Allergene, welche eine verminderte IgE-Bindung zur Folge hätten. Weiter wurde eine Ansäuerung bestimmter Allergene beschrieben. Nachdem eine Abnahme der Allergengehalte durch Einzelbegasung mit Ozon und NO₂ beschrieben wurde, wurden weitere additive Effekte durch weitere Reduktion der Allergengehalte unter paralleler Begasung von NO₂ und Ozon postuliert [406].

Kontroverse Effekte der verschiedenen Studien könnten aufgrund unterschiedlicher Pflanzenarten und -spezies aber auch aufgrund unterschiedlicher Versuchsaufbauten zustande gekommen sein. In Bezug auf die Nitrierungen ist ebenfalls die Proteinstruktur von Bedeutung. Im Falle von Bet v 1 konnte eine effektive Nitrierung dieses Allergens gezeigt werden. Dies deutet auf einen die Allergenität erhöhenden Effekt von Ozon auf Birkenpollen nicht nur über Erhöhung der Allergengehalte sondern ebenfalls über Nitrierungen hin.

Die Problematik künstlicher Expositionsstudien u. a. von Rogerieux ist, dass sie das natürliche parallele Vorkommen der Schadstoffe nicht berücksichtigen und auch die Art der Exposition und genaue Versuchsaufbau über mögliche Effekte entscheiden können. Künstliche Expositionsstudien können gute Hinweise geben, welche Parameter Einflussfaktoren auf die Allergenität sein könnten, hingegen lassen sie nur geringe Rückschlüsse auf tatsächliche Relevanz und Wirkung unter natürlicher Exposition zu.

Eine weitere Problematik von Expositionsstudien ist, dass es diesen nicht möglich ist natürliche Adaptationsmechanismen von Pflanzen und damit langfristige Effekte zu berücksichtigen.

Die vorliegende Studie gibt hingegen klare Hinweise, dass höhere Ozonexposition für Birken, unter natürlichen Bedingungen, ein relevanter Faktor ist, der die Allergenität von Birkenpollen mit klinischer Relevanz erhöht und die allergische Reaktion aggravierend machen kann. Zumal die

Datenlage kontrovers ist, wird diese Beobachtung durch künstliche Expositionsstudien (Masuch et al., Eckl-Dorna et al.) gestützt.

Es ist anzunehmen, dass die verstärkte Allergenität in der Pricktestung primär über erhöhte Allergengehalte vermittelt wird, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch weitere Faktoren eine aggravierende Wirkung auf die Quaddelbildung haben.

Weitere Möglichkeiten Allergen-unabhängiger Pollen-Faktoren mit Wirkung auf die Quaddelgröße

Das neben dem Allergen selbst noch andere Substanzen aus Pollen Einfluss auf die Mastzellaktivierung nehmen können, deutet eine Studie von Metz et al. an [398]. Diese konnte im murinen Modell eine IgE-unabhängige Mastzelldegranulation nach Injektion von WPE in naive Mäuse zeigen.

In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Quaddelgröße von weiteren in Pollen enthaltenen Faktoren beeinflusst wird. Dies konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit bestätigt werden. Möglich wäre auch, dass die veränderte Lipidzusammensetzung die allergische Hautreaktion beeinflusst.

So finden sich ebenfalls unterschiedliche Mengen PGE₂-kreuzreaktiver Substanzen in den untersuchten Pollen, welche in hemmender oder aktivierender Weise die Quaddel- und Erythembildung beeinflussen könnten. Die Datenlage zu PGE₂ und Mastzellaktivierung ist widersprüchlich. Hingegen sind PGE₂-Rezeptoren auf Mastzellen beschrieben, womit eine Wirkung evident ist. Beschriebene Effekte sind hingegen sowohl aktivierender als auch inhibierender Natur.

Linda et al. [407] zeigten, dass PGE₂ hemmende Effekte auf die Degranulation von Lungenganzmastzellen hat. Auch Saarinen et al. [408] beschrieben eine größere Quaddelbildung in Pricktestungen sofern die PGE₂ Synthese gehemmt wurde, somit weniger PGE₂ gebildet wurde. In Bezug auf die Prick-Testungen der vorliegenden Studie wäre es somit ebenfalls möglich, dass PGE₂-kreuzreaktive Substanzen die Quaddelbildung beeinflusst haben. Möglicherweise haben die höheren PALM_{PGE2}-Gehalte in den „Niedrig-Ozon“ belasteten Pollen, neben den geringeren Allergengehalten, zudem die Quaddelbildung über Wirkung auf die Mastzelle gehemmt.

Konträr hierzu wird PGE₂ hingegen ebenfalls als Amplifikationsmechanismus der FcεRI medierten Mastzelldegranulation beschrieben [409]. Dies wiederum würde für einen stimulierenden Effekt von PALM_{PGE2} auf die Quaddelbildung sprechen. Spezifische Pricktestungen mit PPE1 und PGE₂ plus Allergen könnten helfen diesen Sachverhalt näher zu beleuchten.

Ebenfalls beschrieben sind Adenosin-Rezeptoren auf Mastzellen. Studien postulieren hingegen kontroverse Wirkungen von Adenosin auf die Mastzelldegranulation [410]. Die Wirkung

von Adenosin wird hierbei in starker Abhängigkeit zur Rezeptorexpression diskutiert. Damit sind Effekte von Pollen-Adenosin auf die Mastzelldegranulation wahrscheinlich, die Wirkungen könnten hingegen in Abhängigkeit der Rezeptorexpression sowohl hemmender als auch aktivierender Natur sein [410].

Abschließend lässt sich sagen, dass über die Pricktestung gezeigt werden konnte, dass Ozon die Allergenität von Birkenpollen mit klinischer Relevanz für die allergische Reaktion erhöht. Die Korrelation der Höhe der Ozonexposition mit der Quaddel- und Erythemgröße lässt weiter darauf schließen, dass die Ozon-Konzentration ein maßgeblicher Faktor für die Allergenität von Birkenpollen ist. Aufgrund des Klimawandels sowie der Urbanisierung sind steigende Ozonkonzentrationen in den nächsten Dekaden wahrscheinlich. Anzunehmen ist, dass diese über eine Erhöhung der Allergengehalte zu einer verstärkten Allergenität von Birkenpollen und folglich einer verstärkten Symptomatik beim Allergiker führen werden.

7.1.1.8 Klimawandel und Allergie

Der anthropogene Klimawandel beschreibt die globale Erwärmung seit dem 20. Jahrhundert, als dessen Ursache vom Menschen verursachte Treibhausgase erachtet werden. Die Folgen des Klimawandels sind veränderte Umweltbedingungen, welche den Menschen und dessen Gesundheit beeinflussen. Ein Aspekt, welcher in diesem Zusammenhang immer mehr Aufmerksamkeit erlangt, ist der Einfluss der globalen Erwärmung auf allergische Erkrankungen. Neben dem Menschen sind ebenfalls Pflanzen – unter diesen die allergenen Pflanzen – den veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt. Höhere Temperaturen nehmen Einfluss auf die Pflanzenphänologie und bringen eine verfrühte und verlängerte Vegetationsperiode mit sich [371]. Für den Allergiker bedeutet dies eine frühere und zudem verlängerte Periode symptomatischer Beschwerden.

Zudem bieten veränderte Umweltbedingungen ebenfalls neuen Pflanzenarten einen Lebensraum. Als Folge können neue allergene Pflanzen in Gebieten auftreten, in denen sie bislang keine geeigneten Wachstumsbedingungen hatten. Ein besonders prominentes Beispiel hierfür ist die Ambrosia-Pflanze, welche ein hohes allergenes Potential aufweist. Während die Ambrosia-Pflanze ursprünglich aus Amerika stammt, breitet sie sich mittlerweile auch in Europa aus. Schätzungen zufolge sind in Deutschland mittlerweile 15% der Bevölkerung gegen Ambrosia sensibilisiert. Es wird angenommen, dass sich diese Zahl in den nächsten Dekaden über eine weitere Ausbreitung dieser hochallergenen Pflanze sowie Neusensibilierungen deutlich erhöhen wird [411].

Für den Klimawandel von besonderer Bedeutung ist das Treibhausgas CO₂. Dieses klimaaaktive Gas wird für den größten Teil der bisherigen anthropogenen Erderwärmung verantwortlich gemacht [412, 413][IPCC 2007]. Neben der herausragenden Bedeutung von CO₂ als Treibhausgas nimmt es ebenfalls Einfluss auf Pflanzen und deren Pollenproduktion. In Studien [371, 372] wurde beobachtet, dass CO₂ zu einer höheren Pollenproduktion und auch größeren Biomasse allergener Pflanzen beitragen kann. Am Beispiel der Ambrosia-Pflanze konnte gezeigt werden, dass eine Verdopplung der CO₂-Konzentration zu einer Erhöhung der Pollenproduktion um 61% führte [414]. Eine steigende Pollenbelastung kann wiederum Sensibilisierungen begünstigen und beim Allergiker zu einer Aggravation allergischer Beschwerden führen.

Die mit dem Klimawandel einhergehenden höheren Temperaturen haben hingegen einen weiteren Effekt. Sie können ebenfalls zu einer erhöhten Schadstoffbelastung beitragen. Bei stabilen Hochdruckwetterlagen kann ein deutlicher Anstieg der Ozonkonzentrationen als auch der Belastung mit partikelförmigen Schadstoffen beobachtet werden [411]. Erhöhte Schadstoffkonzentrationen wiederum können in direkter Weise den Menschen und dessen Gesundheit beeinflussen: Sensibilisierungen können begünstigt und allergische Beschwerden aggraviert werden [411, 415]. U. a. für Ozon konnte ein Zusammenhang mit sowohl Sensibilisierungen als auch Ausmaß allergischer Beschwerden gezeigt werden [415].

Zudem nehmen erhöhte Schadstoffkonzentrationen auch Einfluss auf allergene Pflanzen und deren Allergenträger. Etwa kann der Allergengehalt von Pollen verändert werden [44, 45]. Zudem kann es zu einer direkten Wechselwirkung von Schadstoffen mit dem Allergenträger kommen. Die Folgen können u. a. Proteinmodifikationen oder veränderten Allergenbioverfügbarkeiten sein [10, 35]. Sowohl über Wirkungen auf die Pflanze selbst als auch über Wechselwirkungen mit dem Allergenträger können Schadstoffe somit ebenfalls Sensibilisierungen begünstigen und allergische Beschwerden aggravierern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Klimawandel auf vielerlei Wegen Einfluss auf allergische Erkrankungen nehmen kann. Aufgrund dessen sollte ebenfalls diesem Aspekt des Klimawandels in Zukunft ausreichend Rechnung getragen werden. Weitere Forschungsarbeiten sind nötig, um die zukünftige Entwicklungen und Auswirkungen des Klimawandels auf allergische Erkrankungen abzuschätzen und verbesserte Therapien sowie auch präventive Strategien zu entwickeln.

7.1.2 Immunmodulation durch WPE <3kDA

Der Pollen transportiert das männliche Erbgut der Pflanze. Er enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, mit bisher größtenteils unbekannter Wirkung auf den humanen Organismus. Während einige Faktoren mit möglicher Beteiligung an Allergieentstehung und Symptomatik identifiziert wurden, besteht bisher noch kein ganzheitliches Verständnis über die Wirkung des Pollens auf das Immunsystem des Menschen.

Zu den bereits in Pollen identifizierten Faktoren, gehören u. a. PALM_{PGE2}, PALM_{LTB4} und Adenosin. Die Rolle von PALM_{PGE2} wird dabei primär in der Sensibilisierungsphase eingeordnet, indem es die Induktion einer allergiefördernden Th2-gerichteten Immunantwort fördert. Auch Adenosin zeigt eine immunmodulatorische Wirkung, hingegen induziert Adenosin regulatorische Mechanismen, womit ihm eine Bedeutung in der Toleranzinduktion, hingegen mit divergenten Effekten in Atopikern und Nicht-Atopikern, zugeschrieben wird. Im Gegensatz zu PALM_{PGE2} und Adenosin deren bisherige beschriebene Wirkungen immunmodulatorisch sind, wird für PALM_{LTB4} eine Immunstimulation postuliert. Die Immunstimulation liegt in einer verstärkten Rekrutierung Neutrophiler und Eosinophiler Granulozyten, womit die Wirkung von PALM_{LTB4} in der Aggravation symptomatischer Beschwerden in der Spätphase eingeordnet werden kann.

Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass niedermolekulare Substanzen, zu denen die PALMs und Adenosin gehören, Allergen-unabhängige Wirkung auf Zellen des Immunsystems, mit Einfluss auf Allergieentstehung und Symptomatik besitzen. Die bisherigen Untersuchungen konzentrierten sich bislang primär auf die Sensibilisierungsphase sowie die Spätphase der allergischen Reaktion. Wenig untersucht war bisher die Sofortreaktion der Allergie.

Die Allergie vom Typ 1 wird eingeteilt in die Sensibilisierungsphase und die Auslösephase. Die Auslösephase wird wiederum in eine Frühphase, die Sofortreaktion, und eine Spätphase untergliedert. In der Frühphase findet die Erkennung des Allergens über Bindung an auf Mastzellen gebundenen IgE mit Quervernetzung statt. Die Folge ist die Aktivierung der Mastzelle mit Freisetzung sich in der Mastzelle befindlicher Mediatoren. Die aus der Mastzelle freigesetzten Mediatoren, unter diesen Histamin und Prostaglandine, sind verantwortlich für die typische Symptomatik allergischer Erkrankungen vom Soforttyp. Die Spätreaktion wird induziert durch die Neusynthese und Ausschüttung von Leukotrienen, Chemokinen und Zytokinen, welche zur Rekrutierung verschiedener Leukozyten u. a. Th2-Zellen und Eosinophilen- und Neutrophilen Granulozyten führen.

Die Bedeutung niedermolekularer Substanzen in der Sofortreaktion der Allergie war bisher wenig untersucht und sollte im weiteren Verlauf des ersten Teils dieser Arbeit analysiert werden. Hierfür wurden zum einen Stimulationsversuche mit der humanen Mastzelllinie LAD2 sowie humanen Basophilen Granulozyten durchgeführt. Zum anderen wurde die *in*

in vivo Wirkung niedermolekularer Substanzen in der kutanen allergischen Reaktion mittels Pircktestung bestimmt.

7.1.2.1 Aggravation der Aktivierung der Mastzelllinie LAD2 durch WPE

Die Mastzelle ist die primär an der Sofortreaktion beteiligte Zelle. Um zu klären, welchen Einfluss Allergen-unabhängige Pollenfaktoren auf die FcεR-medierte Mastzelldegranulation haben, wurden im ersten Schritt Stimulationsversuche mit der humanen Mastzelllinie LAD2 durchgeführt. Die Zelllinie wurde hierfür mit Anti-IgE in An- und Abwesenheit von WPE aktiviert. Die Stimulation der Mastzelllinie LAD2 zeigte eine verstärkte β-Hexosaminidase Freisetzung unter paralleler Stimulation mit WPE. Dies deutet auf Faktoren in Pollen hin, welche eine Allergen-abhängige FcεR-medierte Aktivierung von Mastzellen verstärken.

Potentielle Faktoren könnten PGE₂-ähnliche Substanzen oder aber Adenosin sein. Für diese sind Rezeptoren auf Mastzellen beschrieben, hingegen werden kontroverse Effekte postuliert. Für Adenosin als auch PGE₂ ist sowohl eine hemmende als auch aktivierende Wirkung auf die Mastzelldegranulation beschrieben [409, 410, 416]. Anzunehmen ist, dass Effekte in starker Abhängigkeit von Kofaktoren, aber auch von der Rezeptorexpression stehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie in der humanen Mastzelllinie LAD2 geben Hinweis auf eine aktivierende Wirkung von Allergen-unabhängigen Faktoren auf Mastzellen, welche Adenosin oder PALM_{PGE2} sein könnten. Eine maßgebliche Problematik bei Zelllinien ist, dass sie ein artifizielles System darstellen und oftmals veränderte Eigenschaften aufweisen. Inwieweit diese Zellen somit noch eine normale physiologische Reaktion sowie Rezeptorexpression zeigen ist unklar. Bereits *in vivo* weisen Mastzellen abhängig von den Bedingungen und je nach Lokalisation bereits stark heterogene Eigenschaften auf. Eine grobe Einteilung findet zunächst nach Gewebe- und Schleimhautmastzelle statt, ist hingegen weitaus komplexer. Neben unterschiedlicher Granula-Zusammensetzung ist auch eine unterschiedliche Rezeptorexpression u. a. unterschiedlicher TLRs oder Adenosinrezeptoren in unterschiedlichen Mastzelltypen beschrieben [409]. Je nach Ligand oder Rezeptorkomplex-Typ sind unterschiedliche modulierende Eigenschaften auf die FcεR-abhängige Antwort gezeigt worden. Ebenfalls postuliert ist eine Aktivierung durch G-protein gekoppelte Rezeptoren. Liganden die an diese binden sind unter anderem Prostaglandine, Shingosine-1-phosphat, Histamin, Zytokine, Komplementfaktoren, Adennukleotide und Adenosin [409]. Möglich wäre, dass die bereits in Pollen identifizierten Faktoren Adenosin oder PALM_{PGE2} über Rezeptorwirkung auf der humanen Mastzelllinie LAD2 zu einer Aktivierung geführt haben. Eine weitere Option ist, dass bislang unbekannte Faktoren entsprechende Effekte vermittelt haben.

Zumal die Stimulationsversuche der Mastzelllinie LAD2 ein artifizielles System darstellen, geben diese Versuche dennoch Hinweis, dass eine entsprechende aggravierende Wirkung

niedermolekularer Substanzen auf die Mastzelldegranulation auch *in vivo* über direkte Wirkungen auf die Mastzelle statt finden könnten.

Die Aktivierung von Mastzellen ist hingegen weitaus komplexer, wobei neben einer typischen IgE-vermittelten Aktivierung beispielsweise auch eine Allergen-unabhängige Aktivierung über benachbarte Zellen statt finden kann [410]. Beschrieben wurde eine Allergen-unabhängige Aktivierung sowie aggravierende Wirkung auf die FcεR vermittelte Stimulation von murinen „aus dem Knochenmark stammenden Mastzellen“ (bone-marrow-derived mast cells) und humanen Mastzellen.

Damit wird deutlich, dass die *in vitro* Stimulation einige Faktoren nicht berücksichtigen kann. Aus diesem Grund wurden in Folge *in vivo* Versuche mittels Pricktestungen durchgeführt. In diesen können Effekte beispielsweise über benachbarte Zellen miteinbezogen werden, allerdings kann nicht mehr zwischen direkten Effekten auf die Mastzelle und indirekten Wirkungen über andere Zellen differenziert werden.

7.1.2.2 Aggravierende Wirkung von WPE <3kDA auf die allergische Hautreaktion

Die Ergebnisse der Mastzelllinie LAD2 gaben Hinweis, dass eine aggravierende Wirkung Allergen-unabhängiger Substanzen aus Pollen auf Mastzellen besteht. Aufgrund möglicher veränderter Eigenschaften der Mastzelllinie LAD2 sowie weiterer aufgeführter Faktoren wurden Pricktestung in allergischen Probanden durchgeführt. Im Gegensatz zur Mastzelllinie LAD2 wurde in den Pricktestungen die Möglichkeit der wirksamen Faktoren durch Separation in Substanzen kleiner 3 kDA eingegrenzt. Entsprechend der Mastzelllinie LAD2 konnte in den Pricktestungen ebenfalls eine Aggravation der allergischen Reaktion durch Allergen-unabhängigen Pollenfaktoren beobachtet werden. Sofern die Probanden mit Allergen in Kombination mit einer WPE Fraktion kleiner 3 kDA geprickt wurden, konnte eine größere Quaddel- und Erythemgröße festgestellt werden. Damit war ein klarer Hinweis gegeben, dass niedermolekulare Substanzen in Pollen vorhanden sind, welche die allergische Sofortreaktion aggravieren können. Der Effekt einer aggravierenden Wirkung des Birkenpollenextraktes kleiner 3 kDA konnte in Probanden reproduziert werden und zeigte sich auch in Gräserpollenallergikern.

Die Ergebnisse der Pricktestungen lassen den Schluss zu, dass Allergen-unabhängige Substanzen in Pollen vorhanden sind, welche die Allergen-abhängige Aktivierung aggravieren und das Ausmaß der allergischen Sofortreaktion als auch Symptomatik beeinflussen.

Da Mastzellen Adenosinrezeptoren exprimieren und Adenosin in Pollen gefunden werden kann, wurde im nächsten Schritt getestet ob Adenosin an der Aggravation der allergischen kutanen Reaktion beteiligt sein könnte. Hierfür fanden Pricktestung statt, in denen das Aller-

gen in einer Adenosinlösung gelöst wurde. Somit fand eine Pricktestung von Allergenen in Kombination mit Adenosin statt.

Hierbei zeigte sich, dass Adenosin in Kombination mit dem Allergen geprickt, ebenfalls zu einer Aggravation der kutanen allergischen Hautreaktion führt. Ähnlich der Pricktestung mit den WPE kleiner 3 kDa konnte auch hier eine größere Quaddel- und Erythembildung in sowohl Birken- als auch Gräserpollenallergikern festgestellt werden. Adenosin war damit in der Lage den Effekt der niedermolekularen Fraktion des WPE zu imitieren.

Damit besteht Evidenz, dass Pollen-Adenosin in der niedermolekularen Fraktion des WPE zumindest in Teilen für die aggravierende Wirkung in der Pricktestung verantwortlich sein könnte. Anzunehmen ist, dass Adenosin hierbei eine Wirkung auf die in der Haut befindliche Mastzelle hat, welche die Mediatorausschüttung verstärkt. Es können hingegen auch indirekte Effekte über benachbarte Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Es kann hingegen ebenfalls davon ausgegangen werden, dass noch weitere Faktoren mit Wirkung auf die Mastzelle in Pollen gefunden werden können. Neben Adenosin wären beispielsweise ebenfalls PGE₂-ähnliche Substanzen Kandidaten für zusätzliche aggravierende Effekte. So konnte gezeigt werden dass auch PGE₂ die FcεRI-medierte Mastzellaktivierung über den EP3 Rezeptor verstärken kann [409].

Es können keine Quaddeln nach alleiniger Pricktestung mit der WPE <3kDa oder der Adenosinlösung gemessen werden, womit es sich um einen Allergen-abhängigen, die FcεRI-medierte Mastzellaktivierung aggravierenden Effekt, zu handeln scheint.

Die Pricktestung ermöglicht die gezielte Auslösung einer allergischen Reaktion in der Haut, in der die WPE <3kDa als auch Adenosin einen aggravierenden Effekt zeigten. Anzunehmen ist, dass auch unter natürlichen Expositionsbedingungen, wenn der Pollen auf die Schleimhaut oder Haut trifft und sein Allergen parallel mit Adenosin und weiteren Substanzen freisetzt auch hier aggravierende Wirkungen von Adenosin auf die allergische Reaktion zu erwarten sind.

Unterstützt wird die Hypothese einer aggravierenden Wirkung von Adenosin durch die Beobachtung, dass Adenosin auch von der Mastzelle selbst ausgeschüttet wird, was wiederum als Selbstamplifikationsmechanismus der Mastzelle diskutiert ist [417].

Wirkung von Adenosin auf die Mastzelle

Erste Hinweise einer aggravierenden Wirkung von Adenosin auf die FcεRI-medierte Mastzelldegranulation wurden durch Stimulationsversuche mit Nagetiermastzellen erbracht. Diese konnten zeigen, dass Adenosin in der Lage ist die Mastzelldegranulation zu aggravieren [418]. Schwieriger ist hingegen die Datenlage in humanen Mastzellen. So sind parallel inhibierende als auch aktivierende Wirkungen von Adenosin beschrieben [410]. Unter anderem beschrieb Gomez et al. eine IgE-abhängige aggravierende Wirkung von Adenosin auf Lun-

gen- nicht hingegen auf Hautmastzellen [419], was im Widerspruch zu den Beobachtungen der vorliegenden Studie steht. Die beobachtete aggravierende Wirkung der Studie von Gomez et al. zeigte hierbei eine Konzentrationsabhängigkeit und war nur in Konzentrationen von $1 \times 10^{-6} \text{M}$ zu finden. Dies entspricht der Konzentration von Adenosin in WPE. Als Ursache für die divergenten Effekte von Adenosin auf Lungen- und Hautmastzellen wurde eine unterschiedliche Expression der Adenosinrezeptoren angeführt. Die verstärkte Expression von A3 in Lungenmastzellen, wurde als mögliche Ursache für die aggravierende Wirkung von Adenosin in Lungen- und nicht in Hautmastzellen angegeben.

Welche Wirkungen Adenosin entfaltet, hängt maßgeblich von der Rezeptorexpression ab. Es werden vier verschiedene Adenosinrezeptoren unterschieden. A1, A2a, A2b und A3, wobei Mastzellen nur die Rezeptoren A2a, A2b und A3 exprimieren [410]. Murin wird bislang eine antiinflammatorische Wirkung durch A2a und eine inflammatorische durch den A3 Rezeptor beschrieben. Für A2b wurde sowohl eine inflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkung postuliert [410].

Human wurde für den A3-Rezeptor ebenfalls eine inflammatorische Wirkung gezeigt, für den A2a- und A2b-Rezeptor werden inflammatorische als auch antiinflammatorische Effekte postuliert.

Gomez et al. beschrieben eine Expression des A2a-, A2b- und A3-Rezeptors in Lungen und Hautmastzellen, mit verstärkter Expression des A3-Rezeptors in Lungenmastzellen [419]. Dies war möglicherweise ursächlich für die aggravierende Wirkung von Adenosin in Lungen- und nicht in Hautmastzellen.

Die Ergebnisse von Gomez et al. stehen im Widerspruch zu der vorliegenden Studie, die eine verstärkte allergische Hautreaktion auf eine verstärkte Aktivierung von Hautmastzellen zurückführt. Anzumerken ist hingegen, dass die in den Experimenten von Gomez et al. isolierten Mastzellen aufgrund aufwändiger Isolierung mit Gewebeverdau und MACS Separation sowie zusätzlicher Kultivierung von 2 – 12 Wochen nicht mehr die ursprüngliche Rezeptorexpression aufweisen könnten. Kritisch zu betrachten ist hierbei zudem, dass die Hautmastzellen 12 Wochen und die Lungenmastzellen nur 2 Wochen kultiviert wurden. Dies macht einen direkten Vergleich schwierig. Es besteht die Möglichkeit, dass die lange Kultivierung der Hautmastzellen diese desensibilisiert hat oder anderweitig verändert hat und mitverantwortlich für die ausbleibende aggravierende Wirkung von Adenosin ist.

Generell scheint die Datenlage hingegen recht widersprüchlich und maßgeblich abhängig von der Rezeptorexpression. Die unterschiedlich beschriebenen Wirkungen für die Einzelrezeptoren [410] deuten möglicherweise zudem eine Bedeutung des Verhältnis der Rezeptoren zueinander an, womit die sich durch Adenosin entfaltende Wirkung komplex scheint. Ein dies weiter erschwerender Faktor ist die unterschiedliche Affinität der Rezeptoren für Ade-

nosin. Während der A1- und A2a-Rezeptor eine hohe Affinität zu Adenosin haben, zeigen der A2b- und A3-Rezeptor eine niedrigere Affinität [410].

Damit hat neben dem Expressionsprofil der verschiedenen Rezeptoren ebenfalls die Adenosin-Konzentration Bedeutung für die von Adenosin vermittelten Wirkungen.

Wirkung von Adenosin-Inhalation in Gesunden und Asthmatikern

Interessanterweise ist gezeigt worden, dass die Inhalation von Adenosin in Allergikern sowie Asthmatikern zu einer Bronchokonstriktion führt, hingegen in Gesunden Probanden keine Wirkung hat [420-422]. Dies ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Rezeptorexpression unter Atopie- oder Entzündungsstatus zurückzuführen. Die Inhalation von Adenosin in Asthmatikern führt zu erhöhten Konzentrationen von Mastzellmediatoren wie Histamin und Tryptase in der Bronchoalveolaren Lavage. Daten die darauf hindeuten, dass die durch Adenosininhalation herbeigeführte Bronchokonstriktion zumindest in Teilen durch Mastzellen mediiert wird.

Dies spricht für eine aktivierende Wirkung von Adenosin auf Mastzellen in Allergikern und Asthmatikern. Die unterschiedliche Wirkung der Adenosininhalation in Asthmatikern/Allergikern und Gesunden ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Adenosin-Rezeptorexpression zurückzuführen.

Mögliche unterschiedliche Adenosin-Rezeptorexpression in Gesunden und Atopikern

Da in der vorliegenden Studie mit Allergikern gearbeitet wurde, könnte auch hier eine entsprechende Rezeptorexpression vorgelegen haben, die zu einer aggravierenden Wirkung von Adenosin auf die allergische Reaktion in der Haut beigetragen hat.

So wäre es möglich, dass sich die Rezeptorexpression von Atopikern und nicht Atopikern unterscheidet. Atopiker haben zumeist mehr IgE im Blut und zeigen eine höhere FcεR-Expression pro Mastzelle als nicht-Atopiker, wobei IgE selbst einen positiven Regulator der FcεR-Expression darstellt. Möglich wäre auch eine veränderte Expression der Adenosin-Rezeptoren auf Atopikern und Nicht-Atopikern.

Möglicherweise wird auch die Mastzelle „geprimt“ auf wiederholten Antigen-Kontakt verstärkt zu reagieren. Inhaliertes Adenosin führt zu einer Bronchokonstriktion, in Tiermodellen zeigt sich eine verstärkte Reaktivität auf Adenosin sofern die Tiere vorab sensibilisiert und gechallenged wurden. Möglicherweise zurückzuführen auf eine veränderte Rezeptorexpression [417].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass in Pollen enthaltenes Adenosin aggravierende Wirkung auf die Sofortreaktion der Allergie hat. Zumal in der vorliegen-

den Studie nicht mit Lungenmastzellen gearbeitet wurde, gibt die bisherige Datenlage zu Adenosin in der Lunge hingegen ausreichend Evidenz, dass auch hier eine Wirkung angenommen werden kann. Inwieweit hier lediglich Allergiker oder Asthmatiker betroffen sind und inwiefern unterschiedliche Rezeptorexpressionen vorliegen und möglicherweise determinierend für Effekte sind, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Ausgeschlossen werden kann hingegen nicht, dass es sich in der Aggravation der allergischen Hautreaktion um indirekte Effekt von Adenosin auf beispielsweise Keratinozyten, Endothelzellen oder Fibroblasten gehandelt hat. Die Versuche der Zelllinie LAD2 geben hingegen Evidenz einer direkten Wirkung auf die Mastzelle.

7.1.2.3 Verstärkte Aktivierung Basophiler Granulozyten durch WPE <3kDA

Neben Mastzellen exprimieren auch Basophile Granulozyten den FcεR, binden IgE und können durch Antigen-IgE-Bindung aktiviert werden. Ihre Rolle in der allergischen Erkrankung ist hingegen nicht abschließend geklärt. Im Gegensatz zu Mastzellen zirkulieren Basophile Granulozyten im Blut und können unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen ins Gewebe rekrutiert werden, wo sie dann u. a. im Falle einer allergischen Reaktion gefunden werden können. Hier können sie durch Antigenaktivierung zur allergischen Reaktion beitragen.

Gleichzeitig wird ihnen eine Rolle in der Induktion allergischer Erkrankungen zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls als APZ fungieren können, die *in vivo* und *in vitro* eine Th2-Antwort induzieren können [423]. Eine Depletion von Basophilen Granulozyten in Mäusen kann diese vor Tod in Folge eines Anaphylaktischen Schockes schützen als auch therapeutische Wirkung auf eine bestehende allergische Entzündung ausüben [424].

Auch die Datenlage zu Adenosin und Basophilen Granulozyten ist widersprüchlich, aber wie bei Mastzellen wird auch hier die Regulation und Wirkung in Abhängigkeit der Rezeptorexpression als auch Konzentration diskutiert.

Wie bereits beschrieben, wird speziell bei Asthma Adenosin eine große Rolle mit Wirkung auf inflammatorische Zellen zugeschrieben. Adenosin wird hier mitverantwortlich gemacht für die typischen Charakteristika von Asthma wie Bronchokonstriktion, Mukussekretion und Entzündung. Die Akkumulation von Adenosin in extrazellulärer Matrix als Folge der Freisetzung aus entzündetem, nekrotischen oder ischämischen Gewebe wird hierbei als Teil der Pathogenese von Asthma sowie anderen inflammatorischen Erkrankungen diskutiert [417, 425]. Über den A3-Rezeptor wird hierbei sowohl die Fähigkeit eine Zellmigration in entzündetes Gewebe, die Induktion inflammatorischer Zytokine sowie die Degranulation und Me-

diatorfreisetzung von Neutrophilen Granulozyten, Basophilen Granulozyten und Mastzellen induziert [426].

Gezeigt werden konnte, dass inhaliertes Adenosin zu einer Bronchokonstriktion in Allergikern führt. In verschiedenen Tiermodellen wurden die A1, A2b und A3 Rezeptoren mit Bronchospasmen in Verbindung gebracht. Die Wirkung über A1-Rezeptoren zeigt sich auch in Mastzell-defizienten Mäusen, Wirkungen über A2b- und A3-Rezeptoren hingegen werden mit Mastzell-ähnlichen Zellen in Verbindung gebracht. Entsprechend Mastzellen steht auch hier der A3-Rezeptor mit einer inflammatorischen Funktion und Aktivierung in Verbindung [427, 428].

Während die A3-Rezeptor Expression in den meisten Geweben gering ist, kann eine massive Expression in Neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen Granulozyten und Basophilen Granulozyten beobachtet werden [429]. Basophile Granulozyten werden dabei über eine hohe A3-Rezeptorexpression ebenfalls mit Bronchospasmen in Verbindung gebracht.

Während viele Studien den A3-Rezeptor mit einer inflammatorischen Wirkung in Verbindung bringen, bestehen hingegen auch Studien welche gegenteiliges postulieren [429]. Ähnlich Mastzellen scheint die Wirkung von Adenosin in Basophilen Granulozyten ebenfalls von Rezeptorexpression und Konzentration abhängig.

In unserer Studie wurden Basophile Granulozyten von Pollenallergikern verwendet und es zeigte sich eine stimulierende Wirkung von Adenosin auf die Basophilen-Aktivierung. Nicht geklärt ist, ob sich die Rezeptorexpression von Atopikern und Nicht-Atopikern unterscheiden und mit Zellen eines Nicht-Atopikers andere Ergebnisse erzielt worden wären.

Auch die Konzentration ist maßgeblich, so konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentration zu einer Hemmung der Degranulation von Mastzellen, niedrige zu einer Induktion führen.

Abschließend lässt sich sagen, dass auf Basophile Granulozyten eine aggravierende Wirkung von WPE <3kDa Allergen-abhängig als auch -unabhängig gezeigt werden konnte. Ferner konnte Adenosin die Allergen-abhängige Aggravation der Basophilen Aktivierung durch WPE <3kDa nachbilden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass niedermolekulare Substanzen in Pollen, unter anderem Adenosin, über Wirkung auf Basophile Granulozyten ebenfalls zu einer verstärkten Symptomatik im Allergiker beitragen könnten. Weitere Forschungsarbeiten sind nötig, um ein besseres Verständnis der Wirkung des Pollens auf das Immunsystem zu schaffen und verbesserte Therapiestrategien zu entwickeln.

Fazit: Allergen-unabhängige immunogene Wirkungen von Pollen

Im Fazit lässt sich sagen, dass die Analysen zur Allergen-unabhängigen immunogenen Wirkung von Pollen auf eine aggravierende Wirkung niedermolekularer Substanzen aus Pollen

auf die allergische Soforttypreaktion hindeuten. Dies hebt die Relevanz Allergen-unabhängiger Substanzen in der Bestimmung der Allergenität hervor.

Zudem kann die Bestimmung entsprechender Parameter auch für den Nicht-Allergiker von Bedeutung sein. Gezeigt werden konnte, dass in Pollen enthaltenes Adenosin ein Parameter ist, welcher mitverantwortlich für die Aggravation der Mastzellaktivierung als auch Basophilen-Aktivierung ist. Adenosin zeigt hingegen auch Allergen-unabhängig Wirkung auf Asthmatiker oder Allergiker, womit der Pollenflug auch zu einer Aggravation der Symptomatik in nicht-spezifisch-sensibilisierten Personen führen kann und weitere Untersuchungen auch diesbezüglich an Bedeutung erlangen.

7.2 Intrinsische Immunmodulation

Die Immunantwort auf ein Antigen wird maßgeblich von parallel vorkommenden Antigen-unabhängigen Faktoren beeinflusst. Die Gesamtheit dieser Faktoren bildet das sogenannte Mikromillieu, welches aus extrinsischen und intrinsischen Faktoren besteht.

Während im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Immunmodulation durch extrinsische Faktoren untersucht wurde, lag der Fokus des zweiten Teils auf der Immunmodulation durch intrinsische Faktoren. Hierbei wurde der Einfluss der Sexualhormone 17 β -Östradiol und Testosteron und des Adipokins Leptin auf die Immunantwort untersucht.

Immunmodulation durch 17 β -Östradiol, Testosteron und Leptin

Epidemiologisch lassen sich Prävalenzunterschiede in bestimmten Erkrankungen zwischen den Geschlechtern erkennen. Es kann festgestellt werden, dass das weibliche Geschlecht einen unabhängigen Risikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen darstellt, zu denen allergische Erkrankungen vom Soforttyp aber auch Autoimmunerkrankungen gehören [430]. Gemein ist diesen Erkrankungen, dass sie mit einer pathologisch fehlgeleiteten Immunreaktion gegen eigentlich harmlose Antigene einhergehen. Gleichzeitig stehen Frauen in Verbindung mit einer höheren Resistenz als auch einer besseren Prognose für den Verlauf einiger Infektionskrankheiten [135].

Beide epidemiologische Beobachtungen deuten auf eine gesteigerte Immunantwort beim weiblichen Geschlecht hin. Fraglich ist, welche Rolle geschlechtsspezifische Hormone bei dieser Beobachtung spielen. Aufgrund der Präsenz von Östrogen- als auch Androgenrezeptoren auf Zellen des innatens als auch adaptiven Immunsystems ist eine Wirkung von Sexualhormonen auf das Immunsystem und damit eine Beteiligung der Sexualhormone an den Erkrankungsunterschieden zwischen Männern und Frauen wahrscheinlich [127, 137, 163, 177, 178, 202, 205, 302].

Weitere endokrinologische Unterschiede zwischen Männern und Frauen lassen sich bezüglich des Adipokins Leptin feststellen. In Frauen werden neben Östrogenen ebenfalls höhere Mengen des als immunstimulatorisch diskutierten Adipokins Leptin produziert. Leptin ist ein Hormon, welches ebenfalls mit Adipositas-assoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, u. a. mit Asthma. Hierbei wird eine engere Assoziation von Leptin mit Asthma in Frauen als in Männern postuliert [228]. Die Ursachen hierfür sind unklar.

Interessanterweise scheinen die Geschlechtshormone und Leptin in direkter Abhängigkeit zu stehen. 17β -Östradiol induziert die Leptin-Sekretion, während Testosteron selbige hemmt [300]. Die Frage die sich stellt ist, inwieweit die erhöhten Leptin-Konzentrationen in Frauen mitverantwortlich für deren gesteigerte Immunantwort gemacht werden können und ob möglicherweise synergistische Wirkungen zwischen 17β -Östradiol und Leptin bestehen. Diese Frage sollte im zweiten Teil dieser Arbeit beantwortet werden. Dafür wurde der Einfluss der Sexualhormone 17β -Östradiol und Testosteron als auch des Adipokins Leptin alleinig und in Kombination auf Monozyten und T-Zellen untersucht werden.

7.2.1 Immunstimulatorische Wirkung von 17β -Östradiol auf Monozyten

Monozyten sind Zellen des innate Immunsystems, welche in entzündetes Gewebe einwandern können und dort als Makrophagen und Phagozyten eine wichtige Rolle in der Beseitigung infektiöser Organismen einnehmen. Gleichzeitig können sie als APZ Einfluss auf die Induktion der primären sowie sekundären adaptiven Immunantwort nehmen [431]. Damit kommt ihnen ebenfalls Bedeutung in pathologisch fehlgeleiteten Immunantworten zu.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich für Monozyten, welche unter erhöhten 17β -Östradiol-Konzentrationen stimuliert wurden, eine proinflammatorische Zytokinsekretion beobachten. Diese war gekennzeichnet durch höhere Konzentrationen der Zytokine TNF- α und GM-CSF und erniedrigte Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. TNF- α und GM-CSF sind primär immunstimulatorische Zytokine, wichtig in der innate als auch adaptiven Immunantwort. Im Gegensatz dazu ist IL-10 eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine, mit besonderer Bedeutung in der Regulation der Immunantwort als auch in der Toleranzinduktion.

Verbesserte Pathogenkontrolle durch 17β -Östradiol aufgrund einer Induktion von TNF- α

In der innate Immunantwort ist TNF- α ein wichtiger Mediator der akuten Entzündungsreaktion auf Bakterien, Viren und parasitäre Infektionen. Hierbei ist es wichtig für die physiologische Antwort auf Infektionen und Abwehr von Infektionen. Unangemessene unkontrollierte Produktion kann hingegen auch pathologische Folgen haben [432]. Zur akuten Entzündungsreaktion trägt TNF- α bei, indem es Endothelzellen aktiviert, was wiederum mit der

Expression von Adhäsionsmolekülen und Freisetzung von Chemokinen einhergeht. In Folge kommt es zur Antigen-unabhängigen Rekrutierung und Akkumulation verschiedener Populationen von Leukozyten aber auch Plasmaproteinen in entzündetem Gewebe [432].

Deutlich wird die Rolle von TNF- α im therapeutischen Einsatz von TNF- α Blockern. Diese bringen als Nebenwirkung u. a. ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit sich [432].

Eine verstärkte Produktion dieses Zytokins deutet auf eine gesteigerte Immunantwort hin. Diese kann zu einer beschleunigten Klärung und Beseitigung infektiöser Mikroorganismen beitragen. Damit würde die Induktion von TNF- α durch 17 β -Östradiol sowohl einen Erklärungsansatz für die höhere Resistenz des weiblichen Geschlechts als auch die bessere Prognose für den Verlauf bestimmter Infektionskrankheiten liefern. 17 β -Östradiol könnte über TNF- α Induktion zu einer verstärkten Aktivierung der innatens Immunantwort beitragen und somit die Pathogenkontrolle verbessern.

Induktion und Verstärkung fehlgeleiteter Immunantworten durch 17 β -Östradiol aufgrund einer Stimulation der TNF- α -Sekretion

Erhöhte TNF- α Sekretion könnte auch in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder der Immunreaktion auf eigentlich harmlose Antigene eine Rolle spielen. So kann TNF- α auch als kostimulatorischer Ligand in der Antwort naiver T-Zellen auf ihr Antigen eine wichtige Rolle spielen [433]. Zudem stimuliert TNF- α Th17-Zellen, welche als hauptverantwortliche Zellen für chronisch entzündliche Gewebeerstörung in Autoimmunerkrankungen diskutiert werden.[434].

Vergangene Untersuchungen postulieren einen Zusammenhang von TNF- α mit einigen Erkrankungen die mit einer fehlgeleiteten Immunantwort einhergehen. Zu diesen gehören die Rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen als auch Atemwegserkrankungen [432]. Hierbei konnten einige Studien eine Verbesserung der Symptomatik unter Therapie mit TNF- α Blockern zeigen, was für einen kausalen Zusammenhang der Erkrankungen mit TNF- α spricht [432].

Die vorliegende Studie beobachtete eine anteilige Erhöhung von TNF- α durch 17 β -Östradiol und eine höhere Sekretion im Vergleich zu Testosteron. Dies könnte auf einen Einfluss von Östrogenen in der Induktion als auch im weiteren Verlauf pathologisch fehlgeleiteter Immunantworten hindeuten. Zu diesen gehören allergische Erkrankungen als auch Autoimmunerkrankungen. Über TNF- α -Erhöhung könnte 17 β -Östradiol zur Entwicklung als auch Aggravation fehlgeleiteter Immunantworten beitragen.

Gegenseitige Abhängigkeit von 17 β -Östradiol und TNF- α

In der vorliegenden Studie hat sich eine Induktion von TNF- α durch 17 β -Östradiol gezeigt. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass weitere Studien postulierten, dass

inflammatorische Zytokine, unter diesen u. a. TNF- α selbst, wiederum Einfluss auf die Östrogensynthese nehmen können [165].

Proinflammatorische Zytokine, unter diesen TNF- α , erhöhen *in vitro* die Aromataseaktivität [435, 436] und führen somit zu einer verstärkten Bildung von Östrogenen. Hypothetisch könnte angenommen werden, dass diese wiederum die TNF- α Sekretion verstärken, womit eine gegenseitige Abhängigkeit und sich gegenseitig verstärkender Effekt von 17 β -Östradiol und TNF- α möglich wäre.

In vivo können ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Hier kann unter inflammatorischen Bedingungen ein verändertes Verhältnis von Östrogenen zu Androgenen festgestellt werden. Östrogene werden aus Androgenen gebildet, womit mit der Bildung der Östrogene parallel ein Abnahme der Androgene einhergeht. Damit wird das Verhältnis von Östrogenen zu Androgenen zugunsten der Östrogene verändert [165]. In Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte nun festgestellt werden, dass sich in der Synovialflüssigkeit ein höheres Verhältnis von Östrogenen zu Androgenen finden lässt. Dies wurde auf eine erhöhte Aromataseaktivität, von in entzündetem Gewebe lokalisierter Makrophagen, zurückgeführt [165]. Die Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis stellt ein entzündetes Gewebe dar, indem sich höhere Konzentrationen inflammatorischer Zytokine befinden. Es wird angenommen, dass diese zu einer erhöhten Aromataseexpression führen, welche wiederum die erhöhten Östrogenkonzentrationen bedingen. Der Grund hierfür ist bislang unklar.

Proinflammatorische Wirkung von 17 β -Östradiol

Die Beobachtung, dass inflammatorische Zytokine zu einer Verstärkung der Östrogensynthese führen, deutet auf eine proinflammatorische Wirkung von Östrogenen hin. Diese könnte sowohl in pathologischen als auch physiologischen Immunantworten zum Tragen kommen und einen Erklärungsansatz für die gesteigerte Immunantwort in Frauen sein. Möglicherweise bilden Östrogene auch einen Teil der innatens Zytokin/Immunkaskade, indem sie unter inflammatorischen Bedingungen immunstimulatorische Wirkungen entfalten.

Studien zu Östrogenen und TNF- α Produktion in Monozyten

Vergangene Studien zum Einfluss von Östrogenen auf die TNF- α Produktion von Monozyten sind widersprüchlich.

Einige Studien beschreiben keinen Einfluss von 17 β -Östradiol auf die TNF- α Produktion in stimulierten Monozyten. Andere wiederum postulieren einen Anstieg von TNF- α mRNA in stimulierten Monozyten durch 17 β -Östradiol in physiologischen Konzentrationen und eine Abnahme in superphysiologischen Konzentrationen [164].

Dies steht im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, die eine Zunahme von TNF- α in superphysiologischen Konzentrationen zeigte. Einige *in vivo* Daten deuten hingegen ebenfalls auf

einen stimulierenden Effekt weiblicher Hormone auf die TNF- α Produktion hin. So können höhere TNF- α Konzentrationen während der lutealen im Vergleich zur folliculären Phase beobachtet werden, in der im Durchschnitt höhere Östrogenkonzentrationen bestehen [164]. Widersprüchlich hierzu wiederum Studien die höhere TNF- α Spiegel in Menopausalen Frauen postulieren, sowie keinen Einfluss von Hormonersatztherapie oder der Einnahme oraler Kontrazeptiva auf die TNF- α Spiegel beobachten [164]. Dies wiederum deutet auf keinen Einfluss von Östrogenen auf die TNF- α Konzentration hin.

Die widersprüchliche Datenlage zur TNF- α Produktion und die auch in dieser Studie nur tendenziell ausgeprägten Effekte deuten auf einen vergleichsweise schwachen Effekt von 17 β -Östradiol auf die TNF- α Sekretion hin. Hingegen ist es dennoch wahrscheinlich, dass die parallel erniedrigten IL-10 Konzentrationen unter 17 β -Östradiol Stimulation zu einer verstärkten Ausprägung des TNF- α Effektes beitragen könnten. Deutlich wird dieser Zusammenhang bei Betrachtung des Zytokinprofils der Monozyten, welches eine deutliche Erhöhung des TNF- α Anteils zeigte.

Fazit TNF- α :

Verstärkung physiologischer aber auch pathologischer fehlgeleiteter Immunantworten durch 17 β -Östradiol aufgrund einer Induktion von TNF- α

17 β -Östradiol zeigt eine tendenzielle Erhöhung der TNF- α Sekretion und erhöht TNF- α deutlich im Zytokinprofil. Die mit einer Erhöhung von TNF- α verbundenen Wirkungen, u. a. die erhöhte Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen, könnten einen Erklärungsansatz für den verbesserten Verlauf einiger infektiöser Krankheitsbilder beim weiblichen Geschlecht liefern. Gleichzeitig könnte die TNF- α Induktion über stimulatorische Wirkung auf das adaptive Immunsystem ebenfalls mitbeteiligt an der erhöhten Prävalenz einiger pathologisch fehlgeleiteter Immunantworten bei Frauen sein.

Verbesserte Pathogenkontrolle durch 17 β -Östradiol aufgrund einer Induktion von GM-CSF

Die deutlichste Wirkung von 17 β -Östradiol konnte in der vorliegenden Studie auf das Zytokin GM-CSF beobachtet werden. Eine Stimulation unter 17 β -Östradiol Inkubation führte zu einer signifikant erhöhten GM-CSF-Sekretion in Monozyten.

GM-CSF ist ein Zytokin, welches die Reifung sowie Aktivierung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen stimuliert [437]. Somit kann es die Phagozytoseaktivität erhöhen und nimmt folglich eine wichtige Rolle in der Beseitigung infektiöser Organismen ein (Abb. 41).

Studien mit GM-CSF defizienten Mäusen zeigen, dass GM-CSF wichtig für die Erhaltung der normalen Zahl hematopoetischer Stammzellen und ihrer Vorläufer in Blut, Mark und Milz und folglich die Resistenz lokaler Infektionen ist [437] (Abb. 41). Ebenfalls konnte

festgestellt werden, dass die Administration von Anti-GM-CSF Antikörpern die protektive Immunantwort auf *Histoplasma Capsulatum* reduzierte, was ebenfalls für eine kritische Rolle von GM-CSF in der Immunabwehr spricht [438]. Systemische Administration in humanen Probanden erhöht die Phagozytoseaktivität von Granulozyten sowie die Zytotoxizität von Monozyten [438].

Es kann angenommen werden, dass eine erhöhte Sekretion dieses Zytokins eine stärkere innate Immunantwort induziert und somit zur verstärkten und beschleunigten Klärung von Infektionen beiträgt.

In der vorliegenden Studie konnte eine Induktion von GM-CSF durch 17 β -Östradiol sowie tendenzielle Hemmung durch Testosteron beobachtet werden. Dies könnte auf die Induktion einer verstärkten innaten Immunantwort durch 17 β -Östradiol und eine immunsuppressive Wirkung von Testosteron auf die innate Immunantwort hindeuten. Dabei könnte Testosteron im Falle einer Infektion zu einer verzögerten Klärung über verminderte Aktivierung von Granulozyten führen. Die konträre Wirkung beider Hormone könnte ebenfalls einen Erklärungsansatz für die verbesserte Prognose von Frauen in einigen Infektionserkrankungen liefern.

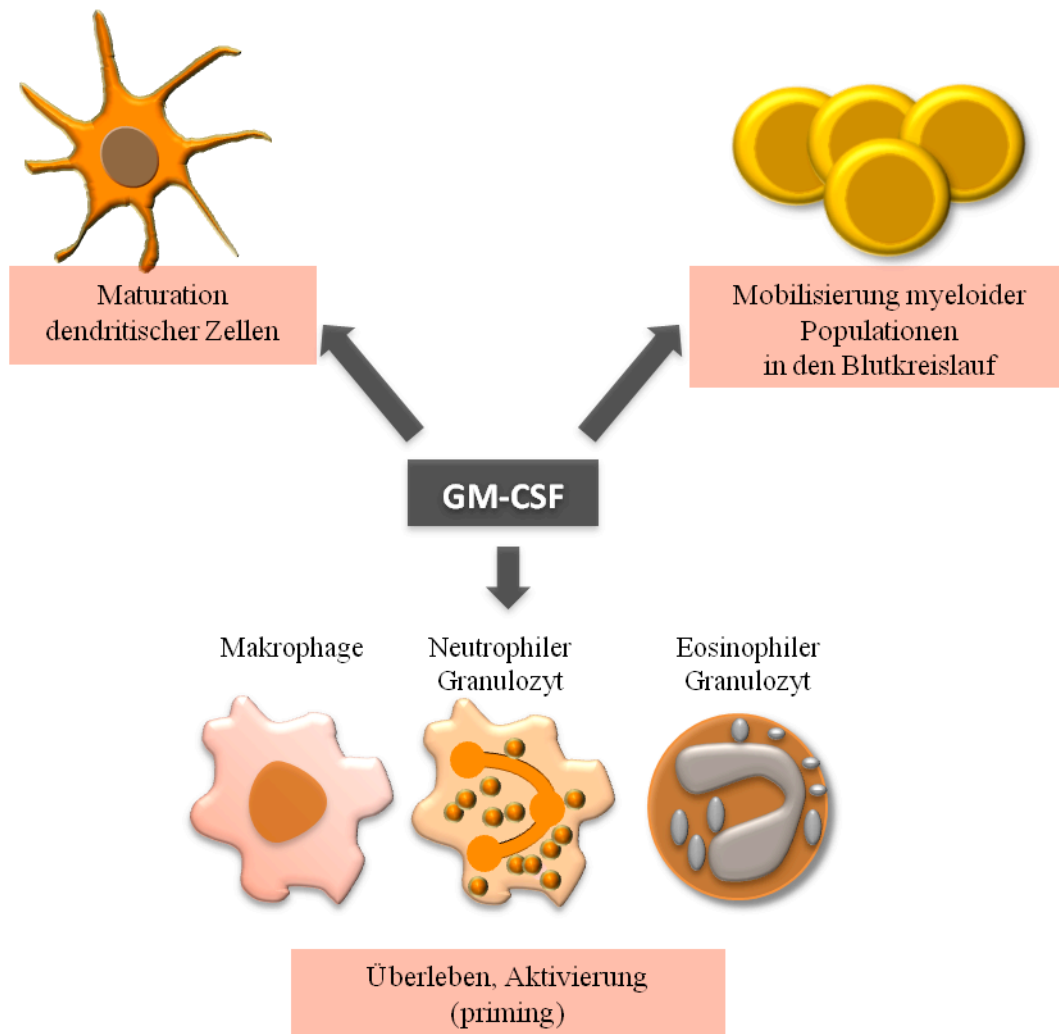


Abb. 41: Wirkung von GM-CSF auf das innate Immunsystem [modifiziert; basierend auf [437]]

Erhöhtes Risiko fehlgeleiteter Immunantworten durch 17 β -Östradiol aufgrund einer Induktion von GM-CSF

GM-CSF ist ein Zytokin welches nicht nur die innate Immunantwort stimuliert, gleichzeitig ist es eine wichtige Verbindung zwischen innater und adaptiver Immunantwort. Hierbei ist es essentiell für die Maturation von dendritischen Zellen (Abb. 41), welche die effektivsten Stimulatoren für naive T-Zellen sind, somit die effektivsten Stimulatoren für die Induktion einer primären adaptiven Immunantwort [439]. Verstärkte Aktivierung dendritischer Zellen könnte ebenfalls das Risiko einer Immunantwort auf eigentlich harmlose körperfremde oder körpereigene Antigene erhöhen [440].

Zudem zeigt GM-CSF auch auf T-Zellen, als Zellen der adaptiven Immunantwort, direkte Wirkung, wobei ebenfalls ein stimulierender Effekt postuliert wurde [441].

In Patienten mit Rheumatoider Arthritis führt GM-CSF Gabe zu einer Verschlimmerung der Symptomatik [438].

Studien in GM-CSF defizienten Mäusen deuten dabei auf einen stimulierenden Effekt von GM-CSF auf sowohl Th1- als auch Th2-Zellen hin [442]. Somit hätte GM-CSF das Potential bestehende Immunantworten, sowohl Th1- als auch Th2-gewichtet zu aggravierem, somit alle Formen allergischer Erkrankungen als auch Autoimmunerkrankungen. Parallel wäre hingegen auch die adaptive Immunabwehr auf infektiöse Organismen erhöht und möglicherweise der Verlauf von Infektionskrankheiten verbessert.

Eine Erhöhung von GM-CSF durch 17 β -Östradiol könnte über Wirkung auf die innate als auch adaptive Immunantwort somit mitbeteiligt an der verbesserten Prognose von Frauen in Infektionskrankheiten sein, parallel könnte es hingegen auch fehlgeleitete Immunantworten begünstigen und pathologische Zustände verschlimmern.

Zusammenhang hoher GM-CSF Konzentrationen mit pathologischen Immunitäten

Erhöhte GM-CSF Konzentrationen werden in der Haut allergischer Patienten mit kutanen Reaktionen und in der Lunge von Asthmatikern gefunden. Gleichzeitig enthält auch die arthritische Synovialflüssigkeit messbare Konzentrationen von GM-CSF, welche u. a. mitverantwortlich für Gelenks- und Knochenzerstörung gemacht werden. Weitere Studien postulieren, dass eine Überexpression von GM-CSF pathologische Veränderungen nach sich zieht. Hierzu gehört, je nach Gewebe der Überexpression und Stimulationsansatz, eine Makrophagenakkumulation, Gewebeerstörung sowie die Entwicklung einer autoimmunen Gastritis [441]. Gleichzeitig wird GM-CSF eine zentrale Rolle in der Sensibilisierung auf Aeroallergene in verunreinigter Luft zugeschrieben. So führte ein adenoviral-mediierter GM-CSF Gen-Transfer in die Lunge zu einer Lungeneosinophilie, einer Makrophagenexpansion sowie fibrotischen Veränderungen [443-445]. Ebenfalls wurde festgestellt, dass ein adenoviral-basierter Gentransfer der GM-CSF Expression einen transienten Anstieg von IL-4 und IL-5 sowie eine eosinophile Entzündungsantwort in der Lunge vermittelt [446]. Zudem werden auch Asthmaerkrankungen mit GM-CSF Polymorphismen in Verbindung gebracht [447].

Diese Beobachtungen geben Hinweis auf eine bedeutende Rolle von GM-CSF unter pathologischen Zuständen. Die Erhöhung von GM-CSF durch 17 β -Östradiol könnte damit einen Erklärungsansatz für die erhöhte Prävalenz als auch Symptomatik von Frauen in einigen allergischen - als auch Autoimmunerkrankungen sein.

Entwicklung pathogener Th17-Zellen durch 17 β -Östradiol über Induktion von GM-CSF

Neben der Verstärkung Th1- als auch Th2-spezifischer Antworten wird gleichzeitig eine essentielle Rolle von GM-CSF in der Differenzierung pathologischer Th17-Zellen und der Entwicklung autoimmuner inflammatorischer Erkrankungen diskutiert [448].

Nachdem zunächst Th1-Zellen im Fokus als hauptverantwortlicher T-Helferzelltyp für Autoimmunerkrankungen standen, veränderten spätere Studien dieses Bild. Nachdem IFN- γ oder

IL-12 defiziente Mäuse eine normalen oder gar exazerbierte Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zeigten, wohingegen IL-23 und IL-17 defiziente Mäuse immun gegen die Induktion bestimmter Autoimmunerkrankungen waren, rückten Th17-Zellen in den Fokus der Autoimmunerkrankungen. Hierbei zeigen nicht alle Th17-Zellen gleiche Pathogenität und bestimmte Zytokinsekretionsmuster konnten mit einer eher regulatorischen Funktion oder aber verstärkter Pathogenität in Verbindung gebracht werden (Abb. 44).

Eine u. a. hohe Sekretion von GM-CSF und niedrige IL-17 Sekretion wurden dabei mit verstärkter Pathogenität in Verbindung gebracht. Sonderegger et. al konnten zeigen, dass unter anderem innates GM-CSF entscheidend für die Induktion pathogener Th17-Zellen ist [448]. Innates GM-CSF unterstützte dabei die IL-6 und IL-23 Antwort dendritischer Zellen, was entscheidend für die Differenzierung pathologischer Th17-Zellen *in vivo* ist (Abb. 42) [448].

17 β -Östradiol könnte somit durch die Induktion von GM-CSF in innaten Zellen ein Risikofaktor für die Entwicklung pathogener Th17-Zellen sein und somit die Entwicklung autoimmuner Prozesse fördern. Über diesen Mechanismus könnte 17 β -Östradiol damit mitbeteiligt an der erhöhten Prävalenz autoimmuner Erkrankungen im weiblichen Geschlecht sein.

Fazit GM-CSF:

Verstärkung physiologisch aber auch pathologisch fehlgeleiteter Immunantworten durch 17 β -Östradiol aufgrund einer Induktion von GM-CSF

GM-CSF ist in der Lage Th1-, Th2- und ebenfalls Th17-Antworten zu verstärken sowie pathologische Th17-Zellen zu induzieren.

Erhöhte Konzentrationen wie sie unter 17 β -Östradiol Inkubationen beobachtet werden konnten, könnten somit protektive Wirkung in physiologischen Immunantworten auf infektiöse Organismen haben, bergen hingegen ebenso ein höheres Risiko für pathologische Immunantworten über verstärkte Th1-, Th2- und Th17-Aktivierung.

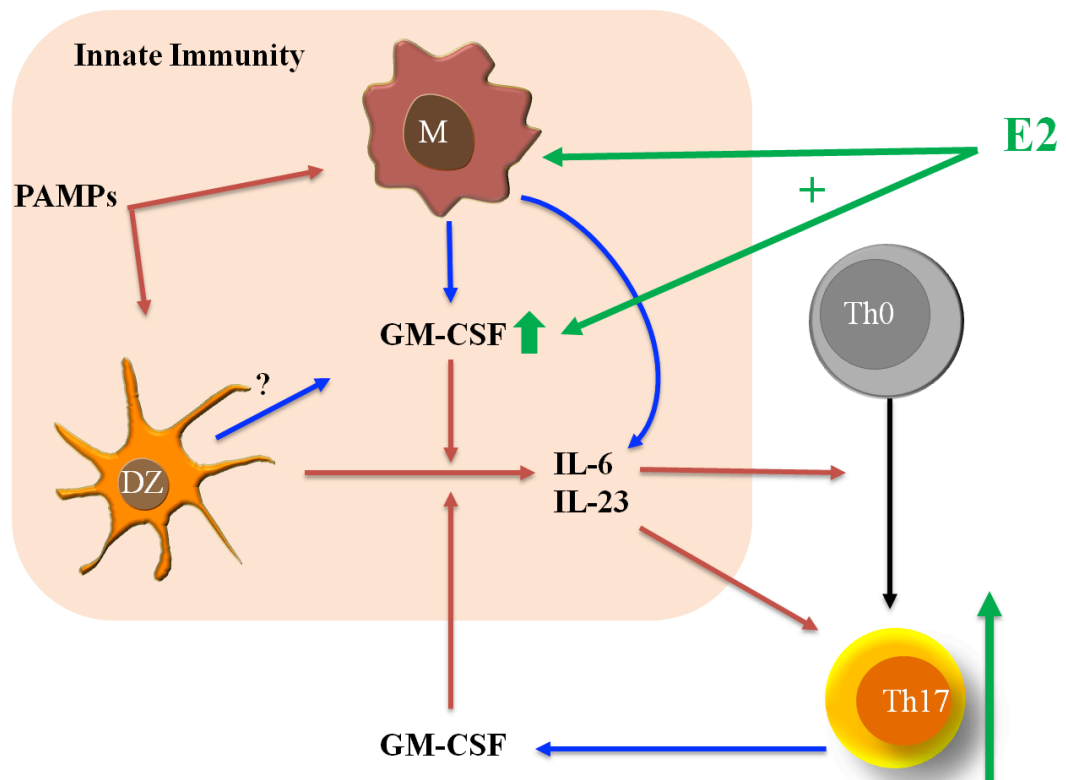


Abb.42: Modell der GM-CSF mediierten Autoimmunität mit möglicher Beteiligung von 17β-Östradiol [modifiziert; basierend auf [448]]

Verstärkung der Immunantwort durch 17β-Östradiol über Hemmung von IL-10

Neben der Induktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und GM-CSF durch 17β-Östradiol ließ sich eine konträre Wirkung auf IL-10 feststellen. Monozyten unter 17β-Östradiol-Stimulation zeigten eine verminderte Sekretion von IL-10.

IL-10 ist eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine und kann als solches sowohl auf die innate als auch adaptive Immunantwort suppressive Wirkungen ausüben [449]. Damit ist es von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Immunantwort sowie die Erhaltung der Immuntoleranz.

In der innate Immunabwehr hemmt IL-10 die Funktion aktivierter Makrophagen und dendritischer Zellen, indem es sowohl deren Zytokinsekretion, die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle als auch die Expression des MHC-II selbst hemmt [450].

Niedrigere IL-10 Konzentrationen, wie sie bei der 17β-Östradiol Inkubation im Vergleich zur Testosteron Inkubation zu beobachten waren, deuten somit aufgrund verminderter hemmender Mechanismen, in der innate Immunantwort eine verstärkte Phagozytoseaktivität an. Längerfristig erniedrigte IL-10 Konzentrationen führen möglicherweise, über verminderte antiinflammatorische Wirkungen, zur weiteren Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, welche zur weiteren Rekrutierung und Aktivierung innatere Immunzellen beitragen könnten.

Verminderte Toleranzmechanismen und verbesserte Pathogenkontrolle durch 17 β -Östradiol über Hemmung von IL-10 und Wirkung auf die adaptive Immunantwort

Erniedrigte IL-10 Konzentrationen können über eine erhöhte Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle, als auch des MHC-II, zu einer verstärkten Induktion der primären als auch sekundären adaptiven Immunabwehr beitragen. Dies kann ebenfalls die Entstehung fehlgeleiteter Immunantworten gegen eigentlich harmlose exogene oder endogene Antigene begünstigen oder bestehende Antworten verstärken. Ebenso könnte die Pathogenkontrolle durch eine verstärkte Aktivierung der adaptiven Immunantwort verbessert werden. Weiter kann IL-10 in dendritischen Zellen die Chemokin Produktion, sowie ihre Fähigkeit zur Migration in den Lymphknoten hemmen. Die Folge kann eine ausbleibende Differenzierung naiver T-Zellen sowie Rekrutierung von Effektor T-Zellen sein [450].

Eine verminderte IL-10 Sekretion kann somit zu einer verbesserten Pathogenkontrolle über eine verminderte Hemmung der innate als auch adaptiven Immunabwehr beitragen. Gleichzeitig hat IL-10 entscheidende Bedeutung bei der Erhaltung der Immuntoleranz, womit erniedrigte IL-10 Konzentrationen ebenfalls ein höheres Risiko für den Verlust der Immuntoleranz gegen eigentlich harmlose oder körpereigene Antigene mit sich bringen.

Die Bedeutung von IL-10 für Autoimmunerkrankungen wird in genetischen Studien deutlich. So konnte in genetischen Kopplungsanalysen eine Assoziation mit Polymorphismen in der für IL-10 codierenden Region mit den Autoimmunerkrankungen des Systemischen Lupus Erythematoses, des Typ 1 Diabetes oder des Reizdarmsyndromes gefunden werden [451].

Zudem könnten verminderte IL-10 Konzentrationen über eine verstärkte Aktivierung bereits aktivierter autoimmuner Effektorzellen ebenfalls zu einer verstärkten Immunpathologie bei bereits bestehenden Erkrankungen beitragen.

Verminderte Hemmung von T-Zellen durch 17 β -Östradiol aufgrund verminderter IL-10 Sekretion

Neben einer antiinflammatorischen Wirkung auf Zellen des innate Immunsystems kann IL-10 auch direkt auf T-Zellen wirken. Hier wirkt es ebenfalls antiinflammatorisch und kann die Proliferation sowie die Produktion der Zytokine IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 und TNF- α hemmen [450]. IL-10 kann somit innate als auch adaptive Th1-, Th2- und Th17-Antworten regulieren, indem es die T-Zelldifferenzierung und Aktivierung in den Lymphknoten hemmt und proinflammatorische Antworten in den Geweben unterdrückt [450]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sowohl IL-17⁺ als auch IL-17⁺IFN γ ⁺ T-Zellen höhere Level von IL-10Ra als IFN- γ ⁺ T-Zellen exprimieren und somit deren Proliferation vorzugsweise von IL-10 unterdrückt wird. [452]. Aus diesem Grund sind Th17-Zellen besonders empfänglich für die IL-10 Hemmung. So konnte gezeigt werden, dass Tr1-Zellen, welche charakteristi-

scher Weise hohe Mengen IL-10 produzieren, Th17-Zellen besonders gut hemmen [452]. IL-10 kann somit auf unterschiedlichsten Ebenen immunsuppressive Wirkungen ausüben. Es kann die innate sowie die Induktion der adaptiven Immunantwort unterdrücken als auch die Effektorantwort der adaptiven Immunabwehr supprimieren. Erniedrigte IL-10 Konzentrationen durch 17 β -Östradiol könnten somit zu einer proinflammatorischen Immunitätslage führen und zum einen die Pathogenkontrolle verbessern, zum anderen hingegen auch fehlgeleitete Immunantworten begünstigen.

Studien zu 17 β -Östradiol und IL-10 Produktion in Monozyten

Vergangene Studien zu 17 β -Östradiol und IL-10 zeigten eine Induktion der IL-10 Sekretion in humanen Monozyten [176], was im Gegensatz zu dieser Studie steht. Die verwendeten 17 β -Östradiol Konzentrationen entsprechender Studie lagen mit 10^{-10} M – 10^{-8} M hingegen deutlich unter denen der vorliegenden Studie. Studien in einer Makrophagen ähnlichen Zelllinie in den Konzentrationen 10^{-8} – 10^{-6} M konnten ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die IL-10 Sekretion feststellen. Andere Studien wiederum postulierten keinen Einfluss von 17 β -Östradiol auf die IL-10 Sekretion [176].

Ursachen für kontroverse Effekte von 17 β -Östradiol auf verschiedene Immunzellen könnten unterschiedliche Wirkungen von 17 β -Östradiol in Abhängigkeit der Konzentration, Expositionsdauer (Kurzzeit-, Langzeitexposition) sowie Rezeptorexpression sein [176].

Möglicher Zusammenhang hoher 17 β -Östradiol Konzentrationen mit proinflammatorischen Bedingungen

Die vorliegende Studie zeigte eine Hemmung der IL-10 Sekretion durch 17 β -Östradiol in pharmakologischen Konzentrationen in Monozyten.

Wie bereits beschrieben erhöhen proinflammatorische Zytokine die Expression des Enzyms Aromatase, welches verantwortlich für die Konvertierung von Androgenen zu Östrogenen ist. Es könnte angenommen werden, dass hohe 17 β -Östradiol Konzentrationen im Zusammenhang mit einer proinflammatorischen, möglicherweise lokalen Immunreaktion stehen. In diesem Falle könnte 17 β -Östradiol eine spezifische lokale immunstimulatorische Wirkung durch Hemmung der IL-10 Sekretion entfalten.

Fazit IL-10:

Verbesserte Pathogenkontrolle sowie Begünstigung fehlgeleiteter Immunantworten durch 17 β -Östradiol über Hemmung von IL-10

Erniedrigte IL-10 Konzentrationen können somit zum einen zu einer gesteigerten innate Immunabwehr beitragen, zum anderen können sie über APZ sowie die Induktion eines proin-

flammatorischen Zytokinmilieus ebenfalls eine gesteigerte adaptive Immunabwehr zur Folge haben.

Damit könnten durch 17 β -Östradiol erniedrigte IL-10 Konzentrationen sowohl an der verbesserten Klärung von Infektionen als auch höheren Prävalenz allergischer Erkrankungen beteiligt sein. Gleichzeitig kann IL-10 auch direkten Einfluss auf die adaptive Immunität und damit physiologische sowie spezifisch fehlgeleitete Immunantworten nehmen.

Fazit TNF- α , GM-CSF, IL-10:

Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils durch 17 β -Östradiol — Verstärkung von physiologischen Immunantworten aber auch pathologischer Zustände

In der Gesamtheit induziert 17 β -Östradiol in Monozyten über die Stimulation der TNF- α und GM-CSF Sekretion mit paralleler Hemmung der IL-10 Sekretion ein proinflammatorisches Zytokinprofil. Dieses könnte durch eine verstärkte Rekrutierung und Aktivierung von innatem Immunzellen zu einer gesteigerten innatem Immunantwort führen und somit ein Erklärungsansatz für die bessere Prognose des weiblichen Geschlechts bei einigen Infektionskrankheiten sein.

Gleichzeitig kann die innatem Immunantwort Einfluss auf das adaptive Immunsystem nehmen. Eine gesteigerte innatem Immunantwort kann zu einer gesteigerten adaptiven Immunantwort beitragen und so ebenfalls zu einer verbesserten Klärung von Infektionen beitragen. Eine gesteigerte Immunantwort kann hingegen ebenfalls zum Verlust der Toleranz gegen eigentlich harmlose körperfremde oder körpereigene Antigene führen. Auch können bereits bestehende pathologische Zustände aggraviert werden. Die Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils durch 17 β -Östradiol kann damit auch das Risiko für die Entstehung fehlgeleiteter Immunantworten, allergischer Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen, erhöhen.

Begünstigung allergischer Erkrankungen durch 17 β -Östradiol aufgrund der Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils in Monozyten (APZ)

Die Rolle von APZ in Autoimmunerkrankungen wird deutlich in der Beobachtung, dass einige Autoimmunerkrankungen genetisch mit dem MHC/HLA Locus in Verbindung stehen. Als ursächlich diskutiert für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, ist die Aktivierung von APZ in einem Maß, welches regulatorische Mechanismen außer Kraft setzt und somit zum Verlust der Selbsttoleranz führt. Eine verstärkte Aktivierung von APZ, wie sie bei 17 β -Östradiol Inkubation beobachtet werden konnte, erhöht somit ebenfalls das Risiko für eine Immunantwort gegen sowohl harmlose körperfremde als auch körpereigene Antigene. Ob ein Antigen ein Immunogen oder ein Tolerogen ist, hängt von den Bedingungen ab unter denen es dem spezifischen Lymphozyt präsentiert wird, u. a. unter inflammatorischen oder antiinflammatorischen Bedingungen [453]. Eine Präsentation unter verstärkter Expression

Kostimulatorischer Moleküle, niedrigeren IL-10 Konzentrationen sowie erhöhter Konzentrationen der immunstimulatorischen Zytokine GM-CSF und TNF- α könnte zum Verlust der Immuntoleranz beitragen und einen Erklärungsansatz für die erhöhte Prävalenz des weiblichen Geschlechts in allen vier Typen allergischer Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen liefern.

7.2.2 Synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin in Monozyten

Aufgrund der Beobachtung, dass 17 β -Östradiol Leptin induziert und beide Hormone als immunstimulatorische Hormone diskutiert werden, stellt sich die Frage, ob 17 β -Östradiol und Leptin synergistische Wirkungen auf Zellen des innate oder adaptiven Immunsystems entfalten.

Einen Hinweis darauf geben Asthmastudien. Hier werden erhöhte Leptin-Konzentrationen als Risikofaktor für die Entstehung von Asthma diskutiert [454]. Interessanterweise wird eine stärkere Assoziation von Leptin und Asthma bei Frauen beobachtet [228]. Möglich wäre, dass synergistische Effekte von 17 β -Östradiol und Leptin auf Immunzellen die Beobachtung der engeren Assoziation von Übergewicht und Asthma im weiblichen Geschlecht erklären.

Signifikant synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin auf die GM-CSF-Sekretion

In der vorliegenden Studie ließ sich für die Koinkubation von 17 β -Östradiol mit Leptin eine Verstärkung der GM-CSF-Sekretion beobachten. Hierbei lag die GM-CSF Konzentration der Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin signifikant über der alleinigen 17 β -Östradiol Inkubation. Es kann angenommen werden, dass es sich bei diesem Effekt um einen synergistischen Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin handelt, da Leptin alleinigen keinen Effekt auf die Zytokinsekretion hatte.

Für die Koinkubation von Testosteron mit Leptin konnte ebenfalls eine Steigerung der GM-CSF-Sekretion festgestellt werden. Testosteron alleinigen hemmte hingegen die GM-CSF-Sekretion, womit die Koinkubation in der Aufhebung des hemmenden Testosteroneffektes resultierte. Die Koinkubation zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle. Leptin antagonisierte somit den antiinflammatorischen Effekt von Testosteron auf die GM-CSF-Sekretion. Da Testosteron *in vivo* hingegen gleichzeitig die Leptin-Sekretion hemmt, könnte angenommen werden, dass der antiinflammatorische Effekt von Testosteron über eine gleichzeitige Hemmung der Leptin- und GM-CSF-Sekretion vermittelt wird. Testosteron würde *in vivo* somit über Hemmung von sowohl GM-CSF als auch Leptin immunsuppressiv wirken.

Synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin auf die TNF- α -Sekretion

Für TNF- α zeigten sich unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin, im Vergleich zur Koinkubation mit Testosteron und Leptin, auf dem 10% Signifikanzniveau ($p=0,078$) höhere TNF- α -Konzentrationen. Bereits die alleinigen 17 β -Östradiol- und Testosteron-Inkubationen zeigten einen ähnlichen Trend, hingegen war die Signifikanz geringer ausgeprägt. Dies wiederum deutet auf synergistische Effekte der Sexualhormone mit Leptin hin. Leptin alleinig zeigte keinen Effekt auf die TNF- α Sekretion.

Synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin auf die IL-10-Hemmung

Leptin alleinig zeigte keinen Effekt auf die IL-10 Sekretion. Unter Koinkubation mit 17 β -Östradiol verstärkte Leptin hingegen die 17 β -Östradiol-induzierte IL-10 Hemmung. Leptin entwickelte somit synergistische Wirkungen mit 17 β -Östradiol. Dahingegen zeigte die Koinkubation von Testosteron und Leptin keinen Unterschied zu alleiniger Testosteron Inkubation.

Deutlich wurde die synergistische Wirkung von Leptin und 17 β -Östradiol besonders bei Betrachtung des Zytokinprofils. Vergleicht man das Zytokinprofil der alleinigen 17 β -Östradiol mit der Koinkubation zeigen sich höhere GM-CSF, niedrigere IL-10 und höhere TNF- α Konzentrationen unter Koinkubation. Somit kann angenommen werden, dass ein enger immunologischer Zusammenhang zwischen 17 β -Östradiol und Leptin besteht. 17 β -Östradiol induziert ein proinflammatorisches Zytokinprofil und Leptin verstärkt diesen Effekt.

Synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin — mitverantwortlich für unterschiedliche Immunantworten zwischen den Geschlechtern

Wie bereits ausgeführt, begünstigt das von 17 β -Östradiol induzierte Zytokinprofil mit hohen GM-CSF- und TNF- α -Konzentrationen und niedrigen IL-10 Konzentrationen sowohl die erfolgreiche Klärung von Infektionen als auch die Entwicklung von fehlgeleiteten Immunantworten. Leptin führt zu einer Verstärkung des 17 β -Östradiol-Effektes, womit die durch 17 β -Östradiol induzierten Immunantworten ebenfalls verstärkt werden. Es kann angenommen, dass ein immunologischer Zusammenhang zwischen den beiden Hormonen besteht. Damit besteht die Möglichkeit, dass die hohen Leptin-Konzentrationen bei Frauen ein weiterer Faktor sind, welcher an den Prävalenzunterschieden in bestimmten Erkrankungen zwischen den Geschlechtern beteiligt ist.

17 β -Östradiol und Leptin als Teil der innate Immunantwort

Möglich ist zudem, dass sowohl 17 β -Östradiol als auch Leptin Teil eines Regelkreislaufes der innate Immunantwort sind. Bekannt ist das proinflammatorische Zytokine wie TNF- α die Aromatase-Expression, gleichzeitig aber auch die Leptin-Sekretion stimulieren.

Eine erhöhte Aromataseaktivität führt zu höheren Konzentrationen von Östrogenen, welche wiederum die Leptin-Sekretion stimulieren. 17 β -Östradiol und Leptin wiederum führen zu einer verstärkten Sekretion proinflammatorischer Zytokine und erniedrigten Konzentrationen antiinflammatorischer Zytokine in Monozyten. Somit werden 17 β -Östradiol und Leptin von einer proinflammatorischen Immunantwort induziert und führen in Folge zu einer Verstärkung der proinflammatorischen Immunantwort.

Leptinwirkung

Außer auf IL-6 konnten in der vorliegenden Studie keine Wirkung von Leptin auf das Zytokinprofil von Monozyten beobachtet werden. Dies steht im Widerspruch zu vergangenen Studien die Leptin als inflammatorisches Zytokin mit Induktion proinflammatorischer Zytokine beschreiben [122, 124, 125, 455]. In der vorliegenden Studie konnte außer auf IL-6 kein Effekt auf GM-CSF, TNF- α oder IL-10 durch Leptin in Abwesenheit von 17 β -Östradiol beobachtet werden.

Abhängigkeit der Leptin-induzierten TNF- α -Sekretion von 17 β -Östradiol

Dies steht im Gegensatz zu der Studie von Kiguchi et al. (2009), welche eine Induktion von TNF- α durch Leptin beobachten konnte [455]. In dieser Studie hingegen, wurde im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, welche mit hormonreduziertem Medium arbeitete, normales Kulturmedium versetzt mit FCS verwendet. Damit befinden sich auch Sexualhormone im Medium. Zudem hat Phenolrot, welches in den meisten Medien verwendet wird, Östrogen-ähnliche Wirkung. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Leptin zugeschriebenen Effekt, um synergistische Effekte von Östrogen und Leptin handelt und keinen alleinigen Leptin-Effekt. Möglicherweise ist die Leptin-induzierte TNF- α -Erhöhung 17 β -Östradiol abhängig.

Keine Abhängigkeit der Leptin-induzierter IL-6-Sekretion von 17 β -Östradiol

Eine IL-6 Induktion wurde in der Studie von Kiguchi et al. (2009) entsprechend unserer Studie ebenfalls beschrieben [455]. Aufgrund der vorliegenden Studie kann angenommen werden, dass es sich bei diesem Effekt, um einen 17 β -Östradiol unabhängigen Effekt handelt. Durch Koinkubation mit den Sexualhormonen in pharmakologischen Konzentrationen war dieser Effekt hingegen wieder gehemmt.

Es könnte angenommen werden, dass das Verhältnis von Östrogenen und Leptin für einen Effekt sowie den Ausgang einer Immunantwort ausschlaggebend ist. Möglicherweise wird davon auch die adaptive Immunantwort beeinflusst, unter Umständen durch die Induktion eines bestimmten T- Helferzelltyp-favorisierenden Zytokinprofils.

Rolle von Leptin an epithelialen Barrieren

Leptin wird primär von Adipozyten sezerniert, von denen sich 65% subkutan befinden. Das einzige durch Leptin in der vorliegenden Studie induzierte Zytokin war IL-6. Dieses spielt wiederum eine wichtige Rolle in der Induktion von Th17- aber auch Th22-Zellen, welche eine wichtige Rolle in der Immunabwehr an epithelialen Barrieren einnehmen. Möglicherweise ist subkutan, auf inflammatorische Reize produziertes Leptin, auch an der Steuerung der Immunantwort, beispielsweise der Induktion von Th17- oder Th22- Zellen beteiligt.

Auch die Aromatase kann in peripheren Geweben u. a. Hautfibroblasten [456] und wie bereits beschrieben in Immunzellen (Makrophagen), exprimiert werden. Bekannt ist, dass das Immunsystem je nach Menge des Antigens aber auch je nach Lokalisation präferiert eine Immunantwort induziert. Es wäre zu hypothetisieren, dass Leptin und Östrogen ebenfalls an der Steuerung der Immunantwort an bestimmten Lokalisationen des Körpers beteiligt sind.

Rolle von Leptin im Immunsystem

Das Leptin eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr hat, deuten Studien an, die zeigen konnten, dass eine reduzierte Leptin-Produktion mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen in Zusammenhang steht [125]. Zum Anderen konnte gezeigt werden, dass wiederum Infektionen oder Entzündungen selbst ebenfalls mit einer veränderten, erhöhten Leptin-Sekretion in Verbindung stehen [276, 457]. Dies deutet ebenfalls auf Leptin als Teil der Zytokinkaskade hin, die die Immunabwehr steuert [271]. Zudem wurde postuliert, dass auch immunvermittelte Erkrankungen u. a. Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang mit einer erhöhten Sekretion von Leptin stehen [125].

Fazit: Gesteigertes proinflammatorisches Zytokinprofil durch synergistische Effekte von 17 β -Östradiol und Leptin

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hindeuten, dass 17 β -Östradiol und Leptin synergistische Effekte auf Monozyten haben. Hierbei verstärkt Leptin, dass durch 17 β -Östradiol induzierte proinflammatorische Zytokinprofil. Da das weibliche Geschlecht sowohl durch höhere Konzentrationen von 17 β -Östradiol als auch Leptin gekennzeichnet ist, könnte dies ein weiterer Faktor sein, der an den Prävalenzunterschieden bestimmter Erkrankungen zwischen den Geschlechtern beteiligt ist. Gleichzeitig

könnte dieser Synergismus an der stärkeren Assoziation von Asthma und Leptin im weiblichen Geschlecht mitwirken.

7.2.3 Verändertes Zytokinprofil in naiven T-Zellen durch 17 β -Östradiol und Testosteron

Neben Monozyten wurde ebenfalls der Einfluss von Sexualhormonen auf naive T-Zellen untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, inwieweit die Hormone 17 β -Östradiol und Testosteron beteiligt an der Induktion der Immunantwort und der Polarisierung zu bestimmten T-Helferzellsubtypen sind. CD4⁺ T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems, wobei naive T-Zellen von Effektor- und memory T-Zellen unterschieden werden. Naive T-Zellen können noch keiner T-Zellsubpopulation zugeordnet werden. Parallele Signale während der Aktivierung entscheiden über die sich differenzierende Subpopulation.

Erhöhte GM-CSF Sekretion durch 17 β -Östradiol

Es deutete sich zunächst eine Hemmung der Proliferation, sowie verringerte Überlebensrate naiver T-Zellen unter 17 β -Östradiol-Inkubation an. Trotz geringerer Proliferation und somit anzunehmender geringerer Anzahl naiver T-Zellen unter 17 β -Östradiol Inkubation, konnte hingegen eine trendweise höhere GM-CSF Sekretion im Vergleich zu Testosteron-Inkubation beobachtet werden. Bei Betrachtung des Zytokinprofils zeigte sich der anteilige GM-CSF-Gehalt unter 17 β -Östradiol Inkubation deutlich erhöht.

GM-CSF ist ein Zytokin, dem aufgrund neuester muriner Studien eine tragende Rolle bei Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird [448, 458]. Diskutiert wird hierbei sowohl eine Bedeutung in der Induktion als auch der Effektorphase der autoimmunen Antwort [448]. Dabei konnte gezeigt werden das GM-CSF defiziente Mäuse resistent für die Induktion einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis waren [458]. Trotz Expression von IFN- γ und IL-17, welchen aufgrund vergangener Studien eine tragende Rolle zugeschrieben wurde, waren es in diesen Mäusen nicht möglich eine Neuroinflammation zu induzieren [458]. Weiter konnte gezeigt werden, dass die GM-CSF-Sekretion in IFN γ -/- IL-17-/- Helfer T-Zellen ausreichend für die Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis war [458]. Dies sind Ergebnisse die für eine obligate Rolle von GM-CSF in Autoimmunerkrankungen im murinen Modell sprechen.

Es konnte gezeigt werden, dass GM-CSF hierbei unter anderem bedeutend für das Überleben Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen ist. Bei der Induktion der autoimmunen Antwort ist zunächst innates GM-CSF von Makrophagen oder möglicherweise dendritischen Zellen entscheidend, um die für die Differenzierung von Th17-Zellen nötigen Zytokine IL-6 und IL-23

zu induzieren [448]. In Folge kommt es zu einem positiven Feedbackloop von induzierten Th17-Zellen, welche GM-CSF sezernieren, welches wiederum parakrin auf dendritische Zellen oder Makrophagen wirkt. Dieses regt diese in Folge zu einer verstärkten Sekretion von IL-6 und IL-23 an [448]. IL-6 wirkt dabei auf zwei Ebenen, zum einen fördert es das Überleben von sowohl Th1- als auch Th17-Zellen, zum anderen stimuliert es zusammen mit TGF- β die weitere Expression von ROR γ t, somit die weitere Th17-Polarisierung.

Geht man davon aus, dass GM-CSF human eine ähnliche Bedeutung zukommt, könnten die durch 17 β -Östradiol induzierten höheren GM-CSF Konzentrationen ein begünstigender Faktor oder gar ursächlich für die erhöhte Neigung zur Entstehung sowie Ausprägung von Autoimmunerkrankungen beim weiblichen Geschlecht, über ein Überleben antigenspezifischer T-Zellen, sein (Abb. 43). Allergische Erkrankungen vom Typ 4 werden ebenfalls über T-Zellen vermittelt, womit fraglich ist, ob GM-CSF hier ebenfalls eine Rolle zukommt. Sowohl allergische Erkrankungen als auch Autoimmunerkrankungen stellen Überempfindlichkeitsreaktionen dar. Bei allergischen Erkrankungen ist die Reaktion hingegen gegen exogene Substanzen, bei Autoimmunerkrankungen gegen endogene Faktoren gerichtet.

Interessanterweise konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass GM-CSF nicht nur in naiven T-Zellen die GM-CSF-Sekretion stimuliert sondern ebenfalls in Monozyten, den Vorläufern der Makrophagen. Damit induziert 17 β -Östradiol auf zwei Ebenen die GM-CSF Sekretion. Überträgt man das murine Modell auf den Menschen könnte 17 β -Östradiol so die Induktion als auch das Überleben autoreaktiver Th1- und Th17-Zellen fördern. Damit könnte ein Erklärungsansatz für die erhöhte Prävalenz von Autoimmunerkrankungen bei Frauen gegeben sein.

Induktion von Zytokinprofil mit hohen GM-CSF Konzentrationen in naiven T-Zellen durch 17 β -Östradiol – Hinweis auf Induktion pathogener Th17-Zellen

Das von 17 β -Östradiol induzierte Zytokinprofil entspricht dem von pathogenen Th17-Zellen. Pathogene Th17-Zellen stehen mit niedrigeren IL-17 und IL-10 Konzentrationen, intermediären Konzentrationen von IL-22 und hohen Konzentrationen von GM-CSF in Verbindung.

Der Vergleich der anteiligen Zytokingehalte der naiven T Zellen unter 17 β -Östradiol - im Vergleich zur Testosteron-Inkubation zeigte niedrigere Anteile IL-10 (17 β -Östradiol: 3%; Testosteron: 5%) gleiche Anteile IL-17 (17 β -Östradiol: 2%; Testosteron: 2%) sowie höhere Anteile IL-22 (17 β -Östradiol: 16%; Testosteron: 14%) und GM-CSF (17 β -Östradiol: 21%; Testosteron: 17%) unter 17 β -Östradiol -Inkubation. Damit induzierte 17 β -Östradiol ein Zytokinverteilung wie sie für pathogene Th17-Zellen typisch ist (Abb. 44).

Das durch 17 β -Östradiol in naiven T-Zellen induzierte Zytokinprofil könnte somit einen Hinweis auf eine Rolle von 17 β -Östradiol in der Induktion von pathogenen Th17-Zellen und Autoimmunerkrankungen sein. Die tendenzielle Hemmung der GM-CSF Sekretion in Mo-

nozyten durch Testosteron könnte einen protektiven Faktor für das männliche Geschlecht darstellen.

Hinweis auf verminderte Toleranzmechanismen durch 17 β -Östradiol aufgrund einer IL-10-Hemmung in naiven T-Zellen

Die durch 17 β -Östradiol beobachtete tendenzielle IL-10-Hemmung und der niedrigere Anteil IL-10 im Zytokinprofil könnte unabhängig vom induzierten T-Helferzelltyp ein Faktor sein, der einen proinflammatorischen Effekt mit Induktion pathogener T-Zellen verstärkt. Hierbei zeigte sich hingegen auch eine tendenzielle IL-10-Hemmung durch Testosteron. Diese zeigte eine höhere Signifikanz, war hingegen schwächer ausgeprägt und zeigte sich nicht im Zytokinprofil.

IL-10 ist ein Zytokin, welches besonders Th1-Zellen und wie bereits beschrieben, über die höhere Expression IL-10Ra einem noch stärkeren Maß IL-17⁺ als auch IL-17⁺IFN γ ⁺ T-Zellen hemmt [452]. Die durch 17 β -Östradiol erniedrigten IL-10 Konzentrationen stellen somit einen weiteren begünstigenden Faktor für die weitere Differenzierung und Proliferation von Th17-Zellen dar.

Neben Th1- und Th17-Zellen können hingegen ebenfalls Th2-Zellen durch IL-10 gehemmt werden [450]. Damit können erniedrigte IL-10 Konzentrationen ebenfalls die Induktion einer Th2-gewichteten Immunantwort begünstigen, u. a. die allergische Reaktion vom Soforttyp.

Hemmung der Proliferation von naiven T-Zellen durch 17 β -Östradiol

Sofern von einem stimulatorischen Effekt von 17 β -Östradiol ausgegangen wird, steht dies hingegen im Gegensatz zu der beobachteten tendenziellen Proliferationshemmung. Hier wäre es ebenfalls möglich, dass ein bestimmter Zelltyp, möglicherweise IL-10 produzierende Zellen, gehemmt wurden. Bei gleichzeitiger Betrachtung der ebenfalls tendenziell verminderten Überlebensrate wäre ein weiterer hypothetischer Ansatz das 17 β -Östradiol die Anti-CD3/anti-CD28 vermittelte Stimulation soweit verstärkt, dass es zu einem Aktivierungsinduzierten Zelltod der Zellen aufgrund einer Überstimulation kommt. Bislang ist die n-Zahl der Versuche niedrig, weshalb die Aussagekraft noch schwach ist. Weitere Untersuchungen sind nötig um einen besseren Einblick in die immunmodulatorischen Eigenschaften der Sexualhormone zu bekommen. Intrazelluläre Färbungen der Transkriptionsfaktoren als auch der Zytokine könnten helfen die Wirkungen der Sexualhormone näher zu spezifizieren und Effekte spezifischen T-Zellsubpopulationen zuzuordnen.

Fazit: Erhöhung von GM-CSF und Erniedrigung von IL-10 durch 17 β -Östradiol in naiven T-Zellen – möglicher Risikofaktor für allergische- und Autoimmunerkrankungen

Zusammengefasst könnten die erniedrigten IL-10 und erhöhten GM-CSF Konzentrationen wie sie unter 17 β -Östradiol Inkubation in naiven T-Zellen auf einen immunstimulatorischen Effekt von 17 β -Östradiol in naiven T-Zellen hindeuten. Dieser Effekt könnte einen Erklärungsansatz für die verbesserte Prognose von Frauen in Infektionserkrankungen liefern als auch die erhöhte Neigung des weiblichen Geschlechts für alle vier Typen allergischer Erkrankungen als auch für Autoimmunerkrankungen erklären.

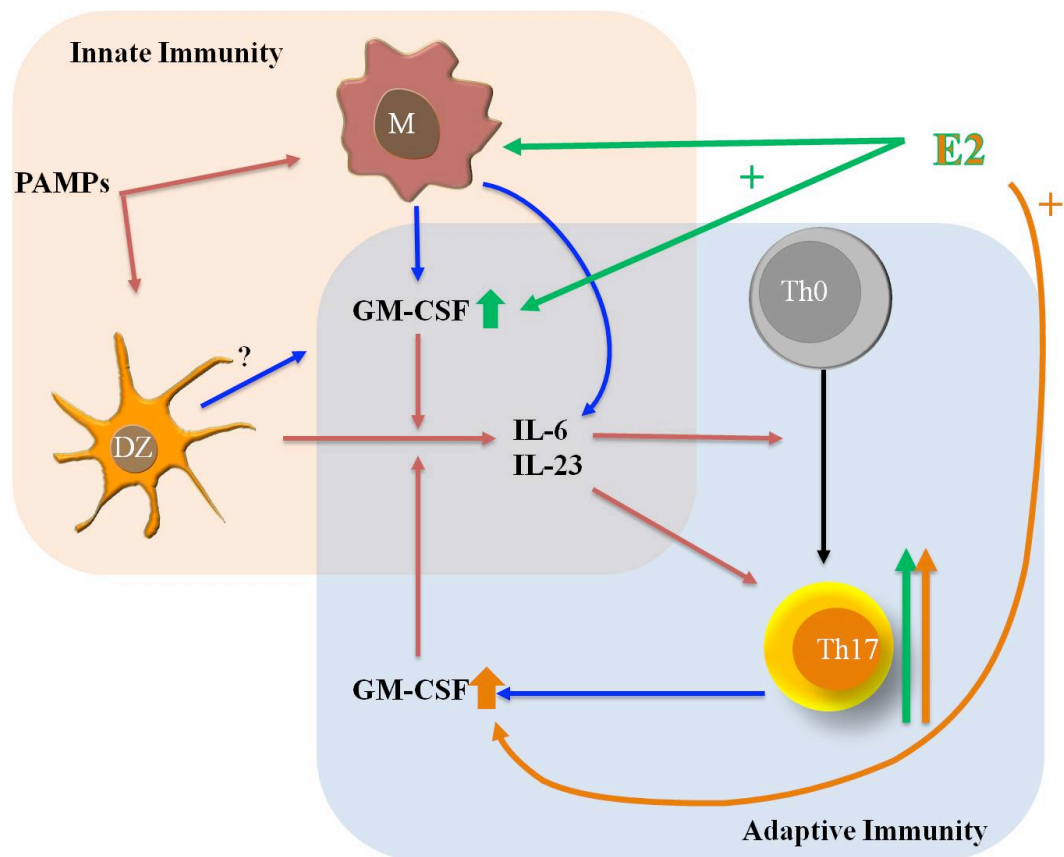


Abb. 43: Modell der GM-CSF mediierten Autoimmunität mit möglicher 17 β -Östradiol Beteiligung [modifiziert; basierend auf [448]]

7.2.4 Verändertes Zytokinprofil in naiven T-Zellen durch Leptin

Verschiebung des Zytokinprofil Richtung Th1 durch Koinkubation naiver T-Zellen mit 17 β -Östradiol und Leptin

Bei Betrachtung der Koinkubation naiver T-Zellen mit 17 β -Östradiol und Leptin ließ sich eine Verschiebung des Zytokingleichgewichtes Richtung Th1, mit Erhöhung von IFN- γ und Erniedrigung von IL-13 beobachten. Dieser Effekt konnte nicht für Testosteron und Leptin

beobachtet werden. Für Leptin allein ist bereits die Stimulation von Th1-Zellen mit Erhöhung von IFN- γ beschrieben [273, 274, 286], dieser Effekt ließ sich in dieser Studie nicht reproduzieren.

Ähnlich der Stimulation mit Monozyten ist es möglich, dass die Induktion von Th1-Zellen durch Leptin ein synergistischer Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin ist. In normalem Kulturmedium befinden sich bereits physiologische Konzentrationen von Hormonen. *In vivo* beschriebene Wirkungen können ebenso durch einen Synergismus bedingt sein. Somit ist es möglich, dass der beobachtete und für Leptin postulierte Effekt nicht auf eine alleinige Leptin-Wirkung, sondern vielmehr auf eine synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin zurückzuführen ist. Diese Studie verwendete hormonreduziertes Medium und der Th1-stimulierende Effekt von Leptin konnte nicht reproduziert werden. Der Effekt konnte nur unter Koinkubation mit 17 β -Östradiol beobachtet werden und deutet auf eine synergistische Wirkung von 17 β -Östradiol und Leptin bezüglich der Induktion einer Th1-gewichteten Antwort hin.

Hemmung Th2-spezifischer Zytokine durch Koinkubation naiver T-Zellen mit Testosteron und Leptin

Im Gegensatz zur 17 β -Östradiol- und Leptin-Inkubation zeigte die Koinkubation von Testosteron und Leptin nur eine marginale Erhöhung (1%) des IFN- γ Anteils und lag unter dem IFN- γ Anteil der alleinigen Leptin-Inkubation. Parallel konnte dabei eine Hemmung von IL-13 beobachtet werden. Womit unter Testosteron und Leptin Inkubation zwar eine Hemmung von Th2-spezifischen Zytokinen, hingegen im Gegensatz zu 17 β -Östradiol und Leptin Inkubation kaum Effekt auf Th1-spezifische Zytokine zu beobachten war. Die IFN- γ Erhöhung, wie sie unter 17 β -Östradiol und Leptin Inkubation zu beobachten war, deutet somit auf einen spezifischen synergistischen Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin hin.

Induktion von IL-17, TNF- α und IL-10 in naiven T-Zellen durch Leptin

Parallel konnte für Leptin eine tendenzielle Erhöhung von IL-17 beobachtet werden, welche sich in der Koinkubation von sowohl 17 β -Östradiol und Leptin als auch Testosteron und Leptin zeigte. Gleichzeitig zeigte sich eine anteilige Erhöhung von TNF- α unter Leptin als auch Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin.

IL-17 ist ein Zytokin, welches primär Wirkung auf nicht-lymphoide Gewebe wie Epithelzellen, Keratinozyten oder Fibroblasten ausübt und hier maßgeblich an der Abwehr bestimmter Erreger beteiligt ist [459]. TNF- α wiederum kann synergistische Wirkung mit IL-17 an epithelialen Barrieren entfalten und dessen Wirkung verstärken [460, 461]. 65% der Adipozyten befinden sich subkutan. Möglicherweise ist Leptin an bestimmten Lokalisationen des

Körpers, u. a. subkutan an der Lenkung der Immunantwort und der epithelialen Abwehr beteiligt.

Wie bereits ausgeführt induziert Leptin in Monozyten ebenfalls IL-6, welches wichtig für die Induktion von Th17-Zellen ist. Über Induktion von IL-6 in innate Zellen und IL-17 induzierende Wirkung in naiven T-Zellen unterstützt Leptin möglicherweise auf zwei Wegen die Th17-Differenzierung.

Wie beschrieben wird Übergewicht bei Kindern verstärkt mit intrinsischem Asthma assoziiert [462]. Intrinsisches Asthma ist wiederum charakterisiert durch verstärkte Neutrophileninfiltration, welche eine der Hauptaufgaben der Th17-Zellen oder dem Zytokin IL-17 darstellt. Möglich wäre, dass Leptin über eine Stimulation der Th17-Zelldifferenzierung hier zur verstärkten Entwicklung des intrinsischen Asthmas mit verstärkter Neutrophileninfiltration beiträgt.

Interessanterweise zeigte sich gleichzeitig eine Erhöhung von IL-10 und Erniedrigung von GM-CSF, von Leptin alleinig als auch in den Koinkubationen. In den Koinkubationen war die anteilige IL-10 Erhöhung marginal mit 17β -Östradiol, hingegen deutlich mit Testosteron ausgeprägt. Die Erhöhung von IL-10 deutet auf einen antiinflammatorischen Effekt von Leptin auf naive T-Zellen hin. Bisherige Studien postulieren hingegen primär proinflammatorischen Effekt von Leptin und eine Hemmung regulatorischer T-Zellen [463]. Es besteht hingegen auch eine Studie die auf einen IL-10 stimulierenden Effekt von Leptin hindeuten könnte. So konnte in einer Studie von Farooqui et al. in Leptin-defizienten Kindern nach Leptin-Administration eine IL-10 Erhöhung in stimulierten T-Zellen gezeigt werden [286]. Dies könnte für einen stimulierenden Effekt von Leptin auch auf IL-10 sprechen. Möglich wäre, dass Leptin neben proinflammatorischen Wirkungen ebenfalls antiinflammatorische Wirkungen entfalten kann.

Auch die GM-CSF Erniedrigung kann auf einen antiinflammatorischen Effekt hindeuten. Möglich wäre, dass Leptin die Entstehung von pathogenen T-Zellen hemmt, welche durch eine hohe GM-CSF Sekretion gekennzeichnet sind. Vergangene Studien hingegen postulieren einen primär proinflammatorischen Effekt von Leptin. Möglich wäre auch, dass die Induktion eines T-Zelltyps mit starker IL-17 Sekretion, wie bereits ausgeführt, auf eine Rolle von Leptin an epithelialen Barrieren hindeutet. Hier kommt IL-17 eine gesonderte proinflammatorische Rolle zu. Eine Studie in IL-17 überexprimierenden Mäusen stellte einen kaum merkbaren Einfluss der IL-17 Überexpression auf die Entwicklung der EAE sowie die generelle Gesundheit fest, hingegen entwickelten diese Mäuse dennoch inflammatorische Anomalitäten an der Haut [464]. Die Mäuse zeigten eine Hautgranulozytose sowie Entzündungen der Haut.

Beschriebene Effekte von Leptin sollten über eine Erhöhung der n-Zahl sowie auf Einzelzellebene über intrazelluläre Färbungen weiter untersucht werden. Eine Option wäre, dass Lep-

tin auf unterschiedliche T-Zellpopulationen, sowie unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen, divergente Wirkungen entfaltet

Kein Einfluss von Leptin auf die Proliferation naiver T-Zellen

Auf die Proliferation der naiven T-Zellen konnte in vorliegender Studie kein Effekt beobachtet werden. Vergangene Studien beschreiben hingegen eine Induktion der Proliferation in naiven T-Zellen durch Leptin [273, 274]. Möglich wäre, dass Leptin hier ebenfalls mit einem weiteren Faktor interagiert, welche in normalem Kulturmedium vorhanden ist, hingegen nicht in dem in der vorliegenden Studie verwendeten hormonreduziertem Medium.

Fazit: Hemmung Th2-spezifischer Zytokine durch Leptin und 17 β -Östradiol sowie Induktion Th1-spezifische Zytokine durch Leptin

Zusammengefasst ließ sich für naive T-Zellen für Leptin alleinig eine anteilige Erniedrigung von IL-13 beobachten. Die Erniedrigung des IL-13 Anteils bleibt auch in den Koinkubationen erhalten, was auf einen hemmenden Effekt von Leptin auf die Th2-Zelldifferenzierung hindeutet. Die Induktion von IFN- γ hingegen zeigt sich erst unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin und auch ausschließlich unter Koinkubation und nicht unter Einzelinkubation von 17 β -Östradiol oder Leptin. Dies deutet auf einen synergistischen Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin bezüglich der Induktion einer Th1-gewichteten Immunitätslage hin. Interessanterweise zeigt Übergewicht eine stärkere Assoziation mit intrinsischem Asthma, möglicherweise aufgrund einer Hemmung von Th2-Zellen. Zudem lässt sich eine stärkere Assoziation im weiblichen Geschlecht beobachten, hier möglicherweise neben einer Hemmung von Th2- zusätzliche aufgrund einer Induktion von Th1-Zellen. Generell ließ sich für naive T-Zellen für Leptin alleinig und in den Koinkubationen eine IL-17 Induktion und GM-CSF Hemmung beobachten, was zudem für die Induktion des vermehrt regulatorischen Th17-Typen durch Leptin sprechen könnte. Damit könnte Leptin ebenfalls regulatorische Funktion zukommen. Ebenso könnte aber auch eine Induktion von Th17-Zellen stattgefunden haben.

7.2.5 Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils in memory T-Zellen durch 17 β -Östradiol

Nach Betrachtung des Einflusses der Hormone 17 β -Östradiol und Testosteron auf die Induktion einer T-Zell-Antwort, wurde der Einfluss auf die Effektorfunktion bereits differenzierter polarisierter CD4⁺ memory T-Zellen untersucht.

Erhöhung Th1- und Th2-spezifische Zytokine durch 17 β -Östradiol – Hinweis auf Aggravation Th1- als auch Th2-gewichteter Erkrankungen

In den Analysen der memory T-Zellen ließ sich zunächst eine signifikante Proliferationshemmung beobachten, wobei eine Proliferation von nur mehr 20% der Kontrolle gemessen werden konnte. Es kann angenommen werden, dass je stärker die Proliferation ist, dass sich umso mehr Zellen am Ende der Inkubation im Stimulationsansatz befinden. Trotz zunehmender geringerer Zellzahl unter 17 β -Östradiol-Inkubation, zeigten sich hingegen gleiche GM-CSF, IFN- γ , TNF- α und IL-13 Konzentrationen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass auf Einzelzellebene eine höhere Sekretion dieser Zytokine stattgefunden hat und 17 β -Östradiol sowohl Th1- als auch Th2-spezifische Zytokine stimuliert.

Prozentual zeigte sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung Th1- als auch Th2-spezifischer Zytokine, sowie eine starke Erniedrigung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Da sowohl die Th1- als auch Th2-spezifischen Zytokine IFN- γ und IL-13 erhöht waren, kann davon ausgegangen werden, dass 17 β -Östradiol einen immunstimulatorischen Effekt auf beide Zelltypen hat und Th1- als auch Th2-gewichtete Immunantworten verstärken kann.

In vivo könnte dies dazu führen, dass durch 17 β -Östradiol regulatorische Mechanismen über eine verstärkte Aktivierung von T-Effektorzellen außer Kraft gesetzt werden. Somit könnte 17 β -Östradiol überschießende Immunreaktionen sowohl Th1- als auch Th2-gewichtet begünstigen, was ein Erklärungsansatz für die erhöhte Neigung von Frauen zu pathologisch fehlgeleiteten Immunantworten wäre. Zudem könnte es auch die Zyklusabhängigkeit wie sie in Asthma oder dem atopischen Ekzem beobachtet werden kann erklären. Die premenstruelle Exazerbation der Symptomatik könnte mit den erhöhten 17 β -Östradiol-Konzentrationen dieser Zyklusphase zusammenhängen, welche über einen stimulatorischen Effekt aktivierter Antigen-spezifischer T-Zellen zu einer Aggravation der Symptomatik beitragen. Über eine verstärkte Aktivierung von memory T-Zellen könnte 17 β -Östradiol hingegen gleichzeitig zu einer beschleunigten Klärung von Infektionen beitragen und somit die Pathogenkontrolle verbessern.

Konträr zu 17 β -Östradiol konnte für Testosteron eine IL-13 Hemmung beobachtet werden. Dies spricht für eine spezifische Hemmung von Th2-Zellen durch Testosteron und könnte ein Erklärungsansatz für die verminderte humorale Immunantwort beim männlichen Geschlecht sein.

In vitro Studien postulieren eine Hemmung der IgG und IgM Produktion von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) durch Testosteron sowie eine Stimulation der IgG und IgM Produktion durch Östrogen. Dies unterstützt einen immunstimulatorischen Effekt von 17 β -Östradiol auf Th2-Zellen und einen hemmenden von Testosteron [148-151].

In vivo werden diese Daten durch Studien gestützt, die höhere Konzentrationen der Antikörper Isotypen IgG sowie IgM in Frauen als in Männern zeigen konnten [145-147]. Auch die

Erhöhung von IgE durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva könnte durch einen stimulatorischen Effekt von 17 β -Östradiol auf T-Zellen miterklärt werden.

Eine Stimulation von Th1- als auch Th2-Zellen durch 17 β -Östradiol wird auch durch vergangene Studien gestützt, die ebenfalls in humanen als auch murinen CD4⁺ T-Zellklonen eine Stimulation von IFN- γ und IL-4 in periovulären bis Schwangerschaftskonzentrationen zeigen konnten [176].

Ein weiteres Zytokin, welches unter 17 β -Östradiol-Inkubation eine deutliche Erhöhung zeigte, war GM-CSF. GM-CSF ist ein Zytokin, welches von Th1-, Th2- und Th17-Zellen produziert wird und dem, wie bereits beschrieben, nach neuesten Studien, eine tragende Rolle in Autoimmunerkrankungen zugeschrieben wird [448].

Gleichzeitig stimuliert es Th1- und Th2-Zellen [441], womit es in einer autokrinen oder parakrinen Wirkung ebenfalls zu einer Verstärkung dieser T-Zellsubpopulationen in physiologischer, wie auch pathologischer Weise beitragen könnte.

Stimulation der GM-CSF-Sekretion durch 17 β -Östradiol — möglicher Hinweis auf die Induktion pathogener Th1- und Th17-Zellen

Die Sekretion von GM-CSF in Th1- als auch Th17-Zellen wird im murinen Modell parallel in direkten Kontext zu ihrer Pathogenität gesetzt. So konnten vergangene Studien im murinen Modell der EAE zeigen, dass die Sekretion von GM-CSF für die Pathogenität von sowohl Th1- wie auch Th17-Zellen von entscheidender Bedeutung ist. Die Neutralisierung von GM-CSF zu Beginn der Krankheitssymptomatik kann das Fortschreiten der Erkrankung sowie einen Rückfall verhindern [458].

Die Stimulation hoher GM-CSF Konzentrationen wie sie durch 17 β -Östradiol-Inkubation zu beobachten waren, könnte *in vivo* somit einen Risikofaktor für die Entstehung sowie Erhaltung von Autoimmunerkrankungen darstellen. Aufgrund des sich durch 17 β -Östradiol ergebenden Zytokinprofils wäre es möglich, dass 17 β -Östradiol sowohl pathogene Th1- als auch Th17-Zellen induziert.

Pathogene Th17-Zellen sind charakterisiert durch niedrigere IL-17 und IL-10 Konzentrationen, intermediären Konzentrationen von IL-22 und hohe Konzentrationen an GM-CSF (Abb. 44). Damit stellen die durch 17 β -Östradiol erniedrigten IL-17, IL-22 und IL-10 Gehalte mit gleichzeitiger Erhöhung von GM-CSF, ein Zytokinprofil charakteristisch für pathogene Th17-Zellen dar. Dies könnte auf die Induktion des pathogenen Th17-Zelltypes durch 17 β -Östradiol hindeuten. 17 β -Östradiol induziert somit ein Zytokinprofil in Gedächtnis T-Zellen wie es pathogenen Th17-Zellen zugeschrieben wird.

Gleichzeitig ist die Induktion von GM-CSF ein amplifizierender Faktor für die Erhaltung sowie Proliferation von Th17-Zellen, indem es wie bereits beschrieben, wiederum die IL-6 und IL-23 Sekretion dendritischer Zellen stimuliert. Eine hohe GM-CSF Sekretion steht

somit in direktem Zusammenhang zu pathogenen Th1- und Th17-Zellen und wäre unabhängig von der Quelle der Sekretion ebenfalls ein begünstigender Faktor für die Entstehung pathogener Th17-Zellen. Die hohen, durch 17 β -Östradiol induzierten GM-CSF Konzentrationen könnten möglicherweise ein begünstigender Faktor oder gar ursächlich für die Entstehung sowie Ausprägung von Autoimmunerkrankungen beim weiblichen Geschlecht sein.

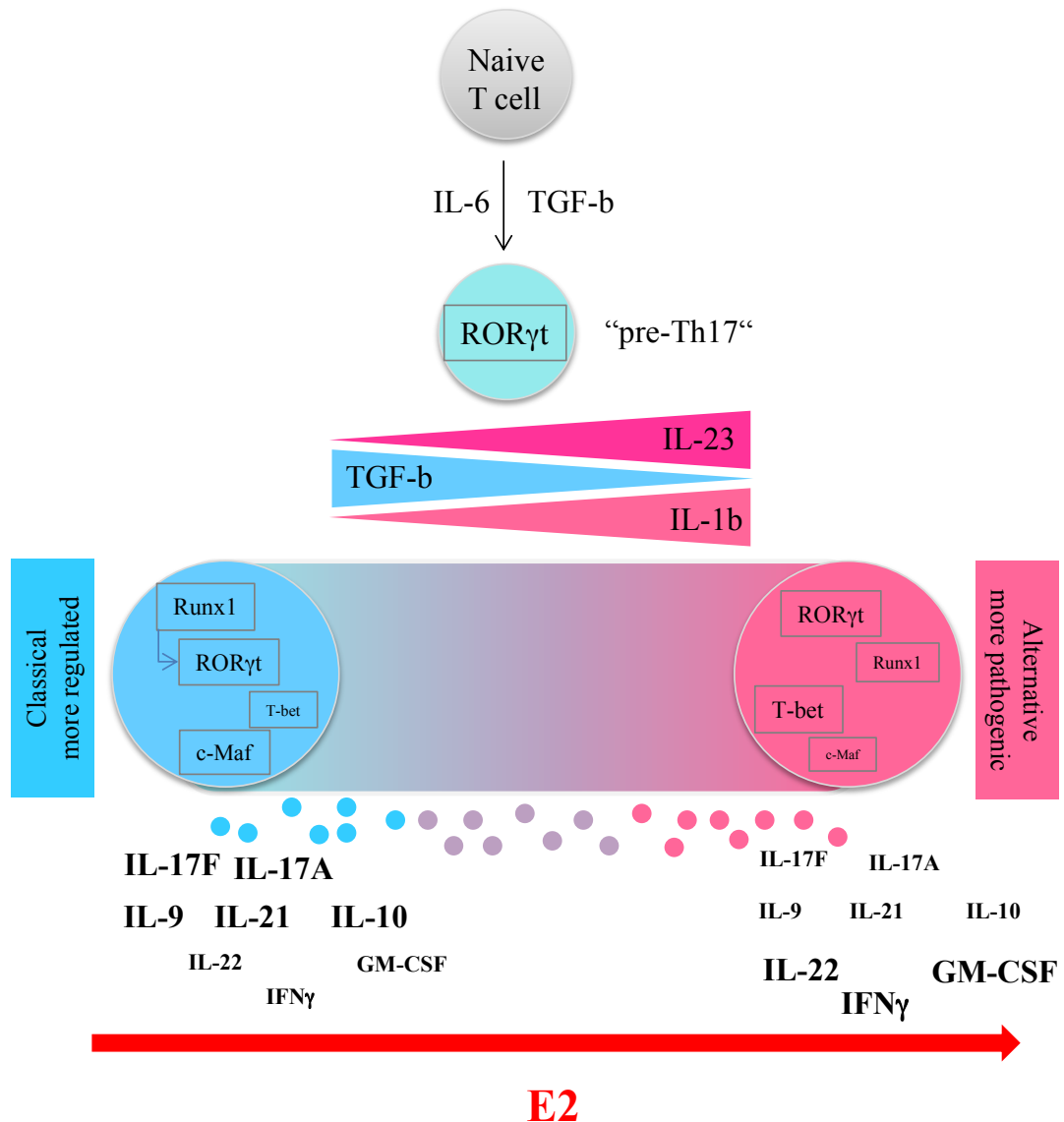


Abb.44: Konzept der regulatorischen und pathogenen Th17 Zellen [modifiziert; basierend auf [465]]

Hemmung von Proliferation und IL-10-Sekretion von memory T-Zellen durch 17 β -Östradiol
Die Beobachtung, dass die IL-10 Produktion und die Proliferation der T-Zellen am signifikantesten gehemmt wurden, lässt des Weiteren die Möglichkeit offen das zum einen entweder spezifische IL-10 produzierende T-Zellen u. a. Treg-Zellen gehemmt wurden oder aber

die IL-10 Sekretion der anderen T-Helferzellpopulationen gehemmt wurde. Dies hätte in beiden Fällen eine verstärkt proinflammatorische Immunantwort zur Folge. Eine verstärkte proinflammatorische Immunantwort durch 17 β -Östradiol und die erniedrigten IL-10 Konzentrationen stellen wiederum einen Risikofaktor für pathologisch fehlgeleitete Immunantworten dar, können hingegen ebenfalls die Pathogenkontrolle verbessern.

Vergangene Studien zu 17 β -Östradiol und memory T-Zellen

Vergangene Studie von Gilmore et al. in memory T-Zellen beschreiben eine Stimulation von IL-10 sowie eine Inhibition von TNF- α in CD4⁺ T-Zellklonen durch 17 β -Östradiol in hohen Dosen (3,6*10⁻⁸ M - 3,6*10⁻⁷ M) [466]. Dies steht im Widerspruch zur vorliegenden Studie, welche eine Hemmung von IL-10 und wenig Effekt auf TNF- α durch 17 β -Östradiol feststellen konnte.

Ursächlich für die unterschiedlichen Effekte könnte die Arbeit mit T-Zellklonen im Gegensatz zu einer Gesamtpopulation von memory T-Zellen sein. In der Gesamt T-Zellpopulation, mit der in der vorliegenden Studie gearbeitet wurde, befinden sich sowohl Th1-, Th2, Th17-, Th22-Zellen als auch Tregs. Möglich wäre, dass der 17 β -Östradiol-Effekt auf unterschiedliche T-Zellpopulationen unterschiedlich ausgeprägt ist. Schwächere Effekte könnten somit überdeckt werden. Auch wäre es möglich, dass eine gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Zellpopulationen untereinander stattfindet.

Es wäre möglich, dass beispielsweise IL-10 über eine proinflammatorische Zytokinsekretion indirekt gehemmt wird. Die Hemmung somit durch eine gegenseitige Beeinflussung der T-Zellsubpopulationen bedingt ist.

Gleichzeitig besteht die Option, dass eine weitere Konzentrationsabhängigkeit besteht, da die in der vorliegenden Studie verwendeten 17 β -Östradiol-Konzentrationen über denen der von Gilmore et al. verwendeten Konzentrationen liegen. Wie bereits beschrieben induzieren proinflammatorische Zytokine Aromatase, das Enzym das Androgene in Östrogene konvertiert. Eine lokale Inflammation könnte somit im Zusammenhang mit lokal stark erhöhten Östrogenkonzentrationen stehen. Das auf inflammatorische Faktoren produzierte 17 β -Östradiol könnte über eine Hemmung von IL-10 zur Verstärkung der Immunantwort beitragen. Geht man von diesem Zusammenhang aus, könnten unterschiedliche bis gegenläufige Effekte durch unterschiedliche Konzentrationen von 17 β -Östradiol erklärt werden.

Fazit: Proinflammatorische Wirkung von 17 β -Östradiol auf memory T-Zellen

Die vorliegende Studie deutet darauf hin, dass zum einen sowohl ein stimulierender Effekt von 17 β -Östradiol auf Th1- als auch Th2-Zellen besteht, zum anderen deutet die Veränderung des Zytokinprofils auf die Induktion pathogener Th17-Zellen durch 17 β -Östradiol hin.

Unabhängig vom Zelltyp induziert 17 β -Östradiol ein proinflammatorisches Zytokinprofil in memory T-Zellen und deutet auf einen stimulatorischen Effekt von 17 β -Östradiol auf die adaptive T-Zell-abhängige Immunantwort hin. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die verbesserte Resistenz in Infektionen beim weiblichen Geschlecht darstellen, könnte hingegen über Verlust von Toleranzmechanismen und Induktion pathogener T-Zellen auch die erhöhte Prävalenz fehlgeleiteter Immunantworten erklären.

Die Hemmung von IL-13 durch Testosteron deutet auf immunsuppressiven Effekte von Testosteron und eine verminderte humorale Antwort in Männern hin. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die schlechtere Prognose von Männern in Infektionskrankheiten liefern. Parallel kann auch das Risiko sowie die Ausprägung fehlgeleiteter Th2-gewichteter pathologischer Immunantworten verringert werden.

7.2.6 Verändertes Zytokinprofil in memory T-Zellen durch Leptin

Hemmung Th2-spezifischer Zytokine in memory T-Zellen durch Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin

In memory T-Zellen war, ähnlich naiven T-Zellen, ebenfalls unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin der IL-13 Anteil erniedrigt und es zeigte sich ein hemmender Effekt auf die Sekretion von IL-13. Dieser Effekt ließ sich nicht unter Einzelhormoninkubation von 17 β -Östradiol oder Leptin beobachten, was auf einen synergistischen Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin hindeutet.

Dies steht im Gegensatz zu vergangener Studie von Lord et al. steht, welche einen hemmenden Effekt auf Th2-spezifische Zytokine durch Leptin postulierte [273]. Das Medium der Studie von Lord et al. ist nicht näher definiert, womit davon ausgegangen werden kann, dass es sich nicht um speziell hormonreduziertes Medium gehandelt hat. Damit ist es wahrscheinlich, dass sich ebenfalls 17 β -Östradiol im Stimulationsansatz befunden hat. Somit wäre es möglich, dass es sich bei dem auf Leptin zurückgeführten Effekt vielmehr um einen synergistischen Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin handelt.

In der vorliegenden Studie konnte auch keine IL-13 Hemmung durch Koinkubation von Testosteron und Leptin gezeigt werden. Dies deutet auf einen spezifischen synergistischen Effekt von 17 β -Östradiol und Leptin bezüglich einer Hemmung Th2-spezifischer Zytokine hin.

Kein stimulierender Effekt von Leptin oder der Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin auf Th1-spezifische Zytokine in memory T-Zellen

Entgegen der IFN- γ Induktion in naiven T-Zellen ließ sich auf memory T-Zellen kein Effekt auf die IFN- γ Sekretion unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin beobachten. Auch Leptin alleinig hatte keinen Effekt auf die IFN- γ Sekretion.

Dies steht im Gegensatz zu vergangener Studie von Lord et al., welche einen stimulierenden Effekt von Leptin auf die IFN- γ -Produktion zeigte (325). *In vivo* wird Leptin generell ein Th1-stimulierender und Th2-supprimierender Effekt zugeschrieben [273, 285]. Leptin-defiziente Mäuse sind gekennzeichnet durch eine verminderte Sekretion von IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-18, wohingegen sie eine verstärkte Sekretion von IL-4 und IL-10 zeigen.

Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten Zellpopulation, handelt es sich um Gesamt-CD4⁺ memory T-Zellen, wobei unbekannt ist, wie viele Th1-Zellen sich in der Population befinden. Gleichzeitig muss man von einer gegenseitigen Beeinflussung der Zellsubpopulationen untereinander ausgehen. Zytokine der einen T-Helferzellsubpopulation haben hemmende Wirkungen auf andere T-Helferzellsubpopulationen. Das Th1-spezifische Zytokine IFN- γ hemmt beispielsweise Th2-Zellen, während das Th2-spezifische Zytokin IL-4 Th1-Zellen hemmt. Je nach Spender und durchlaufenen Infektionen befinden sich unterschiedliche Anteile der verschiedenen Zellsubpopulationen unter den memory T-Zellen. Bei getrennter Betrachtung der Zellstimulation der einzelnen Spender ließ sich in drei von vier Spendern ein leicht stimulierender Effekt von Leptin auf die IFN- γ -Sekretion in der vorliegenden Studie beobachten. Möglicherweise besteht hier eine gewisse Abhängigkeit vom Spender und der Zusammensetzung der vorliegenden Zellpopulation bezüglich der IFN- γ Induktion.

Der ausbleibende stimulierende Effekt auf die IFN- γ -Produktion, wie er in anderen Studien beobachtet wurde, könnte hingegen ebenfalls mit verwendetem Medium zusammen hängen. Möglicherweise interagiert Leptin auch hier mit einem Kofaktor, welcher in hormonreduziertem Medium nicht oder nur reduziert vorhanden ist.

Trotz ausbleibender Stimulation von Th1-spezifischen Zytokinen ließe sich hingegen über eine Langzeitexposition möglicherweise eine Erhöhung von IFN- γ aufgrund verminderter Hemmung von Th1-Zellen durch Th2-Zellen vermuten. Damit hätte Leptin einen indirekt stimulierenden Effekt auf Th1-Zellen, was konform mit den aufgeführten *in vivo* Daten wäre.

Kein Effekt von Leptin alleinig auf IL-17-Sekretion in memory T-Zellen, hingegen antagonistischer Effekt unter Koinkubation mit 17 β -Östradiol

Im Gegensatz zu naiven T-Zellen hatte die Einzelinkubation mit Leptin in memory T-Zellen keinen Effekt auf IL-17. Dahingegen antagonisierte Leptin unter Koinkubation den hem-

menden Effekt von 17 β -Östradiol auf die IL-17 Sekretion und erhöhte IL-17 anteilig im Zytokinprofil. Zudem erhöhte Leptin unter Koinkubation IL-10 leicht und erniedrigte GM-CSF. Die beobachteten Leptin-Effekte unter Koinkubation könnten für eine regulatorische Rolle von Leptin unter den gegebenen Bedingungen sprechen. 17 β -Östradiol induziert ein Zytokinprofil, wie es pathogenen Th17-Zellen zugeschrieben wird, mit hohen Konzentrationen GM-CSF und niedrigen IL-17 und IL-10. Die Aufhebung dieses Sekretionsmusters könnte auf eine regulatorische Funktion von Leptin bezüglich der Induktion pathogener Th17-Zellen durch 17 β -Östradiol hindeuten.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass das parallele Auftreten beider Hormone auf inflammatorische Bedingungen an epithelialen Barrieren hindeutet. Leptin wird vom Fettgewebe sezerniert, von dem sich 65% Normalgewichtiger Personen subkutan befindet. Hohe Leptin-Konzentrationen könnten somit in Zusammenhang mit epithelialen Barrieren stehen. Hohe 17 β -Östradiol-Konzentrationen können, wie bereits ausgeführt, in Zusammenhang mit inflammatorischen Bedingungen stehen. Hohe Leptin und 17 β -Östradiol Konzentrationen könnten somit bevorzugt an epithelialen Barrieren unter inflammatorischen Bedingungen auftreten. An epithelialen Barrieren kommt IL-17 eine gesonderte Rolle zu, wie im Folgenden näher ausgeführt wird.

Rolle von IL-17 und möglicherweise Leptin an epithelialen Barrieren

Wie bereits beschrieben befinden sich 65% der Adipozyten subkutan. Möglicherweise ist das von diesen unter inflammatorischen Bedingungen sezernierte Leptin an der Steuerung der Immunantwort an diesen Grenzflächen von Bedeutung. Speziell in der Haut scheint eine verstärkte Pathogenität von IL-17 auszugehen.

Abhängig von der Lokalisation kann somit eine Erhöhung von IL-17 durch 17 β -Östradiol und Leptin auch auf einen proinflammatorischen Effekt hindeuten. Unter Koinkubation war zudem das Zytokin TNF- α im Zytokinprofil erhöht, was mit IL-17 synergistische Wirkungen entfalten kann [460, 461].

Studien beschreiben zwar eine entscheidende Rolle von GM-CSF und untergeordnete Rolle von IL-17 bei Erkrankungen wie EAE, hingegen ebenfalls eine gesonderte Rolle von IL-17 in der Haut. Eine Studie in IL-17 überexprimierenden Mäusen stellte einen kaum merkbaren Einfluss der IL-17 Überexpression auf die Entwicklung der EAE sowie die generelle Gesundheit fest [464], hingegen entwickelten diese Mäuse dennoch inflammatorische Anomalitäten der Haut. So zeigte sich eine Hautgranulozytose sowie Entzündungen der Haut.

Dies spricht für eine gesonderte proinflammatorische Rolle von IL-17 in der Haut.

Eine Erhöhung von IL-17 unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin könnte somit ebenfalls auf eine verstärkt proinflammatorische Immunantwort an dieser Lokalität hindeuten.

Gleichzeitig war ebenfalls TNF- α unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin erhöht. Dies ist besonders interessant, da TNF- α und IL-17 synergistische Wirkung an epithelialen Barrieren entfalten können [460, 461]. Synergistische Wirkungen sind u. a. eine Hochregulation von E- und P-Selektinen sowie Neutrophilen Chemokinen an Endothelien. Die Folge ist eine verstärkte Leukozyten-Transmigration. Die parallele Induktion dieser Zytokine durch 17 β -Östradiol und Leptin könnte somit ebenfalls auf eine proinflammatorische Rolle dieser beiden Hormone an epithelialen Barrieren hindeuten.

Erhöhung von IL-22 durch Leptin unter Einzel- sowie Koinkubation mit 17 β -Östradiol und Testosteron

Zudem erhöht war das Zytokin IL-22 sowohl unter Koinkubation der Sexualhormone mit Leptin als auch unter alleiniger Leptin-Inkubation. Auch IL-22 kommt eine besondere Rolle an epithelialen Barrieren zu. Der Unterschied zwischen IL-17 und IL-22 ist, dass IL-22 im Gegensatz zu IL-17 in Abwesenheit inflammatorischer Zytokine eine eher protektive Rolle einnimmt [459]. In Anwesenheit weiterer proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-17 kann es hingegen synergistische proentzündliche Wirkungen entfalten [467].

Betrachtet man nun das Zytokinprofil, welches sich unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin ergibt, zeigt sich ein Anstieg von TNF- α , IL-17 und IL-22. Somit ein proinflammatorisches Zytokinprofil in dem IL-22 proentzündliche Wirkung entfaltet.

Dahingegen war unter Koinkubation von Testosteron und Leptin nur der Anteil IL-22, nicht aber der von IL-17 oder TNF- α erhöht. Damit induzierte Koinkubation von Testosteron und Leptin ein primär antiinflammatorisches Zytokinprofil in dem IL-22 eine vermehrt protektive Rolle zukommt.

Auch Leptin alleinig zeigte ausschließlich eine Erhöhung von IL-22, keinen Einfluss auf IL-17 und eine Erniedrigung von TNF- α , was auf einen eher antiinflammatorischen Effekt von Leptin alleinig hindeutet.

Der Betrachtung des Zytokinprofils kommt hierbei besondere Bedeutung zu, da sich eine signifikante Proliferationshemmung durch 17 β -Östradiol zeigte, womit die ausschließliche Betrachtung der Zytokinmenge aufgrund anzunehmender geringer Zellzahl nicht ausreichend wäre. Durch Koinkubation von Testosteron und Leptin oder Leptin alleinig kam es somit primär zu einer Erhöhung des protektiven IL-22. Unter Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin kam es zu einem proinflammatorischen Zytokinprofil mit Erhöhung von TNF- α , IL-17 und IL-22.

Möglich wäre, dass hohe 17 β -Östradiol Konzentrationen in Zusammenhang mit proinflammatorischen Zuständen stehen. Wie bereits ausgeführt wird Aromatase durch proinflammatorische Zytokine induziert. Während Leptin alleinig möglicherweise keine proinflammatorische Wirkung entfaltet und vielmehr protektiv ist, ändert sich dies möglicher-

weise unter inflammatorischen Bedingungen u. a. durch synergistische Wirkungen mit 17 β -Östradiol, was zur Induktion der Zytokine IL-17, IL-22 und TNF- α führt.

Leptin, IL-22 und Psoriasis

In unserer Studie deutete sich nun ein stimulierender Effekt von Leptin auf IL-22 in memory T-Helferzellen an. Dieser Effekt zeigte sich unter Einzelhormoninkubation sowie unter Koinkubation von 17 β -Östradiol oder Testosteron mit Leptin. Die Induktion von IL-22 durch Leptin spricht für eine Rolle von Leptin an epithelialen Barrieren.

IL-22 ist ein Zytokin dessen Funktion u. a. in der Induktion der epithelialen innate Immunabwehr liegt und dessen Rezeptorexpression sich ausschließlich auf Gewebszellen beschränkt. Neben der Induktion antimikrobieller Peptide verstärkt es ebenfalls die Proliferation und Migration und inhibiert die Differenzierung von Keratinozyten.

Diese Veränderungen der Keratinozyteneigenschaften spiegeln das klinische Bild von Psoriasis wieder, womit eine Beteiligung von IL-22 an dieser Erkrankung diskutiert wird [467, 468]. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von IL-22 an dieser Erkrankung ist die Beobachtung, dass sich hohe Konzentrationen von IL-22 in psoriatischer Haut sowie erhöhte Konzentrationen im Plasma von Psoriasis Patienten finden lassen. Hierbei korreliert die Höhe der IL-22 Konzentration im Plasma mit dem Schweregrad der Erkrankung [469].

Interessanterweise konnte unabhängig davon ebenfalls gezeigt werden dass Psoriasis durch eine Hyperleptinämie gekennzeichnet ist [470]. Psoriasis ist somit gekennzeichnet durch hohe Leptin als auch IL-22 Konzentrationen. Die vorliegende Studie zeigte eine Induktion von IL-22 durch L. Interessanterweise erhöht Übergewicht, welches mit erhöhten Leptin-Konzentrationen assoziiert ist das Risiko von Psoriasis um ein 4,5 Faches [218]. Durch eine Erhöhung von IL-22 ist Leptin möglicherweise ein direkter kausaler Faktor für die erhöhte Prävalenz von Psoriasis in Übergewichtigen.

Keine Proliferationshemmung durch Leptin in memory T-Zellen

Für Leptin ist eine Proliferationshemmung in memory T-Zellen beschrieben, welche hingegen in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden konnte. Möglich wäre auch hier, dass ein Leptin zugeschriebener Effekt auf einer synergistischen Wirkung von Leptin mit einem weiteren Faktor, möglicherweise 17 β -Östradiol, in normalem Medium zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Studie konnte nur eine Proliferationshemmung durch 17 β -Östradiol beobachtet werden. Diese konnte hingegen nicht durch Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin gesteigert werden. Hierbei wäre möglich wäre, dass 17 β -Östradiol in pharmakologischen Konzentrationen bereits eine maximale Hemmung zeigte und somit ein weiterer Leptin-Effekt überdeckt wurde. Gleichzeitig wäre es möglich, dass es sich bei dem für die

Proliferationshemmung verantwortlichen Kofaktor um einen weiteren unbekanntem Faktor handelt.

Fazit: Immunstimulatorische Rolle von 17 β -Östradiol und Leptin an epithelialen Barrieren und Th2-hemmender Effekt von Leptin

Zusammengefasst lässt sich somit unter 17 β -Östradiol und Leptin Inkubation eine Verschiebung des Zytokinprofils hin zu einer immunstimulatorischen Wirkung an epithelialen Barrieren beobachten. Dies zeigte sich nicht unter alleiniger Leptin-Inkubation oder Koinkubation von Testosteron und Leptin. Das könnte für eine synergistische Rolle von 17 β -Östradiol und Leptin an epithelialen Barrieren sprechen.

Wie bereits beschrieben lassen sich bis zu 65 % des Fettes Normalgewichtiger subkutan finden. Möglicherweise dient es hier nicht nur zur Wärmespeicherung sondern ebenfalls zur Steuerung der Immunantwort und ist beteiligt an der epithelialen Barrierefunktion. Alleinig induziert Leptin nur das eher als protektiv einzuordnende IL-22. Unter Koinkubation von Leptin mit 17 β -Östradiol hingegen werden weitere proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-17 induziert, welche wiederum die Wirkung von IL-22 in Richtung proinflammatorischer Effekte verändern können [459]. IL-17 und IL-22 wiederum nehmen eine wichtige Rolle an epithelialen Barrieren ein [459]. Eine Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin induziert damit ein proinflammatorisches Zytokinprofil an epithelialen Barrieren.

Zudem lässt sich für Leptin alleinig als auch unter Koinkubation eine IL-13 Hemmung beobachten. Diese könnte möglicherweise ursächlich für die verstärkte Assoziation zu intrinsischem Asthma bei Adipositas sein [471, 472]. Die Th1-Stimulation durch Koinkubation von 17 β -Östradiol und Leptin könnte weiter den stärkeren Zusammenhang von Asthma und Übergewicht im weiblichen Geschlecht erklären.

Im Gegensatz zum weiblichen Geschlecht, dem generell eine stärkere Immunantwort zugeschrieben wird, ist Adipositas durch eine in Teilen erhöhte Infektanfälligkeit gekennzeichnet [207]. 17 β -Östradiol hat sowohl das Th1-spezifische Zytokin IFN- γ als auch das speziell für die humorale Immunantwort wichtige Th2-spezifische Zytokin IL-13 induziert. Dies könnte ursächlich für die verbesserte Immunantwort des weiblichen Geschlechts unabhängig vom Pathogen sein.

Leptin zeigte hemmende Effekte auf Th2- und einseitig stimulierende Effekte auf Th1-spezifische Zytokine, womit eine inadäquate humorale Immunantwort einhergehen könnte. Dies könnte mitursächlich für die erhöhte Infektanfälligkeit bei Adipositas sein.

7.3 Bedeutung der Analyse extrinsischer und intrinsischer immunmodulatorischer Faktoren

Aktuell rückt die Thematik der sogenannten individualisierten Medizin immer mehr in den Vordergrund. Das Ziel dieser ist es, dem Patienten nach individuellen Gegebenheiten, zu denen intrinsische Faktoren aber auch Umwelteinflüsse gehören, ein maßgeschneidertes Präventions- und Therapieverfahren zu entwickeln. Dabei sollen die Nebenwirkungen von Arzneien minimiert werden und in Folge ein deutlich verbesserter Therapieerfolg erzielt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung dieses Therapieansatz auf, indem sie darlegt, dass sowohl extrinsische Faktoren, u. a. die veränderten Umweltbedingungen der Urbanisierung, als auch verschiedene intrinsische Faktoren (z. B. Hormone) Einfluss auf die Immunantwort nehmen und somit Risiko- und Ausprägung bestimmter Erkrankungen beeinflussen können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ozon im Zusammenhang mit der Pollenallergenität steht. Damit kann angenommen werden, dass ein verändertes Risiko einer Sensibilisierung gegenüber dem Pollen als auch eine veränderte Symptomatik unter veränderten Ozonbedingungen besteht. Niedrigere Ozonkonzentrationen, wie sie eher in Städten zu finden, stehen hierbei mit höheren Konzentrationen an PGE₂-kreuzreaktiven Substanzen und einer verstärkten Th1-Hemmung in Verbindung. Sie begünstigen somit eher eine Th2-gerichtete, allergiefördernde Immunantwort, also die Sensibilisierung oder Allergieentstehung. Hohe Ozonkonzentrationen, wie sie eher auf dem Land zu finden und aufgrund des Klimawandels verstärkt in den nächsten Dekaden zu erwarten sind, stehen dahingehend über eine höhere immunstimulatorische Kapazität und höhere Allergengehalte mit einer Aggravation der Symptomatik in Verbindung. Höhere Allergengehalte führen zu einer verstärkten Aktivierung von Mastzellen, haben damit in der Frühphase, mit Ausschüttung kurzlebiger Mediatoren wie Histamin, eine verstärkte Soforttypsymptomatik zur Folge. Diese wurde in der vorliegenden Studie in der Pricktestung in Form einer größeren Quaddelbildung sichtbar. In Folge kann gleichzeitig eine verstärkte Spätphase mit höherer Rekrutierung von Leukozyten, wie Neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen Granulozyten und Th2-Zellen angenommen werden.

Parallel kann angenommen werden, dass durch Ozon in Pollen auch verstärkt Allergen-unabhängige chemoattraktische Faktoren gebildet werden, welche ebenfalls zu einer verstärkten Migration von Neutrophilen Granulozyten beitragen. Ein Effekt der in den Migrationsassays mit Neutrophilen Granulozyten von Nicht-Atopikern sichtbar wurde.

„Hoch-Ozon“ belastete Pollen würden somit über zwei Wege zur verstärkten Rekrutierung von Leukozyten beitragen. Zum einen direkt über Allergen-unabhängigen Faktoren aus Pol-

len und zum anderen indirekt über höhere Allergengehalte, welche zur verstärkten Mastzellaktivierung und somit zur Verstärkten Rekrutierung beitragen.

Auch B-Zellen werden durch Antigen-Aktivierung zur weiteren IgE Synthese angeregt und IgE ist ein positiver Regulator der FcεR-Expression. Geht man von einer dauerhaften Exposition mit „Hoch-Ozon“ belasteten Pollen aus, könnte dies somit zu einer deutlichen Aggravation der Symptomatik im Vergleich zu „Niedrig-Ozon“ belasteten Pollen führen.

Der zweite Teil der vorliegenden Studie konnte weiter zeigen, dass ebenfalls intrinsische Faktoren wie Sexualhormone, aber auch Adipokine, Einfluss auf die Immunantwort besitzen. Es konnte beobachtet werden, dass das Östrogen 17β-Östradiol zur Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils führt und tolerogene Wirkungen vermindert. Damit sind Hinweise gegeben, dass für das weibliche Geschlecht, ein erhöhtes Risiko für fehlgeleitete Immunantworten besteht. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie in memory T-Zellen deuten hingegen ebenfalls an, dass nicht nur die Sensibilisierung begünstigt, sondern ebenfalls die Symptomatik durch 17β-Östradiol verstärkt wird.

Des Weiteren konnte eine synergistische Wirkung von 17β-Östradiol mit dem Adipokin Leptin beobachtet werden. Höhere Leptinkonzentrationen in Frauen könnten somit mitverantwortlich für die unterschiedlichen Immunantworten zwischen den Geschlechtern sein. Zudem könnte hypothetisiert werden, dass Adipokine unterschiedliche Risikofaktoren im männlichen und weiblichen Geschlecht darstellen und Adipositas das Risiko für fehlgeleitete Immunantworten im weiblichen Geschlecht nochmals erhöht.

In der Gesamtheit besteht eine Vielzahl von Einflüssen auf das Immunsystem. Fraglich bleibt hingegen wie diese zusammenwirken. Eine interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang ist u. a. wie Adipositas, in der das Th1-stimulierende Adipokin Leptin erhöht ist, die Entwicklung Th2-dominierter Erkrankungen beeinflusst. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IgE bei adipösen Frauen im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen erhöht ist [473]. Eine Beobachtung, die für das Zusammenwirken mehrerer intrinsischer Faktoren spricht. Das in Adipositas erhöhte Leptin wird hingegen verstärkt mit einer Th1-gewichteten Immunitätslage in Verbindung gebracht [273, 285]. Dieser Zusammenhang würde zunächst gegen eine Erhöhung der IgE Konzentration in adipösen Frauen sprechen und wirft die Frage auf, wie mehrere intrinsische Faktoren in Entstehung als auch Ausprägung bestimmter Erkrankungen zusammenwirken. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Leptin synergistische Wirkungen mit dem Östrogen 17β-Östradiol entfalten kann und dessen Wirkung verstärkt. Möglich wäre somit, dass obwohl Leptin alleinig einen Th1-stimulierenden Effekt hat - sofern bereits eine Th2-dominierte Erkrankung und erhöhte Östrogen-Konzentrationen vorliegen - über eine Verstärkung des Östrogen-Effektes auch Th2-dominierte Erkrankungen aggraviert werden.

Dies ist ein Beispiel für ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren, welches deutlich macht, dass eine parallele, detaillierte und umfassende Analyse extrinsischer als auch intrinsischer Faktoren nötig ist, um individuelle Risikoeinschätzungen für Erkrankungen differenziert nach Entstehung als auch Ausprägung vorzunehmen und zu beurteilen. Bei Erhebung und Betrachtung möglicher Risikofaktoren und Prognosen für zukünftige Ereignisse kommt der parallelen Analyse beider Bereiche eine maßgebliche Bedeutung zu.

8 Literatur

1. Ring, J., et al., *Why are allergies increasing?* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(6): p. 701-8.
2. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 407-444.
3. Henke, K.D., Martin, K., Behrens, C., *Direkte und indirekte Kosten von Krankheiten in der Bundesrepublik Deutschland 1980 und 1990*. Zeitschrift für Gesundheitswissenschaften, 1997. **5**: p. 123-145.
4. Ring, J., *Ist description of an "atopic family anamnesis" in the Julio-Claudian imperial house: Augustus, Claudius, Britannicus*. Hautarzt, 1985. **36**(470).
5. Bukantz, S.C., *Clemens von Pirquet and the concept of allergie*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(4): p. 724-6.
6. Ring, J., ed. *Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. Geschichtliche Entwicklung*, ed. A. Allergologie. Vol. 2. 1995, MMW Taschenbuch: München.
7. Gell PGH, C.R., ed. *Clinical Aspects of Immunology*. . Blackwell: Oxford.
8. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 407-423.
9. Abul K. Abbas, A.H.L., Shiv Pillai, ed. *Cellular and Molecular Immunology*. 7 ed., ed. E. Saunders. 2012: Philadelphia.
10. Behrendt, H., et al., *Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **113**(1-3): p. 69-74.
11. Reece, N.A.C.J.B., *Biologie*. Vol. 6. 1997: Spektrum.
12. Ring, J., *Angewandte Allergologie*. Vol. 3. 2003.
13. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 425-444.
14. Charles A. Janeway, P.T., Mark Walport, Mark Shlomchik, ed. *Immunologie*. Vol. 5. 2002, Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg Berlin. 506.
15. Woolcock, A.J., et al., *The burden of asthma in Australia*. Med J Aust, 2001. **175**(3): p. 141-5.
16. Wuthrich, B., *Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase?* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989. **90 Suppl 1**: p. 3-10.
17. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
18. Hirsch, T., et al., *Inner city air pollution and respiratory health and atopy in children*. Eur Respir J, 1999. **14**(3): p. 669-77.
19. Behrendt, H., et al., *The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases*. Progress in Allergy and Clinical Immunology Volume 3, Stockholm, 1995. **3**: p. 83-89.

20. Muranaka, M., et al., *Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice*. J Allergy Clin Immunol, 1986. **77**(4): p. 616-23.
21. Ring, J., et al., *Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 403-7.
22. Frampton, M.W., et al., *Effects of ozone on normal and potentially sensitive human subjects. Part II: Airway inflammation and responsiveness to ozone in nonsmokers and smokers*. Res Rep Health Eff Inst, 1997(78): p. 39-72; discussion 81-99.
23. Blomberg, A., et al., *The inflammatory effects of 2 ppm NO₂ on the airways of healthy subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 418-24.
24. Ring, J., B. Eberlein-Koenig, and H. Behrendt, *Environmental pollution and allergy*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2001. **87**(6 Suppl 3): p. 2-6.
25. Behrendt, H., et al., *Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization*. International Archives of Allergy and Immunology, 2001. **124**(1-3): p. 121-125.
26. Diaz-Sanchez, D., *The role of diesel exhaust particles and their associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease*. Allergy, 1997. **52**(38 Suppl): p. 52-6; discussion 57-8.
27. Martinez, F.D., et al., *Parental smoking enhances bronchial responsiveness in nine-year-old children*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(3): p. 518-23.
28. Schafer, T., et al., *Maternal smoking during pregnancy and lactation increases the risk for atopic eczema in the offspring*. J Am Acad Dermatol, 1997. **36**(4): p. 550-6.
29. Diaz-Sanchez, D., et al., *In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans*. Clin Immunol, 2000. **97**(2): p. 140-5.
30. Diaz-Sanchez, D., et al., *Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(6): p. 1183-8.
31. Fujieda, S., D. Diaz-Sanchez, and A. Saxon, *Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces In vivo IgE isotype switching*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(3): p. 507-12.
32. Diaz-Sanchez, D., et al., *Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2406-13.
33. Diaz-Sanchez, D., et al., *Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(1): p. 114-23.
34. Franze, T., et al., *Protein nitration by polluted air*. Environ Sci Technol, 2005. **39**(6): p. 1673-8.
35. Gruijthuisen, Y.K., et al., *Nitration enhances the allergenic potential of proteins*. Int Arch Allergy Immunol, 2006. **141**(3): p. 265-75.
36. Ahmad Majid, A.C., Mostafa Moin, Mansour Gholami, Shigekatsu Kohno, Takeshi Nabe & M.A. Shariatzadeh, *The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollengrains*. Aerobiologia 2004. **200**: p. 111-118.
37. Solomon, W.R., H.A. Burge, and M.L. Mulenberg, *Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions*. J Allergy Clin Immunol, 1983. **72**(5 Pt 1): p. 443-7.

38. Habenicht, H.A., et al., *Allergen carriage by atmospheric aerosol. II. Ragweed-pollen determinants in submicronic atmospheric fractions*. J Allergy Clin Immunol, 1984. **74**(1): p. 64-7.
39. Stewart, G.A. and P.G. Holt, *Submicronic airborne allergens*. Med J Aust, 1985. **143**(9): p. 426-7.
40. Spieksma, F.T., et al., *Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction*. Clin Exp Allergy, 1990. **20**(3): p. 273-80.
41. Takahashi, Y., et al., *Existence of exine-free airborne allergen particles of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen*. Allergy, 1991. **46**(8): p. 588-93.
42. Bartra, J., et al., *Air pollution and allergens*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2007. **17 Suppl 2**: p. 3-8.
43. Morgenstern, V., et al., *Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(12): p. 1331-7.
44. Masuch, G.I., et al., *Ozone increases group 5 allergen content of *Lolium perenne**. Allergy, 1997. **52**(8): p. 874-5.
45. Eckl-Dorna, J., et al., *Exposure of rye (*Secale cereale*) cultivars to elevated ozone levels increases the allergen content in pollen*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(6): p. 1315-7.
46. A. Guedes, N.R., H.Ribeiro, M.Oliveira, F.Noronha, I.Abreu., *Comparison between urban and rural pollen of *Chenopodium alba* and characterization of adhered-pollutant aerosol particles* Aerosol Science 2009. **40**: p. 81-86.
47. *The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains*.
48. D'Amato, G., *Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(5): p. 628-36.
49. Riedler, J., et al., *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 194-200.
50. Traidl-Hoffmann, C., T. Jakob, and H. Behrendt, *Determinants of allergenicity*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(3): p. 558-66.
51. Dharajiya, N., et al., *Role of pollen NAD(P)H oxidase in allergic inflammation*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2008. **8**(1): p. 57-62.
52. Matsumura, Y., *Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells*. J Allergy (Cairo). **2012**: p. 903659.
53. Gilles, S., et al., *Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(2): p. 454-461 e1-9.
54. Gilles, S., et al., *Pollen-derived low-molecular weight factors inhibit 6-sulfo Lac-NAc+ dendritic cells' capacity to induce T-helper type 1 responses*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(2): p. 269-78.
55. Gutermuth, J., et al., *Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytosteranes on primary immune responses in vivo*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 293-9.
56. Mariani, V., et al., *Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7623-31.

57. Plotz, S.G., et al., *Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(6): p. 1152-60.
58. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(5): p. 831-8.
59. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 627-36.
60. Griendling, K.K., *NADPH oxidases: new regulators of old functions*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1443-5.
61. Potocky, M., et al., *Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth*. New Phytol, 2007. **174**(4): p. 742-51.
62. Cardenas, L., et al., *NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth*. Plant Physiol, 2006. **142**(4): p. 1460-8.
63. Gunawan, H., et al., *Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed*. Allergol Int, 2008. **57**(1): p. 83-91.
64. Gunawan, H., et al., *Characterization of proteases, proteins, and eicosanoid-like substances in soluble extracts from allergenic pollen grains*. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **147**(4): p. 276-88.
65. Behrendt, H., et al., *Pollen grains contain and release not only allergens, but also eicosanoid-like substances with neutrophil chemotactic activity: A new step in the initiation of allergic sensitization?* New Trends in Allergy V, 2002: p. 3-8.
66. Biesalski H. K., P.G., ed. *Taschenatlas der Ernährung*. Vol. 4. 2007, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. 108.
67. Harizi, H., J.B. Corcuff, and N. Gualde, *Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology*. Trends Mol Med, 2008. **14**(10): p. 461-9.
68. Biesalski H. K., P.G., ed. *Taschenatlas Ernährung*. Vol. 4. 2007, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. 108-111.
69. De Caterina R., B.G., *n-3 Fatty acids and the inflammatory response — biological background*. European Heart Journal Supplements, 2001. **3**.
70. R. De Caterina, G.B., *n-3 Fatty acids and the inflammatory response — biological background*. European Heart Journal Supplements, 2001. **3**.
71. Rehner G., D.H., ed. *Biochemie der Ernährung*. Vol. 1. 1999, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg Berlin. 149-152.
72. Jfdwolff. 2007. p. Ghost of w:Image:Eicosanoid_synthesis.png.
73. Yokomizo, T., et al., *A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 620-4.
74. Yokomizo, T., et al., *A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 421-32.
75. Ford-Hutchinson, A.W., et al., *Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes*. Nature, 1980. **286**(5770): p. 264-5.
76. Yokomizo, T., et al., *Leukotriene B4 receptor. Cloning and intracellular signaling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 2): p. S51-5.

77. Palmblad, J., et al., *Effects of leukotrienes and f-Met-Leu-Phe on oxidative metabolism of neutrophils and eosinophils*. J Immunol, 1984. **132**(6): p. 3041-5.
78. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2002. **109**(5): p. 831-838.
79. Plotz, S.G., et al., *Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2004. **113**(6): p. 1152-1160.
80. Harris, S.G., et al., *Prostaglandins as modulators of immunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 144-50.
81. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors*. J Biol Chem, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
82. Ushikubi, F., et al., *Roles of prostanoids revealed from studies using mice lacking specific prostanoid receptors*. Jpn J Pharmacol, 2000. **83**(4): p. 279-85.
83. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
84. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(3): p. 387-437.
85. Legler, D.F., et al., *Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 966-73.
86. van Helden, S.F., et al., *A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1567-74.
87. Krause, P., et al., *Prostaglandin E(2) enhances T-cell proliferation by inducing the costimulatory molecules OX40L, CD70, and 4-1BBL on dendritic cells*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2451-60.
88. Mauer, J., et al., *Effect of PGE2 and of agents that raise cAMP levels on macrophage activation induced by IFN-gamma and TNF-alpha*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(2): p. 217-24.
89. Cipollone, F., et al., *Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability*. Circulation, 2001. **104**(8): p. 921-7.
90. Mannie, M.D., K.D. Prevost, and C.A. Marinakis, *Prostaglandin E2 promotes the induction of anergy during T helper cell recognition of myelin basic protein*. Cell Immunol, 1995. **160**(1): p. 132-8.
91. Bryn, T., et al., *LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism*. Int Immunol, 2008. **20**(2): p. 235-45.
92. Mahic, M., et al., *FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 246-54.
93. Martinet, L., et al., *PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling*. Biochem Pharmacol. **80**(6): p. 838-45.
94. Yao, C., et al., *Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 633-40.

95. Betz, M. and B.S. Fox, *Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines*. J Immunol, 1991. **146**(1): p. 108-13.
96. Snijdewint, F.G., et al., *Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5321-9.
97. Demeure, C.E., et al., *Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3526-31.
98. Rubio, M.T., et al., *Maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) in the presence of prostaglandin E2 optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens: role of PGE2 in chemokine and cytokine expression by MoDCs*. Int Immunol, 2005. **17**(12): p. 1561-72.
99. Khayrullina, T., et al., *In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 721-35.
100. Sheibanie, A.F., et al., *Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells*. FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1318-20.
101. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 561-7.
102. Novak, N. and T. Bieber, *The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2005. **53**(2 Suppl 2): p. S171-6.
103. Novak, N., et al., *FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(5): p. 949-57.
104. Sallusto, F., et al., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, 1998. **28**(9): p. 2760-9.
105. Hasko, G., et al., *Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 759-70.
106. Brown, R.A., D. Spina, and C.P. Page, *Adenosine receptors and asthma*. Br J Pharmacol, 2008. **153** Suppl 1: p. S446-56.
107. Linden, J., *Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 775-87.
108. Bours, M.J., et al., *Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(2): p. 358-404.
109. Cronstein, B.N., *Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent*. J Appl Physiol, 1994. **76**(1): p. 5-13.
110. Kamboj, R.K. and J.F. Jackson, *Purine Nucleoside Transport in Petunia Pollen Is an Active, Carrier-Mediated System Not Sensitive to Nitrobenzylthioinosine and Not Renewed during Pollen Tube Growth*. Plant Physiol, 1987. **84**(3): p. 688-91.
111. Kamboj, R.K. and J.F. Jackson, *Pyrimidine nucleoside uptake by petunia pollen: specificity and inhibitor studies on the carrier-mediated transport*. Plant Physiol, 1985. **79**(3): p. 801-5.
112. Wu, J., et al., *Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2007. **144**(2): p. 961-75.
113. Demidchik, V., et al., *Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels*. Plant J, 2009. **58**(6): p. 903-13.

114. Demidchik, V., et al., *Is ATP a signaling agent in plants?* Plant Physiol, 2003. **133**(2): p. 456-61.
115. Reichler, S.A., et al., *Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide.* J Exp Bot, 2009. **60**(7): p. 2129-38.
116. Gilles, S., et al., *Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H)2-dominated response.* Allergy Asthma Clin Immunol, 2009. **5**(1): p. 3.
117. Cookson, W., *The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 978-88.
118. Weidinger, S., et al., *Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): p. 1203-1209 e1.
119. Denman, A.M., *Sex hormones, autoimmune diseases, and immune responses.* BMJ, 1991. **303**(6793): p. 2-3.
120. Ansar Ahmed, S., W.J. Penhale, and N. Talal, *Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action.* Am J Pathol, 1985. **121**(3): p. 531-51.
121. Chen, W., et al., *Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions.* Allergy, 2008. **63**(11): p. 1418-27.
122. Axelsson, J., et al., *Adipose tissue and its relation to inflammation: the role of adipokines.* J Ren Nutr, 2005. **15**(1): p. 131-6.
123. Conde, J., et al., *Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity.* Biofactors. **37**(6): p. 413-20.
124. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
125. Fernandez-Riejos, P., et al., *Role of leptin in the activation of immune cells.* Mediators Inflamm. **2010**: p. 568343.
126. Lenz, M., T. Richter, and I. Muhlhauser, *The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review.* Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(40): p. 641-8.
127. Ahmed, S.A., et al., *Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds.* Environ Health Perspect, 1999. **107 Suppl 5**: p. 681-6.
128. Yu, C.Y. and C.C. Whitacre, *Sex, MHC and complement C4 in autoimmune diseases.* Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 694-9.
129. Becklake, M.R. and F. Kauffmann, *Gender differences in airway behaviour over the human life span.* Thorax, 1999. **54**(12): p. 1119-38.
130. DunnGalvin, A., et al., *Incorporating a gender dimension in food allergy research: a review.* Allergy, 2006. **61**(11): p. 1336-43.
131. Lovik, M., *[Mustard--an important food allergen?]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2005. **125**(6): p. 736-8.
132. Schafer, T., et al., *Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy.* Allergy, 2001. **56**(12): p. 1172-9.
133. Bender, A.E. and D.R. Matthews, *Adverse reactions to foods.* Br J Nutr, 1981. **46**(3): p. 403-7.
134. Webb, L.M. and P. Lieberman, *Anaphylaxis: a review of 601 cases.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2006. **97**(1): p. 39-43.

135. Marriott, I. and Y.M. Huet-Hudson, *Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms*. Immunol Res, 2006. **34**(3): p. 177-92.
136. Olsen, N.J. and W.J. Kovacs, *Gonadal steroids and immunity*. Endocr Rev, 1996. **17**(4): p. 369-84.
137. Angele, M.K., et al., *Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock*. Shock, 2000. **14**(2): p. 81-90.
138. Friedman, D., F. Netti, and A.D. Schreiber, *Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes*. J Clin Invest, 1985. **75**(1): p. 162-7.
139. Liu, L., et al., *Modulation of Leishmania donovani infection and cell viability by testosterone in bone marrow-derived macrophages: signaling via surface binding sites*. Steroids, 2005. **70**(9): p. 604-14.
140. Benyamini, Y., E.A. Leventhal, and H. Leventhal, *Gender differences in processing information for making self-assessments of health*. Psychosom Med, 2000. **62**(3): p. 354-64.
141. Kiriyaama, K., H. Sugiura, and M. Uehara, *Premenstrual deterioration of skin symptoms in female patients with atopic dermatitis*. Dermatology, 2003. **206**(2): p. 110-2.
142. Vrieze, A., D.S. Postma, and H.A. Kerstjens, *Perimenstrual asthma: a syndrome without known cause or cure*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(2): p. 271-82.
143. Beck, S.A., *Asthma in the female: hormonal effect and pregnancy*. Allergy Asthma Proc, 2001. **22**(1): p. 1-4.
144. Salam, M.T., M. Wenten, and F.D. Gilliland, *Endogenous and exogenous sex steroid hormones and asthma and wheeze in young women*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 1001-7.
145. Butterworth, M., B. McClellan, and M. Allansmith, *Influence of sex in immunoglobulin levels*. Nature, 1967. **214**(5094): p. 1224-5.
146. Eidinger, D. and T.J. Garrett, *Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation*. J Exp Med, 1972. **136**(5): p. 1098-116.
147. Lichtman, M.A., J.H. Vaughan, and C.G. Hames, *The distribution of serum immunoglobulins, anti-gamma-G globulins ("rheumatoid factors") and antinuclear antibodies in White and Negro subjects in Evans County, Georgia*. Arthritis Rheum, 1967. **10**(3): p. 204-15.
148. Kanda, N. and K. Tamaki, *Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 282-8.
149. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 1996. **106**(2): p. 410-5.
150. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1703-11.
151. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(2): p. 328-37.
152. Poulin, R., *Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male?* Am Nat, 1996 **147**: p. 287-295.

153. Moore, S.L. and K. Wilson, *Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2015-8.
154. Brabin, L., *Sex differentials in susceptibility to lymphatic filariasis and implications for maternal child immunity*. Epidemiol Infect, 1990. **105**(2): p. 335-53.
155. Fedigan, L.M. and S. Zohar, *Sex differences in mortality of Japanese macaques: twenty-one years of data from the Arashiyama West population*. Am J Phys Anthropol, 1997. **102**(2): p. 161-75.
156. Bijlsma, J.W., et al., *The neuroendocrine immune basis of rheumatic diseases*. Immunol Today, 1999. **20**(7): p. 298-301.
157. Schuur, A.H. and H.A. Verheul, *Effects of gender and sex steroids on the immune response*. J Steroid Biochem, 1990. **35**(2): p. 157-72.
158. Singh, M., J.A. Dykens, and J.W. Simpkins, *Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(5): p. 514-21.
159. Setters, D.R.a.M.H.d.f.p.v.b.H.a., *Steroidogenesis*. 2009.
160. Carreau, S., et al., *Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 35.
161. Smith, C.L., *Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways*. Biol Reprod, 1998. **58**(3): p. 627-32.
162. Deroo, B.J. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 561-70.
163. Benten, W.P., C. Stephan, and F. Wunderlich, *B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol*. Steroids, 2002. **67**(7): p. 647-54.
164. Bouman, A., M.J. Heineman, and M.M. Faas, *Sex hormones and the immune response in humans*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(4): p. 411-23.
165. Cutolo, M., et al., *Synovial fluid estrogens in rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2004. **3**(3): p. 193-8.
166. Nilsson, S., et al., *Mechanisms of estrogen action*. Physiol Rev, 2001. **81**(4): p. 1535-65.
167. Yaghmaie, F., et al., *Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the pre-optic hypothalamus of female B6D2F1 mice*. Neuro Endocrinol Lett, 2005. **26**(3): p. 197-203.
168. Babiker, F.A., et al., *Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 709-19.
169. Hall, J.M. and D.P. McDonnell, *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5566-78.
170. Weihua, Z., et al., *Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5936-41.
171. Schneider, C.P., et al., *The aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione, restores immune responses following trauma-hemorrhage in males and decreases mortality from subsequent sepsis*. Shock, 2000. **14**(3): p. 347-53.
172. Kurebayashi, J., et al., *Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(10): p. 1093-101.

173. Stoner, M., et al., *Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(10): p. 2231-42.
174. Tamir, S., S. Izrael, and J. Vaya, *The effect of oxidative stress on ERalpha and ER-beta expression*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. **81**(4-5): p. 327-32.
175. Ishizuka, M., et al., *Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(3): p. 293-300.
176. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 521-74.
177. Hu, S.K., Y.L. Mitcho, and N.C. Rath, *Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages*. Int J Immunopharmacol, 1988. **10**(3): p. 247-52.
178. Correale, J., M. Arias, and W. Gilmore, *Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3365-74.
179. Kassi, E. and P. Moutsatsou, *Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus*. J Biomed Biotechnol. **2010**: p. 317452.
180. Michels, G. and U.C. Hoppe, *Rapid actions of androgens*. Front Neuroendocrinol, 2008. **29**(2): p. 182-98.
181. Kamanga-Sollo, E., et al., *Potential role of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30) in estradiol-17beta-stimulated IGF-I mRNA expression in bovine satellite cell cultures*. Domest Anim Endocrinol, 2008.
182. Duval, D., S. Durant, and F. Homo-Delarche, *Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions*. Biochim Biophys Acta, 1983. **737**(3-4): p. 409-42.
183. Willmer, E.N., *Steroids and cell surfaces*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1961. **36**: p. 368-98.
184. Levin, E.R., *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(8): p. 1951-9.
185. Switalska, M. and L. Strzadala, *[Non-genomic action of estrogens]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2007. **61**: p. 541-7.
186. Adams, J. (2004) *Scratching the Surface for Estrogen's Effects*.
187. Singh, R., et al., *Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors*. Endocrinology, 2006. **147**(1): p. 141-54.
188. Sinha-Hikim, I., et al., *Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(10): p. 5245-55.
189. Giammanco, M., et al., *Testosterone and aggressiveness*. Med Sci Monit, 2005. **11**(4): p. RA136-45.
190. Roy, A.K., et al., *Regulation of androgen action*. Vitam Horm, 1999. **55**: p. 309-52.
191. Wilson, C.M. and M.J. McPhaul, *A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(4): p. 1234-8.
192. Lu, N.Z., et al., *International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(4): p. 782-97.

193. Bardin, C.W., et al., *Progestins can mimic, inhibit and potentiate the actions of androgens*. *Pharmacol Ther*, 1983. **23**(3): p. 443-59.
194. Pandini, G., et al., *Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(5): p. 1849-57.
195. Muehlenbein, M.P. and R.G. Bribiescas, *Testosterone-mediated immune functions and male life histories*. *Am J Hum Biol*, 2005. **17**(5): p. 527-58.
196. Spratt, D.I., *Altered gonadal steroidogenesis in critical illness: is treatment with anabolic steroids indicated?* *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2001. **15**(4): p. 479-94.
197. Spratt, D.I., et al., *Reproductive axis suppression in acute illness is related to disease severity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. **76**(6): p. 1548-54.
198. Muehlenbein, M.P., D.P. Watts, and P.L. Whitten, *Dominance rank and fecal testosterone levels in adult male chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda*. *Am J Primatol*, 2004. **64**(1): p. 71-82.
199. Lister, A. and G. Van Der Kraak, *Modulation of goldfish testicular testosterone production in vitro by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and macrophage conditioned media*. *J Exp Zool*, 2002. **292**(5): p. 477-86.
200. Ogilvie, K.M., et al., *The inhibitory effect of intracerebroventricularly injected interleukin 1beta on testosterone secretion in the rat: role of steroidogenic acute regulatory protein*. *Biol Reprod*, 1999. **60**(2): p. 527-33.
201. Friedl, R., et al., *Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages*. *Life Sci*, 2000. **68**(4): p. 417-29.
202. Chao, T.C., et al., *Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages*. *Cell Immunol*, 1995. **160**(1): p. 43-9.
203. Straub, R.H. and M. Cutolo, *Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(3): p. 493-507.
204. Grossman, C.J., G.A. Roselle, and C.L. Mendenhall, *Sex steroid regulation of autoimmunity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1991. **40**(4-6): p. 649-59.
205. Wunderlich, F., et al., *Testosterone signaling in T cells and macrophages*. *Steroids*, 2002. **67**(6): p. 535-8.
206. Chandra, R.K., *Nutrition and the immune system: an introduction*. *Ame J Clin Nutr*, 1997. **66**: p. 460-463.
207. Karlsson, E.A. and M.A. Beck, *The burden of obesity on infectious disease*. *Exp Biol Med (Maywood)*. **235**(12): p. 1412-24.
208. Kopelman, P., *Health risks associated with overweight and obesity*. *Obes Rev*, 2007. **8 Suppl 1**: p. 13-7.
209. Matthias Lenz, T.R., Ingrid Mühlhauser, *Dtsch Arztebl Int* 2009. **106**((40)): p. 641-8.
210. Biesalski H. K., P.G., ed. *Taschenatlas Ernährung*. Vol. 4. 2007, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. 348.
211. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
212. Powell, K., *Obesity: the two faces of fat*. *Nature*, 2007. **447**(7144): p. 525-7.

213. H. Hauner (federführend), G.B., A. Hamann, B. Husemann, B. Koletzko, H. Liebermeister, M. Wabitsch, J. Westenhöfer, A. Wirth, G. Wolfram (2007) *Evidenzbasierte Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas*.
214. Stunkard, A.J., et al., *The body-mass index of twins who have been reared apart*. N Engl J Med, 1990. **322**(21): p. 1483-7.
215. Stunkard, A.J., et al., *An adoption study of human obesity*. N Engl J Med, 1986. **314**(4): p. 193-8.
216. Field, A.E., et al., *Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period*. Arch Intern Med, 2001. **161**(13): p. 1581-6.
217. Camargo, C.A., Jr., et al., *Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women*. Arch Intern Med, 1999. **159**(21): p. 2582-8.
218. Hemminki, K., et al., *Risk of asthma and autoimmune diseases and related conditions in patients hospitalized for obesity*. Ann Med. **44**(3): p. 289-95.
219. Wadden, T.A., et al., *Randomized trial of lifestyle modification and pharmacotherapy for obesity*. N Engl J Med, 2005. **353**(20): p. 2111-20.
220. Dolan, C.M., et al., *Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2004. **92**(1): p. 32-9.
221. von Mutius, E., et al., *Relation of body mass index to asthma and atopy in children: the National Health and Nutrition Examination Study III*. Thorax, 2001. **56**(11): p. 835-8.
222. Dhabuwala, A., R.J. Cannan, and R.S. Stubbs, *Improvement in co-morbidities following weight loss from gastric bypass surgery*. Obes Surg, 2000. **10**(5): p. 428-35.
223. Dixon, J.B., L. Chapman, and P. O'Brien, *Marked improvement in asthma after Lap-Band surgery for morbid obesity*. Obes Surg, 1999. **9**(4): p. 385-9.
224. Stenius-Aarniala, B., et al., *Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study*. BMJ, 2000. **320**(7238): p. 827-32.
225. Weiss, S.T., *Obesity: insight into the origins of asthma*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 537-9.
226. Sontag, S.J., *Gastroesophageal reflux disease and asthma*. J Clin Gastroenterol, 2000. **30**(3 Suppl): p. S9-30.
227. Ruhl, C.E. and J.E. Everhart, *Overweight, but not high dietary fat intake, increases risk of gastroesophageal reflux disease hospitalization: the NHANES I Epidemiologic Followup Study. First National Health and Nutrition Examination Survey*. Ann Epidemiol, 1999. **9**(7): p. 424-35.
228. Sood, A., E.S. Ford, and C.A. Camargo, Jr., *Association between leptin and asthma in adults*. Thorax, 2006. **61**(4): p. 300-5.
229. Shore, S.A., et al., *Effect of leptin on allergic airway responses in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(1): p. 103-9.
230. Shore, S.A., *Obesity and asthma: lessons from animal models*. J Appl Physiol, 2007. **102**(2): p. 516-28.
231. Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino, *The endocrine function of adipose tissue: an update*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **64**(4): p. 355-65.

232. Turgeon, J.L., et al., *Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(6): p. 575-605.
233. Beltowski, J., *Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue*. *Med Sci Monit*, 2003. **9**(2): p. RA55-61.
234. Maffei, M., et al., *Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(15): p. 6957-60.
235. Chandran, M., et al., *Adiponectin: more than just another fat cell hormone?* *Diabetes Care*, 2003. **26**(8): p. 2442-50.
236. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(10): p. 772-83.
237. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
238. Bruun, J.M., et al., *Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(3): p. E527-33.
239. Hector, J., et al., *TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat*. *Horm Metab Res*, 2007. **39**(4): p. 250-5.
240. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
241. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 901-11.
242. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(11): p. 2347-55.
243. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
244. Curat, C.A., et al., *From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes*. *Diabetes*, 2004. **53**(5): p. 1285-92.
245. Cottam, D.R., et al., *The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss*. *Obes Surg*, 2004. **14**(5): p. 589-600.
246. Kenneth D. Burman, Y.H.O., Madhuri R. Devdhar, *Chapter 12 - ENDOCRINE FUNCTION IN OBESITY*. 2009, Endotext.com.
247. Zumoff, B., *Relationship of obesity to blood estrogens*. *Cancer Res*, 1982. **42**(8 Suppl): p. 3289s-3294s.
248. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
249. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. *Nature*, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
250. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. *Nat Med*, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
251. Morash, B., et al., *Leptin gene expression in the brain and pituitary gland*. *Endocrinology*, 1999. **140**(12): p. 5995-8.

252. Wang, J., et al., *A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 684-8.
253. Liuzzi, A., et al., *Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. **23**(10): p. 1066-73.
254. Maffei, M., et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. Nat Med, 1995. **1**(11): p. 1155-61.
255. Saad, M.F., et al., *Sexual dimorphism in plasma leptin concentration*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 579-84.
256. Meier, U. and A.M. Gressner, *Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin*. Clin Chem, 2004. **50**(9): p. 1511-25.
257. Clement, K., et al., *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction*. Nature, 1998. **392**(6674): p. 398-401.
258. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 903-8.
259. Strobel, A., et al., *A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity*. Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 213-5.
260. Bray, G.A. and D.A. York, *Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 719-809.
261. Ahima, R.S., et al., *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 250-2.
262. Campfield, L.A., et al., *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. Science, 1995. **269**(5223): p. 546-9.
263. Halaas, J.L., et al., *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. Science, 1995. **269**(5223): p. 543-6.
264. Pelleymounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. Science, 1995. **269**(5223): p. 540-3.
265. Bjorbaek, C., et al., *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30059-65.
266. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
267. Chehab, F.F., et al., *Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin*. Science, 1997. **275**(5296): p. 88-90.
268. Takeda, S., et al., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. Cell, 2002. **111**(3): p. 305-17.
269. Fehmann, H.C., et al., *Leptin inhibition of insulin secretion from isolated human islets*. Acta Diabetol, 1997. **34**(4): p. 249-52.
270. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1683-6.
271. Bernotiene, E., G. Palmer, and C. Gabay, *The role of leptin in innate and adaptive immune responses*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(5): p. 217.
272. Loffreda, S., et al., *Leptin regulates proinflammatory immune responses*. FASEB J, 1998. **12**(1): p. 57-65.

273. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
274. Lord, G.M., et al., *Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(2): p. 330-8.
275. Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. Cell Immunol, 1999. **194**(1): p. 6-11.
276. Sarraf, P., et al., *Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 171-5.
277. Bornstein, S.R., et al., *Plasma leptin levels are increased in survivors of acute sepsis: associated loss of diurnal rhythm, in cortisol and leptin secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(1): p. 280-3.
278. Grunfeld, C., et al., *Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters*. J Clin Invest, 1996. **97**(9): p. 2152-7.
279. Janik, J.E., et al., *Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(9): p. 3084-6.
280. Zarkesh-Esfahani, H., et al., *High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4593-9.
281. Papathanassoglou, E., et al., *Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7745-52.
282. Sanchez-Pozo, C., et al., *Leptin stimulates the oxidative burst in control monocytes but attenuates the oxidative burst in monocytes from HIV-infected patients*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(3): p. 464-9.
283. Sanchez-Margalet, V., et al., *Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 11-9.
284. Martin-Romero, C. and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68*. Cell Immunol, 2001. **212**(2): p. 83-91.
285. Martin-Romero, C., et al., *Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes*. Cell Immunol, 2000. **199**(1): p. 15-24.
286. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
287. Maeda, K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1)*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(2): p. 286-9.
288. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
289. Hug, C., et al., *T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10308-13.
290. Brichard, S.M., M.L. Delporte, and M. Lambert, *Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin*. Horm Metab Res, 2003. **35**(6): p. 337-42.
291. Vasseur, F., et al., *The genetics of adiponectin*. Curr Diab Rep, 2003. **3**(2): p. 151-8.

292. Masaki, T., et al., *Peripheral, but not central, administration of adiponectin reduces visceral adiposity and upregulates the expression of uncoupling protein in agouti yellow (Ay/a) obese mice*. Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2266-73.
293. Qi, Y., et al., *Adiponectin acts in the brain to decrease body weight*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 524-9.
294. Masaki, T., et al., *Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 177-84.
295. Kumada, M., et al., *Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages*. Circulation, 2004. **109**(17): p. 2046-9.
296. Wolf, A.M., et al., *Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(2): p. 630-5.
297. Wulster-Radcliffe, M.C., et al., *Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(3): p. 924-9.
298. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin*. Circulation, 1999. **100**(25): p. 2473-6.
299. Kawanami, D., et al., *Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(2): p. 415-9.
300. Shimizu, H., et al., *Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects*. J Endocrinol, 1997. **154**(2): p. 285-92.
301. Luukkaa, V., et al., *Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3243-6.
302. Adori, M., et al., *Estrogen augments the T cell-dependent but not the T-independent immune response*. Cell Mol Life Sci. **67**(10): p. 1661-74.
303. Matthias Lenz, T.R., Ingrid Mühlhauser, *Morbidität und Mortalität bei Übergewicht und Adipositas im Erwachsenenalter*. Dtsch Arztebl Int 2009. **106**(40): p. 641-8.
304. Antonio Pezzutto, T.U., Gerd-Rüdiger Burmester, *Taschenatlas der Immunologie*. Vol. 2. 2007, Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. 1.
305. Charles A. Janeway, P.T., Mark Walport, Mark Shlomchik, ed. *Immunologie*. Vol. 5. 2002, Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg Berlin. 23.
306. Ivan M. Roit, J.B., David K. Male, ed. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 1991, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York.
307. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 21-22.
308. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 225-237.
309. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *How diverse--CD4 effector T cells and their functions*. J Mol Cell Biol, 2009. **1**(1): p. 20-36.
310. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
311. Cherwinski, H.M., et al., *Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1229-44.

312. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 229-233.
313. Annunziato, F. and S. Romagnani, *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(6): p. 257.
314. Davidson, N.J., et al., *T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(1): p. 241-51.
315. Hu, H.Z., et al., *Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease*. *Immunology*, 1999. **98**(3): p. 379-85.
316. Pakala, S.V., et al., *In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1999. **189**(7): p. 1053-62.
317. Murphy, K.M., et al., *Signaling and transcription in T helper development*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 451-94.
318. Amsen, D., C.G. Spilianakis, and R.A. Flavell, *How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?* *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(2): p. 153-60.
319. Nakamura, T., et al., *Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells*. *J Immunol*, 1997. **158**(3): p. 1085-94.
320. Charles A. Janeway, P.T., Mark Walport, Mark Shlomchik, ed. *Immunologie*. ed. S.A.V. GmbH. Vol. 5. Auflage. 2002: Berlin.
321. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 297-322.
322. Pfeiffer, C., et al., *Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo*. *J Exp Med*, 1995. **181**(4): p. 1569-74.
323. Chaturvedi, P., et al., *Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells*. *Int Immunol*, 1996. **8**(5): p. 745-55.
324. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 233-236.
325. Ansel, K.M., D.U. Lee, and A. Rao, *An epigenetic view of helper T cell differentiation*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(7): p. 616-23.
326. Manetti, R., et al., *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*, 1993. **177**(4): p. 1199-204.
327. Nakamura, T., et al., *Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype*. *J Immunol*, 1997. **158**(6): p. 2648-53.
328. Hwang, E.S., et al., *T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3*. *Science*, 2005. **307**(5708): p. 430-3.
329. Mantel, P.Y., et al., *GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(12): p. e329.
330. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
331. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 236-237.

332. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
333. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
334. Chen, Z. and J.J. O'Shea, *Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells*. Immunol Res, 2008. **41**(2): p. 87-102.
335. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
336. Harrington, L.E., P.R. Mangan, and C.T. Weaver, *Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 349-56.
337. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 371-81.
338. Kleinschek, M.A., et al., *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 161-70.
339. Batten, M., et al., *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 929-36.
340. Stumhofer, J.S., et al., *Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 937-45.
341. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
342. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 319-343.
343. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
344. Yang, X.O., et al., *Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 44-56.
345. Xu, L., et al., *Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6725-9.
346. Eyerich, S., et al., *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3573-85.
347. Nogralles, K.E., et al., *IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(6): p. 1244-52 e2.
348. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 241-54.
349. Wolk, K., et al., *IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis*. Eur J Immunol, 2006. **36**(5): p. 1309-23.
350. Ricciardi, L., et al., *Increased serum levels of IL-22 in patients with nickel contact dermatitis*. Contact Dermatitis, 2009. **60**(1): p. 57-8.
351. Duhon, T., et al., *Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 857-63.

352. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
353. Wolk, K. and R. Sabat, *Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(5): p. 367-80.
354. Wolk, K., et al., *Biology of interleukin-22*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(1): p. 17-31.
355. Eyerich, S., et al., *IL-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with Candida albicans*. Eur J Immunol, 2011. **41**(7): p. 1894-901.
356. Ramirez, J.M., et al., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2450-9.
357. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
358. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.
359. Groux, H., et al., *Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 19-29.
360. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
361. DeJaco, C., et al., *Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases*. Immunology, 2006. **117**(3): p. 289-300.
362. Robinson, D.S., M. Larche, and S.R. Durham, *Tregs and allergic disease*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1389-97.
363. Pospeschill, M., ed. *SPSS für Fortgeschrittene. Durchführung fortgeschrittener statistischer Analysen*. . Vol. 7. Auflage. 2007: Saarbrücken.
364. Sillman, S., *The relation between ozone, NOx and hydrocarbons in urban and polluted rural environments*. Atmospheric Environment 1999. **33**.
365. Jes, F., *Air pollution in the last 50 years - From local to global*. Atmospheric Environment, 2009. **43**: p. 13-22.
366. Feussner, I., et al., *All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipooxygenase in vitro*. FEBS letters, 1998. **431**(3): p. 433-6.
367. Landsberg, *The Urban climate*. Academic Press, New York, 1981.
368. TR, O., ed. *Boundary layer climates*. 2 ed. 1987: Methuen, London.
369. R., O.T., *The energetic basis of the urban heat island*. Quart. J. R. Met. Soc. , 1987. **108**: p. 1-24.
370. Kuttler, W. (2004) *Stadtklima*. Teil 1: Grundzüge und Ursachen **16**, 187-199.
371. Beggs, P.J., *Impacts of climate change on aeroallergens: past and future*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(10): p. 1507-13.
372. Darbah, J.N., et al., *Impacts of elevated atmospheric CO2 and O3 on paper birch (Betula papyrifera): reproductive fitness*. ScientificWorldJournal, 2007. **7 Suppl 1**: p. 240-6.

373. Ziska, L.H., et al., *Cities as harbingers of climate change: common ragweed, urbanization, and public health*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2003. **111**(2): p. 290-5.
374. Jochner, S., et al., *Nutrient status: a missing factor in phenological and pollen research?* J Exp Bot. **64**(7): p. 2081-92.
375. Ziello, C., et al., *Changes to airborne pollen counts across Europe*. PLoS One. **7**(4): p. e34076.
376. Fotiou, C., et al., *Parietaria judaica flowering phenology, pollen production, viability and atmospheric circulation, and expansive ability in the urban environment: impacts of environmental factors*. Int J Biometeorol. **55**(1): p. 35-50.
377. Gregg, J.W., C.G. Jones, and T.E. Dawson, *Urbanization effects on tree growth in the vicinity of New York City*. Nature, 2003. **424**(6945): p. 183-187.
378. Buters, J.T., et al., *Year-to-year variation in release of Bet v 1 allergen from birch pollen: evidence for geographical differences between West and South Germany*. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **145**(2): p. 122-30.
379. Mogensen, J.E., et al., *The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes*. Biochemistry, 2007. **46**(11): p. 3356-65.
380. Mogensen, J.E., et al., *The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23684-92.
381. Asero, R., et al., *Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **124**(1-3): p. 67-9.
382. Kader, J.C., *Lipid-Transfer Proteins in Plants*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996. **47**: p. 627-654.
383. Vrtala, S., et al., *Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **102**(2): p. 160-9.
384. Moverare, R., et al., *Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **128**(4): p. 325-35.
385. Hjelmroos M, S.M., van Hage-Hamsten M *Heterogeneity of pollen proteins within individual. Betula pendula trees*. . International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1995. **108**(368-376).
386. Ahlholm, J.U., M.L. Helander, and J. Savolainen, *Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (Betula pubescens ssp. czerepanovii [Orl.] Hamet-ahti) pollen*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(11): p. 1384-8.
387. Helander, M.L., J. Savolainen, and J. Ahlholm, *Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens*. Allergy, 1997. **52**(12): p. 1207-14.
388. Behrendt, H. and W.M. Becker, *Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(6): p. 709-15.
389. Jun-Jun Liu, A.K.M.E., *The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2006. **68**(1-3): p. 3-13.
390. Tashpulatov, A.S., et al., *A model system to study the environment-dependent expression of the Bet v 1a gene encoding the major birch pollen allergen*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **134**(1): p. 1-9.

391. Sharma, Y.K. and K.R. Davis, *Ozone-Induced Expression of Stress-Related Genes in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 1994. **105**(4): p. 1089-1096.
392. Paakkonen, E.H., T.; Karenlampi, L., *Effects of ozone on birch (Betula pendula Roth.) clones*. Water, Air & Soil Pollution, 1995. **85**(3): p. 1331.
393. . 2001, Umweltbundesamt
394. KJ, L., *Aufnahme und Zellphysiologische Wirkung von Luftschadstoffen..* Naturwissenschaften 1987. **74**(282-288).
395. *Bodennahes Ozon*, in *UmweltWissen*. 2004, Bayrisches Landesamt für Umwelt.
396. Schillmiller, A.L. and G.A. Howe, *Systemic signaling in the wound response*. Curr Opin Plant Biol, 2005. **8**(4): p. 369-77.
397. Li, C., et al., *Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato*. Plant Cell, 2005. **17**(3): p. 971-86.
398. Metz, M., et al., *Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(4): p. 987-90.
399. Maccarrone, M., G.A. Veldink, and J.F. Vliegthart, *Thermal injury and ozone stress affect soybean lipoxygenases expression*. FEBS letters, 1992. **309**(3): p. 225-30.
400. Schulze, B., et al., *Profiling of structurally labile oxylipins in plants by in situ derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine*. Anal Biochem, 2006. **348**(2): p. 269-83.
401. Weichert, H., et al., *Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves--preferential induction of the reductase pathway by salicylate(1)*. FEBS Lett, 1999. **464**(3): p. 133-7.
402. Bate, N.J. and S.J. Rothstein, *C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes*. Plant J, 1998. **16**(5): p. 561-9.
403. Vollenweider, S., et al., *Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves*. Plant J, 2000. **24**(4): p. 467-76.
404. Gilles, S., et al., *The Pollen Enigma: Modulation of the Allergic Immune Response by Non-Allergenic, Pollen-Derived Compounds*. Current pharmaceutical design, 2012.
405. Jozefowski, S., et al., *Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells*. Immunology, 2005. **116**(4): p. 418-28.
406. Rogerieux, F., et al., *Modifications of Phleum pratense grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants (O(3), NO(2), SO(2))*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. **143**(2): p. 127-34.
407. Kay, L.J., W.W. Yeo, and P.T. Peachell, *Prostaglandin E2 activates EP2 receptors to inhibit human lung mast cell degranulation*. Br J Pharmacol, 2006. **147**(7): p. 707-13.
408. Saarinen, J.V., et al., *Modulation of the immediate allergic wheal reaction in the skin by drugs inhibiting the effects of leukotriene C4 and prostaglandin D2*. Eur J Clin Pharmacol, 2001. **57**(1): p. 1-4.
409. Gilfillan, A.M., R.D. Peavy, and D.D. Metcalfe, *Amplification mechanisms for the enhancement of antigen-mediated mast cell activation*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 15-24.

410. Rudich, N., K. Ravid, and R. Sagi-Eisenberg, *Mast cell adenosine receptors function: a focus on the A₃ adenosine receptor and inflammation*. Front Immunol. **3**: p. 134.
411. Bär, C., *Wie wirkt sich der Klimawandel auf die Gesundheit aus?* 2009, FLUGS - Fachinformationsdienst.
412. IPCC, I.P.o.C.C. (2007) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds Solomon S, Quin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL).
413. IPCC, I.P.o.C.C. (2007) *Climate Change 2007: Impacts, Adaptions and Vulnerability. Contributions of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (eds Parry ML, Canziani OF, Palutikof JP, van der Linden PJ, Hanson CE).
414. Wayne, P., et al., *Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002. **88**(3): p. 279-82.
415. Shea, K.M., et al., *Climate change and allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(3): p. 443-53; quiz 454-5.
416. Chunli Feng, E.M.B., Savita Bagga and Joshua A. Boyce, *Human mast cells express multiple EP receptors for prostaglandin E₂ that differentially modulate activation responses*. Blood, 2005.
417. Meade, C.J., I. Dumont, and L. Worrall, *Why do asthmatic subjects respond so strongly to inhaled adenosine?* Life Sci, 2001. **69**(11): p. 1225-40.
418. Holgate, S.T., R.A. Lewis, and K.F. Austen, *Role of adenylate cyclase in immunologic release of mediators from rat mast cells: agonist and antagonist effects of purine- and ribose-modified adenosine analogs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(11): p. 6800-4.
419. Gomez, G., W. Zhao, and L.B. Schwartz, *Disparity in FcepsilonRI-induced degranulation of primary human lung and skin mast cells exposed to adenosine*. J Clin Immunol. **31**(3): p. 479-87.
420. Vass, G., et al., *The effect of allergic rhinitis on adenosine concentration in exhaled breath condensate*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(6): p. 742-7.
421. Driver, A.G., et al., *Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(1): p. 91-7.
422. Huszar, E., et al., *Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma*. Eur Respir J, 2002. **20**(6): p. 1393-8.
423. Nakanishi, K., *Basophils as APC in Th₂ response in allergic inflammation and parasite infection*. Curr Opin Immunol. **22**(6): p. 814-20.
424. Mukai, K., et al., *New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy*. Allergol Int, 2009. **58**(1): p. 11-9.
425. Cronstein, B.N., D. Naime, and G. Firestein, *The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(8): p. 1040-5.
426. Spruntulis, L.M. and K.J. Broadley, *A₃ receptors mediate rapid inflammatory cell influx into the lungs of sensitized guinea-pigs*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(6): p. 943-51.
427. Reeves, J.J., et al., *Adenosine A₃ receptors promote degranulation of rat mast cells both in vitro and in vivo*. Inflamm Res, 1997. **46**(5): p. 180-4.

428. Salvatore, C.A., et al., *Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4429-34.
429. Fishman, P. and S. Bar-Yehuda, *Pharmacology and therapeutic applications of A3 receptor subtype*. Curr Top Med Chem, 2003. **3**(4): p. 463-9.
430. S. Ansar Ahmed, B.D.H., D. Verthelyi, K. Donner, K. Becker, E. Karpuzoglu-Sahin, *Gender and Risk of Autoimmune disease: Possible Role of Estrogenic Compounds*. Environmental Health Perspectives, 1999. **107**.
431. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Monocytes join the dendritic cell family*. Cell. **143**(3): p. 339-40.
432. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149-60.
433. Chatzidakis, I. and C. Mamalaki, *T cells as sources and targets of TNF: implications for immunity and autoimmunity*. Curr Dir Autoimmun. **11**: p. 105-18.
434. 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, 2007. **13**(2): p. 139-45.
435. Zhao, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(11): p. 1350-7.
436. Nestler, J.E., *Interleukin-1 stimulates the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts*. Endocrinology, 1993. **132**(2): p. 566-70.
437. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 533-44.
438. Hamilton, J.A., *GM-CSF in inflammation and autoimmunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(8): p. 403-8.
439. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 111.
440. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 335.
441. Shi, Y., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 126-33.
442. Wada, H., et al., *T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12557-61.
443. Worgall, S., et al., *Selective expansion of alveolar macrophages in vivo by adenovirus-mediated transfer of the murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cDNA*. Blood, 1999. **93**(2): p. 655-66.
444. Xing, Z., et al., *Transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene to rat lung induces eosinophilia, monocytosis, and fibrotic reactions*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 1102-10.
445. Xing, Z., et al., *Gene transfer for cytokine functional studies in the lung: the multi-functional role of GM-CSF in pulmonary inflammation*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(4): p. 481-8.
446. Stampfli, M.R., et al., *GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(9): p. 1704-14.
447. Delneste, Y., et al., *Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages*. Blood, 2003. **101**(1): p. 143-50.

448. Sonderegger, I., et al., *GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival*. *J Exp Med*, 2008. **205**(10): p. 2281-94.
449. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 328-329.
450. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
451. Zenewicz, L.A., et al., *Unraveling the genetics of autoimmunity*. *Cell*. **140**(6): p. 791-7.
452. Huber, S., et al., *Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner*. *Immunity*. **34**(4): p. 554-65.
453. Abbas Abul K., L.A.H., Pillai S., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. Vol. 7. 2012, Elsevier Saunders. 319-342.
454. Sood, A., *Obesity, adipokines, and lung disease*. *J Appl Physiol*. **108**(3): p. 744-53.
455. Kiguchi, N., et al., *Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **384**(3): p. 311-5.
456. Simpson, E.R., et al., *Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(3): p. 342-55.
457. Faggioni, R., et al., *IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 2): p. R204-8.
458. Codarri, L., et al., *RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation*. *Nat Immunol*. **12**(6): p. 560-7.
459. Eyerich, S., et al., *IL-17 and IL-22: siblings, not twins*. *Trends Immunol*. **31**(9): p. 354-61.
460. Liu, Y., et al., *IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro*. *J Immunol*. **186**(5): p. 3197-205.
461. Griffin, G.K., et al., *IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation*. *J Immunol*. **188**(12): p. 6287-99.
462. Visness, C.M., et al., *Association of childhood obesity with atopic and nonatopic asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2006*. *J Asthma*. **47**(7): p. 822-9.
463. De Rosa, V., et al., *A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation*. *Immunity*, 2007. **26**(2): p. 241-55.
464. Haak, S., et al., *IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuroinflammation in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(1): p. 61-9.
465. Peters, A., Y. Lee, and V.K. Kuchroo, *The many faces of Th17 cells*. *Curr Opin Immunol*. **23**(6): p. 702-6.
466. Gilmore, W., L.P. Weiner, and J. Correale, *Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects*. *J Immunol*, 1997. **158**(1): p. 446-51.
467. Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis, *Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22*. *Nat Immunol*. **12**(5): p. 383-90.

468. Boniface, K., et al., *A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(3): p. 407-15.
469. Nakajima, H., et al., *Kinetics of circulating Th17 cytokines and adipokines in psoriasis patients*. Arch Dermatol Res. **303**(6): p. 451-5.
470. Chen, Y.J., et al., *Psoriasis independently associated with hyperleptinemia contributing to metabolic syndrome*. Arch Dermatol, 2008. **144**(12): p. 1571-5.
471. Chen, Y., R. Dales, and Y. Jiang, *The association between obesity and asthma is stronger in nonallergic than allergic adults*. Chest, 2006. **130**(3): p. 890-5.
472. Appleton, S.L., et al., *Central obesity is associated with nonatopic but not atopic asthma in a representative population sample*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(6): p. 1284-91.
473. Vieira, V.J., et al., *Elevated atopy in healthy obese women*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(3): p. 504-9.

9 Anhang

9.1 Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
“Non-essential Amino Acids”	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
10x D-PBS w/o Ca/Mg	Gibco/Invitrogen, Paisley, Schottland
17 β -Östradiol	Sigma-Aldrich, München
2-Mercapto-Ethanol	Sigma, München
2-Propanol	Merck, Darmstadt
96-Well Migrationsplatten (96-well Microplate Chamber; 3 μ m)	NeuroProbe, Gaithersburg, USA
ABTS	Roche Diagnostics, Mannheim
Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Anti-Human IgE	DakoCytomation, Hamburg
Aqua ad injectabilia	Laboratori Diaco Biomedicali, Trieste, Italien
autoMACS rinsing solution	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
autoMACS running buffer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD14 ⁺ micro-beads (human)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ T cell isolation kit II (human)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Citrat-monohydrate	Merck, Darmstadt
Citric acid (0,1 M)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
D-PBS + Mg/Ca	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
D-PBS w/o Mg/Ca	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Gibco/Invitrogen, Paisley, Schottland
Ethanol absolute	Merck, Darmstadt
Gentamycin	Gibco/Invitrogen, Paisley, Schottland
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, München

H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt,
Heparin-Natrium 250.000U	Ratiopharm, Ulm
Human IgE, Myeloma	Merck/Calbiochem, Darmstadt
Human serum	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
Leptin	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
Lymphoprep	FreseniusKabiNorge AS, Oslo, Norway
Naïve T cell isolation kit (human)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
NaN ₃ (sodium azide)	Merck, Darmstadt
Na-Pyruvat	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
Penicillin-Streptomycin	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
Perfusor syringes	Braun, Melsungen
PGE ₂ (10 ⁻² M)	Cayman Chemical, Tallinn, Estonia
pNAG	Sigma, München
Propidiumiodide (PI)	Sigma, München
rh GM-CMSF (5x10 ⁵)	ImmunoTools, Friesoythe
rh IL-4 (5x10 ⁵)	ImmunoTools, Friesoythe
RPMI 1640 + L-Glutamin	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
SCF	Preprotech, Hamburg
Sodium pyruvat	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
StemPro-34 Medium inkl. Supplement	Invitrogen, San Diego
Streptavidin-horseradish peroxidase	R&D GE Healthcare UK limited, Wiesbaden
Testosteron	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka, (Sigma-Aldrich) München
Trypanblue 0.4% solution	Gibco /Invitrogen, Paisley, Schottland
Trypsin 0.05% EDTA	Sigma, München
Tween 20 detergent	Calbiochem, San Diego
Tyrodes Salt	Sigma, München
Ultra pure LPS	Invitrogen, San Diego

9.2 Antikörper und ELISA Kits

Antikörper/ELISA-Kit	Bezugsquelle
Anti-CCR7 PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD3 (anti-human)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD28 (anti-human)	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD1a PE	eBioscience, Alasdair Stewart, UK
Anti-CD4 FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD14 FITC	eBioscience, Alasdair Stewart, UK
Anti-CD25 PE	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD40 FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD80 FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CD83 PE	eBioscience, Alasdair Stewart, UK
Anti-CD86 APC	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-HLA-DR APC	eBioscience, Alasdair Stewart, UK
ELISA kit (IL-12p70, IL-6)	eBioscience, Alasdair Stewart, UK
ELISA kit (IL-10, GM-CSF)	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA kit (IL-17, IL-22, IFN- γ , TNF α)	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IgG1 FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Mouse IgG1 PE	BD Biosciences, Heidelberg
Mouse IgG1 APC	BD Biosciences, Heidelberg

9.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
AnaeroGen packages	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England
Clustertubes 1.2ml	Abgene, Surrey, UK
Cryotubes 1.8ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
EDTA-Monovettes	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon tubes 15ml	Becton Dickinson, NJ, USA
Falcon tubes 50ml	Becton Dickinson, NJ, USA
Heatsealing paper	Perkin Elmer, Rodgau-Rüdesheim
Maxi sorp plates (96 well)	Nunc, Roskilde, Dänemark
MultiLex TMA (β -counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Rüdesheim
Printed Filtermat (β -counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Rüdesheim
Petri Dish	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipette tips	Sarstedt Eppendorf, Newton, USA
Pipettes (1, 5, 10, and 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Printed Filtermat (β -counter)	Perkin Elmer, Rodgau-Rüdesheim
Serum monovettes	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile filter (0.22; 0.45 μ m)	Millipore express, Cork, Ireland
Sterile filter device (250ml, 500ml)	Millipore, Billerica, USA
Tissue culture flask (175 cm ² , 650ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Tissue culture plates (96 well; 24 well, 6well) flat/U-bottom	Sarstedt, Nümbrecht
Uvette 50–2000 microliter; 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg

9.4 Medien

Alle Medien und Puffer wurden steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Medium	
HU-DC Medium	50 ml FCS (Fetal Bovine Serum)
	2,5 ml Gentamycin (10M)
	5 ml L-Glutamin (200mM)
	450 ml RPMI (+L-Glutamin)
Hormonreduziertes Proliferationsmedium	5 ml L-Glutamin (200mM)
	25 ml CDT FCS
	500 µl 2-Mercaptoethanol
	5,6 ml Natrium-Pyruvate
	5,6 ml Non-essential Amino Acids
	5 ml Penicillin-Streptomycin
	450 ml IMDM
Migrationsmedium	240 ml RPMI Medium
	1,2 ml BSA (Sigma A 8412; 0,5%)
	2,5 ml P/S
	2,5 ml Glutamin
	2,8 ml Non essential Aminoacids
	2,8 ml Natriumpyruvat

9.5 Geräte

Gerät	Hersteller
AutoMACSpro	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Thermo scientific, Schwerte
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader Mrx to revelation	Thermo Labsystems, Chantilly, VA, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson Heidelberg
Microscope Axiovert	Zeiss, Jena
Multichannel Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettes with disposable tips	Eppendorf, Hamburg
Shaker Titramax 100	Heidolph, Schwabach
Water quench Typ1003	GFL, Burgwedel

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Bei meiner Doktormutter, Prof. Dr. Annette Menzel, möchte ich mich für die Betreuung meiner Promotion bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich an Frau Prof. Dr. Heidrun Behrendt und Prof. Dr. Carsten Schmidt-Weber für die Unterstützung meiner Projekte richten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Claudia Traidl-Hoffmann für die exzellente Betreuung, den wissenschaftlichen Freiraum und die immer wieder aufmunternden Worte.

Danke an alle ZAUMler für die gute Stimmung und die motivierte Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank an meine Kollegen Julia Hiller, Daniela Dittlein, Sarah Lehmann und Sabrina Steiert für die wissenschaftliche und mentale Unterstützung und Steffi Gilles und Susanne Jochner für die tolle Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Input.

Mein allergrößter Dank gebührt meiner Mutter für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.