

Dissertation 14/2008

**Zusammenhang zwischen T-Zell-Regulationsfaktoren und
allergischer Sensibilisierung bei 6-jährigen Kindern der
LISApplus-Studie**

Clarissa Dägelmann

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ)



00344173

ISSN 1860-0387

**Zusammenhang zwischen T-Zell-Regulationsfaktoren und
allergischer Sensibilisierung bei 6-jährigen Kindern
der LISAplus-Studie**

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
genehmigte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinae
(Dr. rer. med.)

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Clarissa Dägelmann (geb. Weiß)

geboren am 20. Januar 1979 in Leipzig

Archiv

Datum des Verleihungsbeschlusses: 18.11.2008

09-0076

Bibliographische Beschreibung:

Dägelmann, Clarissa

Zusammenhang zwischen T-Zell-Regulationsfaktoren und allergischer Sensibilisierung bei 6-jährigen Kindern der LISAplus-Studie

Universität Leipzig, Dissertation

70 S., 142 Lit., 2 Anlagen

Referat

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer umweltepidemiologischen Kohortenstudie (LISAplus), in der der Einfluss von Umwelt- und Lebensbedingungen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien in der frühen Kindheit untersucht wird. Erstmals wurden im Rahmen dieser Arbeit innerhalb einer Querschnittspopulation 6-jähriger Kinder, molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von Signalproteinen mit Bedeutung für die T-Zell-Regulation durchgeführt, um die *in vivo* Relevanz dieser Signalmoleküle vor allem auch im Hinblick auf die Entstehung einer allergischen Reaktionslage aufzuzeigen. Bei der Untersuchung der Expression von suppressor of cytokine signalling- (SOCS) Molekülen wurde beobachtet, dass SOCS1 mit einer Aufregulation der Th2-Differenzierungsmarker GATA-3 und IL-4, sowie allergischen Sensibilisierungen im Zusammenhang steht. Im Gegensatz dazu war der Th1-Transkriptionsfaktor Tbet erniedrigt und die Anzahl IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen geringer in Kindern mit erhöhter SOCS1-Expression. SOCS1 könnte demnach an der Entwicklung einer Th2-Immunantwort beteiligt sein. Die Expression von SOCS3, SOCS5 und CIS korrelierte positiv mit Tbet und dem Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen FOXP3, sowie (mit Ausnahme von CIS) negativ mit IL-4. Ein Zusammenhang mit allergischen Sensibilisierungen wurde für diese Moleküle nicht beobachtet. Kinder, die eine hohe Expression von GATA-3 und IL-4 aufwiesen, zeigten ein erhöhtes Risiko für eine Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben. Darüber hinaus wurden niedrigere Tbet-Expressionslevel bei Kindern mit Sensibilisierungen gegen Inhalationsallergene gefunden. Zusätzlich konnten Zusammenhänge zwischen der Th1/Th2-Regulation, allergischer Sensibilisierung und Neuropeptidkonzentrationen im Blut aufgezeigt werden. Hohe Konzentrationen von Somatostatin (SOM) waren assoziiert mit einer Th2-Polarisierung (erhöhte GATA-3, SOCS1-Werte) und einer verminderten Expression von FOXP3. Hohe Blutkonzentrationen des vasoaktiven Intestinalpeptids (VIP) zeigten eine negative Korrelation mit Tbet und SOCS3. Beide Neuropeptide waren auch mit einem erhöhten Risiko für allergische Sensibilisierungen assoziiert. Diese Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung von Mechanismen die allergischen Erkrankungen zugrunde liegen.

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von September 2003 bis Dezember 2007 am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ, Department Umweltimmunologie unter der Leitung von Frau Dr. Irina Lehmann angefertigt. Die Arbeit entstand in Kooperation mit dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Frank Emmrich an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die LISA-Studie	1
1.2 T-Zell-Subpopulationen und deren Relevanz für die Allergieentstehung	5
1.3 Transkriptionsfaktoren für Th1-, Th2- und Treg-Zellen	7
1.4 Die Bedeutung von SOCS-Molekülen für die T-Zell-Differenzierung	9
2. ZIELSTELLUNG.....	12
3. ORIGINALDATEIEN	13
4. DISKUSSION	33
4.1 Zusammenhang zwischen SOCS-Molekülen, Th1/Th2/Treg-Differenzierung und allergischer Sensibilisierung	33
4.2 Zusammenhang zwischen den Transkriptionsfaktoren (GATA-3, Tbet, FOXP3), Th1/Th2-Differenzierung und allergischer Sensibilisierung	37
4.3 Zusammenhang zwischen T-Zell-Regulationsfaktoren (Th1/Th2-Antwort) und Stressregulation, sowie allergischer Sensibilisierung	39
4.4 Stärken / Schwächen-Analyse	44
5. ZUSAMMENFASSUNG	46
6. LITERATURVERZEICHNIS	49
DANKSAGUNG	60
ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT	61
LEBENS LAUF	62
ANLAGE.....	63

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen präsentierende Zellen
BALF	Bronchoalveolarflüssigkeit
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Klassifizierung von Oberflächen-Antigenen)
CIS	cytokine-inducible SH2 Domäne enthaltende Protein
c-Maf	<i>avian musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-Immunassay)
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
GATA-3	GATA-bindendes Protein 3
HEK293	Humane embryonale Nierenzelle (<i>human embryonic kidney cell line</i>)
HeLa	unsterbliche Zelllinie isoliert vom Gebärmutterhalskrebs von Henriette Lacks
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
JAK/STAT	<i>Janus Kinase and signal transducer and activator of the transcription</i>
KI	Konfidenzintervall
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
LISA	Lebensstil-Immunsystem-Allergie: (Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich)
LISApplus	Lebensstil-Immunsystem-Allergie: Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich plus Einfluss von Luftverunreinigungen und Genetik
MAS	Multizentrische Allergie Studie
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NKT	Natürliche Killer T- (Zellen)

OR	Odds Ratio
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pg	Pikogramm
R	Rangkorrelationskoeffizient
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SOM	Somatostatin
SP	Substanz P
STAT	Signaltransduktionsprotein (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
Tbet	<i>T-box expressed in T cells</i>
Th0	T-Helfer 0-Zellen (naive T-Helfer-Zellen)
Th1	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
VIP	vasoaktives Intestinalpeptid
VOC	<i>volatile organic compounds</i> (flüchtige organische Verbindungen)
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die LISA-Studie

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer umweltepidemiologischen Kohortenstudie. Die LISA-Studie (Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich) basiert auf der Hypothese, dass bestimmte Lebensstil- und Umweltfaktoren in der frühen Kindheit einen Einfluss auf die Reifung und Entwicklung des Immunsystems ausüben. Es wird angenommen, dass derartige Faktoren eine ausschlaggebende Bedeutung bei der Steuerung von Immunantworten besitzen, welche entweder schützend oder unterstützend zur Entwicklung von Allergien beitragen. Diese LISA-Studie wurde ins Leben gerufen, um Unterschiede im Auftreten von atopischen Erkrankungen zwischen Ost- und Westdeutschland, wie sie sich in zahlreichen Studien gezeigt hatten (Behrendt et al., 1993, Nowak et al., 1996, von Mutius et al., 1992, von Mutius et al., 1994), näher zu beleuchten. Weiterhin sollte geklärt werden, welche der Faktoren, die die Entwicklung des frühkindlichen Immunsystems prägen, Einfluss auf die Entstehung atopischer Erkrankungen haben.

Im Rahmen der LISA-Studie werden sowohl Risikofaktoren für allergische Erkrankungen als auch potentiell schützende Faktoren untersucht. Zu solchen Risikofaktoren gehören z.B. die Innenraumexposition gegenüber Allergenen und Luftschadstoffen (Diez et al., 2000, Duhme et al., 1998, Lehmann et al., 2001, Müller et al., 2002, Nickel et al., 2002), die Ernährungsweise (von Mutius et al., 1998) und Außenluftverunreinigungen durch Kraftfahrzeugabgase (Jang et al., 2005, Kramer et al., 2000, Wichmann, 1996). Ausschließliches Stillen über 4 – 6 Monate, frühe Infektionen in der Kindheit, ältere Geschwister, der zeitige Besuch von Kindertagesstätten und Aufwachsen in ländlicher Umgebung werden dagegen als schützende Faktoren vor allergischer Sensibilisierung angesehen (Kilpi, 2002, Radon et al., 2004, Spiegl, 2003, Strachan, 1989, Becker, 2005). Neben Umweltfaktoren werden insbesondere psychosoziale Faktoren (z.B. zwischenmenschliche Konflikte, Verlust von Angehörigen) und sozioökonomische Faktoren (z.B. Arbeitslosigkeit, Wohnumfeld) als Stressfaktoren mit einem potentiellen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko diskutiert. Es wird vermutet, dass soziale Stressfaktoren zu einer Fehlregulation des Immunsystems führen und bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen ebenfalls relevant sein können. Dabei sind unter den neuronalen Botenstoffen neben den klassischen Stressmediatoren (Glukocorticoide) die Neuropeptide besonders

erwähnenswert, da gezeigt wurde, dass diese unter Stress vermehrt ausgeschüttet werden (Kimata, 2003a, Kimata, 2003b, Crozier et al., 1988).

Für LISA wurden zwischen Dezember 1997 und Januar 1999 insgesamt 3097 Neugeborene aus Leipzig (976), München (1467) und dem Rheinland (654; Bad Honnef und Wesel) von den Studienzentren der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig (Studienleiter: Dr. M. Borte) und des GSF-Forschungszentrums Neuherberg / München – Institut für Epidemiologie (Studienleiter: Prof. Dr. Dr. H. E. Wichmann) rekrutiert. Um eine möglichst homogene Studienpopulation zu erhalten, wurden Frühgeborene, Kinder mit postnatalen Erkrankungen, angeborenen Fehlbildungen oder chronischen Erkrankungen der Mutter und auch Kinder nichtdeutscher Abstammung ausgeschlossen. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig. In den ersten beiden Jahren wurde die Studie vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie gefördert.

Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zelluläre und humorale Immunparameter aus dem Blut der Kinder bestimmt. Des Weiteren erfolgten zur Geburt und zum 6., 12., 18., 24., 36., 48. und 72. Lebensmonat Fragebogenerhebungen zu atopischen Erkrankungen und Infektionen, Allergierisikofaktoren und potentiellen Belastungsfaktoren.

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen von Blutproben 6-jähriger LISA-Probanden. Im sechsten Lebensjahr wurde die LISA-Studie vom Bundesministerium für Umwelt gefördert und von folgenden Studienzentren koordiniert: Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Leipzig, Department Epidemiologie und Expositionsforschung / Department Umweltimmunologie (Studienleiter: Prof. Dr. O. Herbarth / Stellvertreter: Dr. I. Lehmann); GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg – Institut für Epidemiologie (Studienleiter: Prof. Dr. Dr. H. E. Wichmann) und IUF-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf, Arbeitsbereiche Epidemiologie und Partikelforschung (Studienleiter: PD Dr. U. Krämer). Zusätzlich wurden Teilaufgaben im Rahmen der LISApplus-Studie durch weitere universitäre und außeruniversitäre Kooperationspartner übernommen, welche im Anhang in der Beschreibung der LISApplus-Studiengruppe einzeln aufgeführt sind. Im sechsten Lebensjahr der Kinder wurde die LISA-Studie erweitert: „LISApplus – Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich plus Einfluss von Luftverunreinigungen und Genetik“. Neben den bisher betrachteten Lebensstilfaktoren sowie Expositionen aus dem Innenraum wurden unter Federführung des Instituts für Umweltmedizinische Forschung (IUF) in Düsseldorf nun auch die Relevanz von Verkehrsbelastungen für die Gesundheit der Kinder stärker in das Projekt

einbezogen. Dadurch war es möglich, zusätzlich zu den bisher betrachteten Fragestellungen auch Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Verkehrs- bzw. Partikelbelastung und Immunreaktivität bzw. Krankheitsrisiko der Kinder durchzuführen. Des Weiteren sollte nun in der Studie unter Federführung des Instituts für Sozialmedizin in Lübeck zusätzlich die Wirkung psychosozialer Parameter auf die Regulation des Immunsystems sowie daraus resultierender Krankheitsrisiken untersucht werden. Die Eltern erhielten zwei Fragebögen, in denen allgemeine bzw. soziale Lebensumstände erfragt wurden und Passivraumluftsammler zur Messung flüchtiger organischer Verbindungen im Wohn- und Kinderzimmer. Von ursprünglich 976 in Leipzig rekrutierten Kindern nahmen im 6. Lebensjahr noch 565 an der Studie teil. 324 Eltern bewilligten die Blutabnahme bei ihrem Kind, 321 davon auch genetische Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf diese 321 Leipziger Kinder, mit Blutuntersuchungen im sechsten Lebensjahr.

Es gibt bisher eine ganze Reihe interessanter Ergebnisse aus der LISA-Studie, die belegen, dass Lebensstilfaktoren und Umweltfaktoren tatsächlich einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems und das Allergierisiko im frühen Kindesalter ausüben können. So konnte gezeigt werden, dass ein vorwiegender Margarinekonsum in den ersten beiden Lebensjahren positiv mit der Häufigkeit des Auftretens eines atopischen Ekzems und einer Sensibilisierung gegenüber Inhalationsallergenen korreliert war (Sausenthaler et al., 2006). Auch korrelierte der verstärkte Konsum von pflanzlichen Ölen und Margarine der Mutter in den letzten 4 Schwangerschaftswochen mit dem Vorkommen eines atopischen Ekzems im 2. Lebensjahr der Nachkommen (Sausenthaler et al., 2007). Eine Exposition gegenüber Katzenallergenen in der frühen Kindheit (aber nicht bei Schulkindern) erhöhte ebenfalls das Risiko für eine allergische Sensibilisierung (Chen et al., 2007). Bockelbrink und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass die Scheidung oder Trennung der Eltern in den ersten beiden Lebensjahren mit einem erhöhten Vorkommen von atopischen Ekzem bei den Kindern assoziiert ist. Außerdem wurde beobachtet, dass eine Geburt per Kaiserschnitt ein Risikofaktor für eine allergische Sensibilisierung darstellt (Negele et al., 2004). Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen einer Passivrauchexposition und erhöhten Blut-Konzentrationen der Entzündungsmarker Interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-10, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) sowie der Entwicklung von allergischen Sensibilisierungen bei 6-jährigen Mädchen gefunden (Gubelt, 2007).

Eine Endotoxin-Exposition in den ersten Lebensmonaten wirkte als schützender Faktor auf die Ausbildung eines atopischen Ekzems (Gehring et al., 2001). Außerdem konnte im Rahmen der LISA-Studie gezeigt werden, dass der frühe Besuch einer Kindereinrichtung (vor

dem 18. Lebensmonat) sowie häufige Infekte der Atemwege im gleichen Lebenszeitraum nachhaltig das Immunsystem, speziell die T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) von Kleinkindern stimulieren und damit wahrscheinlich das Allergierisiko vermindern können (Spiegl, 2003).

Es wurden darüber hinaus erstmals Hinweise dafür gewonnen, dass Umweltfaktoren bereits während der Schwangerschaft die Entwicklung des kindlichen Immunsystems beeinflussen können. Bei Neugeborenen, deren Eltern in der Schwangerschaft renoviert hatten bzw. deren Mütter erhöhten Chemikalienkonzentrationen während der Schwangerschaft ausgesetzt waren, wurden im Nabelschnurblut verminderte Anteile Interferon-gamma- (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor alpha- (TNF- α) produzierende T-Zellen gefunden (Lehmann et al., 2002a, Lehmann et al., 2002b). Die Kinder mit verminderten Anteilen von Th1-Zellen im Nabelschnurblut wiesen auch ein erhöhtes Risiko für die Ausprägung eines atopischen Ekzems in den ersten beiden Lebensjahren auf (Herberth et al., 2007a).

In der LISA-Studie wurden also bereits Lebensbedingungen und Umweltfaktoren, die für die Allergieentstehung wichtig sein könnten, analysiert und beschrieben. Das erhöhte Vorkommen allergischer Erkrankungen während der letzten Jahre erfordert aber auch die weitere Aufklärung von molekularen Mechanismen, die der Entstehung allergischer Erkrankungen zugrunde liegen. Da allergische Erkrankungen auf einer Fehlregulation auf der Ebene der T-Lymphozyten, insbesondere der Th-Zellen basieren, stehen besonders Parameter der T-Zell-Immunität, vor allem die Th1/Th2-Regulation, im Zentrum des Interesses. Aufgabe der vorliegenden Arbeit im Rahmen dieser Studie war deshalb die molekularbiologische Untersuchung der Expression von Signalproteinen, die insbesondere im Rahmen der T-Zell-Differenzierung eine Rolle spielen und damit potentiell auch für die Entwicklung einer allergischen Reaktionslage von Bedeutung sein könnten. Daher wurde in dieser Arbeit der Transkriptionsfaktor für Th1-Zellen T-box expressed in T cells (engl. Tbet), der Transkriptionsfaktor für Th2-Zellen GATA-Bindendes Protein 3 (GATA-3), sowie der Marker für regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) forkhead box P3 (FOXP3) untersucht. Des Weiteren wurde in bisherigen Veröffentlichungen gezeigt, dass eine Signalhemmung durch suppressors of cytokine signalling (SOCS)-Moleküle für die Aufrechterhaltung der Balance der Zytokine wichtig und somit entscheidend für Th1- und Th2-vermittelte Immunantworten ist. Da bisher kaum *in vivo* Daten und vor allem keine aus dem Humansystem zum Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und allergischen Manifestation verfügbar sind, wurden auch ausgewählte SOCS-Faktoren in dieser Arbeit untersucht. Im Folgenden wird die

Bedeutung der untersuchten Parameter vor allem im Hinblick auf die T-Zell-Differenzierung und Allergieentwicklung detailliert dargestellt.

1.2 T-Zell-Subpopulationen und deren Relevanz für die Allergieentstehung

Besondere Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese der allergischen Immunantwort hat die Entdeckung zweier sich in ihrem Zytokinsekretionsmuster unterscheidender Typen von Th-Zellen durch Mosmann (1986). Th-Zellen des Typs 1 und 2 stellen zwei polarisierte Formen der $CD4^+$ Th-Zell-vermittelten spezifischen Immunantwort dar. Wenn eine Immunantwort ausgelöst wird, sezernieren Th0-Zellen (naive T-Zellen) hauptsächlich IL-2, das in autokriner Weise ihre Proliferation und Differenzierung steuert (Reiner, 2001). Naive T-Zellen entwickeln sich, erstmalig stimuliert, in Gegenwart von IL-12 und $IFN-\gamma$ zu Th1-Zellen, in Gegenwart von IL-4 und IL-6 zu Th2-Zellen. Die gebildeten Zytokine von Th1-Zellen bzw. Th2-Zellen wirken wechselseitig inhibitorisch auf Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktion des jeweils anderen Zellphänotyps und stimulieren notwendige Wachstumsfaktoren des eigenen Zellphänotyps.

Th1-Zellen sind auf die Aktivierung zellulärer Immunreaktionen spezialisiert. Durch die Abgabe von $IFN-\gamma$ wird die Differenzierung und Proliferation von Natürlichen Killerzellen gefördert. Weiterhin wird durch sezerniertes $IFN-\gamma$ und IL-2 die Differenzierung von $CD8^+$ T-Lymphozyten zu zytotoxischen Effektorzellen angeregt. In Kombination mit $TNF-\alpha$ induziert $IFN-\gamma$ die Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Entzündung. $IFN-\gamma$ stimuliert auch die Produktion opsonierender Immunglobulin G- (IgG) Subklassen, die wiederum durch Bindung an zytotoxischen Effektorzellen und an Komplementfaktoren die Phagozytose und Lyse der opsonierten Zellen herbeiführen (Perussia et al., 1985). Th1-Zellen vermitteln die Phagozyten- und zytotoxische Infektionsabwehr - insbesondere intrazellulärer Pathogene - und eine Entzündungsreaktion, die oft mit Gewebsschäden verbunden ist.

Dagegen produzieren aktivierte Th2-Zellen eine Vielzahl von Zytokinen, die eine Bildung von Antikörpern in B-Zellen auslösen (humorale Immunabwehr). Dazu gehören IL-4, IL-10, IL-13 und $IFN-\alpha$ (Cavaillon, 2001). Das Leitzytokin IL-4 fördert gemeinsam mit IL-13 in B-Lymphozyten den Antikörper-Klassenwechsel zum IgE (Mosmann and Sad, 1996). Die Th2-Zellen sind an der Parasiten-Abwehr, der Hemmung von Entzündungsreaktionen des Gewebes und an der Pathogenese allergischer Reaktionen beteiligt (Abbas et al., 1996).

Die Entstehung einer Hypersensitivitätsreaktion (allergische Reaktion) gegen ein spezifisches Allergen basiert auf einer Serie von Interaktionen zwischen antigen-präsentierenden Zellen

(APZ), T- und B-Lymphozyten. Beim ersten Kontakt mit dem Allergen präsentieren die APZ den T-Zellen kleine Peptidfragmente in Verbindung mit dem major histocompatibility complex (MHC) Klasse II Molekülen. T-Lymphozyten, die einen passenden T-Zell-Rezeptor (TZR) spezifisch für das Peptid und MHC Klasse II besitzen, binden an den Peptid-MHC Komplex der APZ. Die Bindung zwischen Antigen-MHC-Komplex und TZR führt aber nur dann zu einer Aktivierung der T-Zelle, wenn dieselbe APZ gleichzeitig kostimulierende Faktoren exprimiert. Dazu zählen neben löslichen Zytokinen auch direkte Rezeptor-Ligand-Beziehungen zwischen T-Zelle und APZ. Beide sind wesentlich für die Entwicklung spezifischer T-Zell-Populationen. So findet man auf der Oberfläche von APZ zwei strukturell verwandte Glykoproteine, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Deren Rezeptor auf der T-Zelle ist CD28, dessen Bindung mit B7.1 eine Th1-Entwicklung fördert, während eine Bindung mit B7.2 zu einer Th2-Differenzierung führt (Freeman et al., 1995). Die T-Zellen interagieren mit B-Zellen, die den passenden Antigenrezeptor tragen, und stimulieren diese allergenspezifische IgEs zu produzieren. Die allergenspezifischen IgE binden dann an Oberflächenrezeptoren von Mastzellen, Basophilen, Makrophagen und anderen APZ. Die Phase vom Antigen (=Allergen)-Kontakt bis zur Produktion entsprechender Antikörper bzw. Proliferation spezifisch reaktionsfähiger T-Effektorzellen nennt man Sensibilisierungsphase. Nach dieser Phase ist der Betreffende allergisch sensibilisiert, aber noch nicht erkrankt. Bei erneutem Kontakt des Sensibilisierten mit dem spezifischen Allergen werden die IgEs auf den Mastzellen vernetzt und setzen unter anderem Histamin frei und es wird eine pathogene Immunreaktion ausgelöst (Manifestationsphase).

Treg-Zellen repräsentieren eine weitere T-Zell-Subpopulation, welche aktiv die Funktionen anderer Zellen kontrolliert und unterdrückt. Eine allergische Immunantwort beruht auf dem Vorherrschen eines Th2-Phänotypes. Bei der Aufrechterhaltung des Th1/Th2-Gleichgewichtes spielen die Treg-Zellen eine entscheidende Rolle. Sind sie in ihrer Funktion eingeschränkt oder fehlen sie, kann sich das Gleichgewicht entweder in Richtung Th2 oder Th1 verschieben. Es wurden vier Haupttypen der Treg-Zellen beschrieben: Th3-Zellen, Tr1-Zellen, natürliche Killer T (NKT) Zellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen.

Th3-Zellen produzieren TGF- β und IL-10 und besitzen regulatorische oder suppressive Eigenschaften (Chen et al., 1994). Tr1-Zellen haben eine niedrige proliferative Kapazität und produzieren große Mengen an IL-10, aber wenig IL-2 und IL-4 (Groux et al., 1997). NKT-Zellen umfassen eine Population von T-Zellen, die Zelloberflächenmarker exprimieren, die charakteristisch sind für NK-Zellen und für konventionelle T-Zellen. Wenn NKT-Zellen aktiviert sind, produzieren sie rasch große Mengen an IL-4 und IFN- γ (Wilson and Delovitch,

2003). $CD25^+CD4^+$ T-Zellen im Menschen repräsentieren zwischen 1% und 3% der gesamten $CD4^+$ T-Zellen. $CD4^+CD25^+$ T-Zellen hemmen die Immunantworten durch direkten Zell-Zell-Kontakt über ein CTLA-4- (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) Signal, sowie durch die Sekretion von TGF- β (Jonuleit et al., 2002). Patienten ohne $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen entwickeln Ekzeme, verfügen über einen höheren IgE-Level, haben eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen und leiden unter Nahrungsmittelallergien (Gambineri et al., 2003). Der zuletzt erwähnte Zelltyp spielt demzufolge eine große Rolle bei der Kontrolle der Entwicklung von Allergien.

1.3 Transkriptionsfaktoren für Th1-, Th2- und Treg-Zellen

Transkriptionsfaktoren sind Motoren der Genregulation, die am Ende von Signalübertragungsketten stehen. Diese Proteine, die spezifisch deoxyribonucleic acid- (DNA-) Elemente in der Promotorregion eines Gens binden, steuern die Übersetzung dieser Gene in messenger ribonucleic acid (mRNA) und das gebildete Transkript wird dann in ein neues Protein übersetzt. Transkriptionsfaktoren können als Aktivatoren oder Repressoren agieren. Die Folge ist eine differentielle Genaktivität als Antwort z.B. auf Umweltreize.

Notwendige Transkriptionsfaktoren für die Th1-Differenzierung sind signal transducer and activator of transcription (STAT)-4 und Tbet. Es wurde gezeigt, dass sie die Transkription von IFN- γ kontrollieren (Kaplan et al., 1996, Szabo et al., 2000). Die Tbet-Expression korrelierte mit der IFN- γ Expression in Th1-Zellen (Szabo et al., 2000). Auf Th2-festgelegte Zellen konnten eine Neu-Spezialisierung in Richtung Th1 erleben, induziert durch Tbet (Shier et al., 2000). Die Bedeutung von Tbet in der Regulation der Th1-Differenzierung wurde bestätigt in *Tbet*^{-/-} Mäusen. Die Th1-Antwort betreffend zeigten $CD4^+$ T-Zellen von *Tbet*^{-/-} Mäusen einen schwerwiegenden Defekt (Szabo et al., 2002). Darüber hinaus entwickelten *Tbet*^{-/-} Mäuse spontane Atemwegserkrankungen, ähnlich wie Asthma beim Menschen (Finotto et al., 2002). Die primär im Mausmodell beobachteten Ergebnisse wurden beim Menschen bestätigt. Denn bei Asthmapatienten gab es eine Tendenz in Richtung Th2-Polarisierung mit einer Überproduktion der Th2-Zytokine. Des Weiteren waren die Tbet-Level in Asthmapatienten ungewöhnlich niedrig, so könnte ein Tbet-Mangel bei der Th2-Polarisierung eine Schlüsselrolle einnehmen (Finotto et al., 2002). Ob Tbet die Th2-Zytokine direkt hemmt oder nicht, wurde kontrovers in der Literatur diskutiert (Afkarian et al., 2002, Szabo et al., 2000).

Dagegen wurde beobachtet, dass die Transkriptionsfaktoren STAT-6, avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (c-Maf) und GATA-3 die Th2-Differenzierung steuern, indem sie die IL-4, IL-5 und IL-13 Transkription regeln (Rengarajan et al., 2000). GATA-3 ist in geringen Mengen in naiven $CD4^+$ T-Zellen vorhanden. Es wurde ein starker Anstieg der GATA-3-Expression während der Th2-Differenzierung und eine Abnahme während der Th1-Differenzierung beschrieben (Lee et al., 1998, Zhang et al., 1997, Zheng and Flavell, 1997). Wenn man mit retroviralen Vektoren GATA-3 in die Mäuse einbrachte, wurde die Expression aller Th2-Zytokine gesteigert, sogar wenn die $CD4^+$ T-Zellen unter Th1- polarisierten Bedingungen kultiviert wurden. Die Ergebnisse wurden mit transgenen Mäusen bestätigt (Ferber et al., 1999, Lee et al., 2000, Ouyang et al., 1998, Zheng and Flavell, 1997). Zusätzlich zur Stimulation der Th2-Zytokinantwort hemmte GATA-3 die IFN- γ Produktion, sowie die IL-12R β 2 Expression in einer IL-4 unabhängigen Art und Weise (Ferber et al., 1999, Ouyang et al., 1998). Beim Menschen und im Mausmodell wurde gezeigt, dass GATA-3 bedeutend für die Entstehung von atopischen Asthma ist. In den Atemwegen von Patienten mit allergischen Asthma wurde, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, eine erhöhte GATA-3-Expression gefunden (Nakamura et al., 1999). In transgenen GATA-3 negativen Mäusen wurde im Vergleich zu GATA-3-Wildtyp-Mäusen eine Abnahme aller Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, und IL-13) festgestellt. Wichtige Schlüsselfaktoren von Asthma, die Eosinophilenanzahl, die Schleimproduktion, und die IgE-Bildung, waren ebenfalls bei GATA-3-transgenen Mäusen stark vermindert (Zhang et al., 1999).

$CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen sind gekennzeichnet durch die Expression von FOXP3 mRNA (Groux et al., 1997). Das FOXP3 Gen ist ein Mitglied der forkhead/wingend Helix-Familie. Eine erzwungene Expression des Foxp3 Gens in Mäusen wandelte naive T-Zellen in $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen um (Hori et al., 2003). Außerdem schützte eine Impfung von Wildtyp Mäusen mit $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen Foxp3-knockout Mäuse vor Autoimmunkrankheiten (Fontenot et al., 2003). Walker und Kollegen (2003) präsentierten im Humansystem, dass FOXP3-exprimierende $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen im peripheren Blut die Aktivierung und Entwicklung von anderen T-Zellen *in vitro* hemmen, wie es für Nagetiere schon gezeigt wurde (Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003). Darüber hinaus zeigten sie, dass die Aktivierung von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen über die T-Zell-Rezeptor Stimulation die FOXP3-Expression induziert. Diese FOXP3-exprimierenden T-Zellen von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen abstammend wiesen die gleichen unterdrückenden Eigenschaften, wie natürliche $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen auf (Walker et al., 2003).

Neben den hier erwähnten Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf die Th1/Th2-Regulation haben, gibt es weitere Faktoren, die auf einer anderen Ebene, insbesondere bei der Regulation verschiedener Signaltransduktionswege, eine Rolle spielen.

1.4 Die Bedeutung von SOCS-Molekülen für die T-Zell-Differenzierung

Es gibt einige Hinweise, dass die Expression von SOCS-Molekülen bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte. Doch insbesondere im humanen System gibt es noch Wissenslücken, welche weitere Untersuchungen erfordern.

Zur SOCS-Familie gehören 8 Mitglieder das cytokine-inducible Src-homology 2 (SH2) Domäne enthaltende Protein (CIS) und SOCS1-7 (Hilton et al., 1998). Gemeinsame Merkmale sind eine zentrale SH2-Domäne und eine konservierte C-terminale SOCS-Box. Diese Familienmitglieder sind involviert in die negative Regulation verschiedener Signaltransduktionswege, insbesondere dem Janus kinase and signal transducer and activator of the transcription (JAK/STAT) Signalweg (Leonard and O'Shea, 1998). Aktivierte STATs stimulieren die Transkription der SOCS-Gene. Die SOCS-Proteine wiederum binden phosphorylierte JAKs und deren Rezeptoren und schalten den Signalweg aus. SOCS schwächen die Zytokinsignaltransduktion ab, indem sie mit ihren SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste von Signalvermittlern binden, dies führt z.B. zur Inaktivierung von JAK. CIS dagegen blockiert den STAT-Transport zum Rezeptor. Bei allen SOCS-Proteinen variiert die N-terminale Region in der Länge und Aminosäuresequenz. Nur SOCS1 und SOCS3 verfügen über eine kinase inhibitory region (KIR) unmittelbar oberhalb der zentralen SH2-Domäne. Diese fungiert wahrscheinlich als Pseudosubstrat, indem die katalytische Domäne von JAKs inaktiviert und somit der Eingang vom eigentlichen Substrat an der Aktivierungsregion blockiert wird. Durch die KIR-Region kommt es zu einer stärkeren Inhibition der JAK-Aktivität (Fujimoto and Naka, 2003).

Wie schon ausgeführt, ist eine Signalhemmung durch SOCS-Mitglieder wichtig für die Aufrechterhaltung der Balance der Zytokine, und diese ist wiederum entscheidend für Th1- und Th2-vermittelte Immunantworten.

SOCS1 wird hauptsächlich in Th1-Zellen exprimiert (Egwuagu et al., 2002) und ist wichtig für die Drosselung einer IFN- γ abhängigen T-Zell-Aktivierung (Song and Shuai, 1998, Starr et al., 1998). Zusätzlich reguliert SOCS1 IL-12 Antworten *in vivo* (Eyles et al., 2002).

SOCS3 wird selektiv in Th2-Zellen exprimiert (Egwuagu et al., 2002) und hat die Fähigkeit, die IL-12 vermittelte STAT-4-Aktivierung zu hemmen, wodurch die Th1-Entwicklung

blockiert wird (Seki et al., 2003, Starr et al., 1998). SOCS3 hemmt ebenfalls IFN- γ , aber weniger stark als SOCS1 (Federici et al., 2002, Song and Shuai, 1998).

SOCS5 wird ebenfalls in Th1-Zellen exprimiert und hemmt IL-4 induzierte Signalwege und damit die Th2-Differenzierung (Seki et al., 2002). Obwohl *in vitro* Studien vermuten lassen, dass SOCS5 die T-Zell-Entwicklung in Richtung Th1-Zellen unterstützt, wurde kein Defekt in der T-Zell-Differenzierung in SOCS5-Knockout-Mäusen festgestellt (Brender et al., 2004). CIS wird reichlich von aktivierten Th1- und Th2-Zellen exprimiert (Yu et al., 2003). Th-Zellen von CIS-transgenen Mäusen differenzierten bevorzugt in Th2-Zellen (Matsumoto et al., 1999).

Nur wenige Publikationen haben die Rolle der SOCS-Expression in Treg-Zellen untersucht. Kürzlich wurde gefunden, dass SOCS3 in unstimulierten Treg-Zellen fehlt, aber später wichtig für die Regulierung der Funktion von Treg-Zellen ist. Pillemer und Kollegen (2007) zeigten, dass durch einen Überschuss an SOCS3 in Treg-Zellen die FOXP3-Expression und die CTLA-4-Expression reduziert wird, gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Treg-Zell-Proliferation und deren unterdrückender Funktion. Andere Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass SOCS3 die Treg-Zell-Entwicklung über eine Modulation der TGF- β Abgabe von dendritischen Zellen hemmt (Matsumura et al., 2007). Somit unterstützt eine Abschwächung von SOCS3 den regulatorischen Phänotyp von T-Zellen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass FOXP3 als Transkriptionshemmer für SOCS3 fungiert. Dies könnte ein Mechanismus sein, über den T-Lymphozyten SOCS3-Mengen regulieren, um den Treg-Zell-Phänotyp aufrechtzuerhalten (Muthukumarana et al., 2007). Dagegen wurde SOCS1 stark in Treg-Zellen exprimiert (Gavin et al., 2002, McHugh et al., 2002). Die unzureichende Expression von SOCS1 resultierte in einer beeinträchtigten Funktion der Treg-Zellen, was darauf hinweist, dass SOCS1 ein pathogener Faktor für systemische Autoimmunkrankheiten sein könnte (Fujimoto et al., 2004). Folgernd scheint, dass SOCS1 wichtig für die Treg-Zell-Funktion ist, wohingegen SOCS3 in funktionellen Treg-Zellen herunter reguliert sein muss. Derzeit gibt es keine Daten über den Zusammenhang anderer SOCS-Moleküle und Treg-Zellen.

Da SOCS-Moleküle einen Einfluss auf die Th1/Th2-Differenzierung ausüben, könnten sie für die Allergieentwicklung wichtig sein. Nur wenige Humanstudien haben die Expressionslevel von bestimmten SOCS-Molekülen in Allergiepatienten untersucht. Es wurde demonstriert, dass erhöhte SOCS3-Expression in T-Zellen mit dem Auftreten von Asthma und atopischen Ekzemen korreliert (Seki et al., 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass spezifische Haplotypen des SOCS3-Gens signifikant mit dem allergischen Phänotyp assoziiert sind

(Ekelund et al., 2006). Kürzlich wurde eine signifikante Verbindung zwischen einem Polymorphismus im SOCS1-Promoter, welcher die SOCS1-Transkription erhöht, und dem verstärkten Auftreten von Krankheitssymptomen bei Asthmatikern festgestellt (Harada et al., 2007, Starr et al., 1998). Zur Bedeutung von CIS und SOCS5 im Hinblick auf allergische Erkrankungen liegen im Humansystem bisher keine Daten vor.

Das Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung von Mechanismen die allergischen Erkrankungen zugrunde liegen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit, die Expression von Signalproteinen im Zusammenhang mit Th-Zell-Differenzierung und allergischer Sensibilisierung analysiert.

2. Zielstellung

Das erhöhte Vorkommen allergischer Erkrankungen während der letzten Jahre erfordert die weitere Aufklärung von molekularen Mechanismen und die Ermittlung von Faktoren, die zur Entstehung allergischer Erkrankungen führen. Da allergische Erkrankungen auf einer Fehlregulation auf der Ebene der T-Lymphozyten, speziell der Th-Zellen basieren, stehen insbesondere Parameter der T-Zell-Immunität, vor allem die Th1/Th2-Regulation im Zentrum des Interesses.

Meine Aufgabe im Rahmen der LISA-Studie umfasste deshalb die molekularbiologische Untersuchung der Expression von Signalproteinen, die insbesondere bei der T-Zell-Differenzierung eine Rolle spielen und damit potentiell auch für die Entwicklung einer allergischen Reaktionslage von Bedeutung sein könnten, innerhalb einer Querschnittspopulation 6-jähriger Kinder.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit,

- die mRNA-Expression von SOCS-Molekülen (SOCS1, SOCS3, SOCS5 und CIS) und T-Zell-Transkriptionsfaktoren (Tbet, GATA-3, FOXP3) aus Vollblutproben 6-jähriger LISA-Probanden zu analysieren sowie
- die Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern untereinander, zur Th1/Th2-Differenzierung und allergischen Sensibilisierungen zu untersuchen.

Insbesondere bei allergischen Erkrankungen besteht der Verdacht, dass Stressfaktoren bei der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle spielen. Im Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (Department Umweltimmunologie) wurde im Serum 6-jähriger Kinder die Konzentrationen der stress- und immunregulatorisch-relevanten Neuropeptide vasoaktives Intestinalpeptid (VIP), Somatostatin (SOM) und Substanz P (SP) bestimmt.

Ein weiteres Ziel der Studie war deshalb,

- die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Expression von den von mir gemessenen Signalmolekülen und Neuropeptiden.

Im Zusammenhang mit den schon erfolgten Untersuchungen im Rahmen der LISA-Studie sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, den Kenntnisstand bisheriger Studienergebnisse zu erweitern, indem molekulare Mechanismen aufgeklärt werden.

3. Originaldateien

doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02913.x

Clinical and Experimental Allergy, 38, 438–448

ORIGINAL PAPER Clinical Mechanisms in Allergic Disease

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd

Association between suppressors of cytokine signalling, T-helper type 1/T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children

C. Daegelmann*, G. Herberth*, S. Röder¹, O. Herberth¹, T. Giese¹, U. Krämer⁵, H. Behrendt¹, M. Borte^{11**}, J. Heinrich¹¹, F. Emmrich¹², I. Lehmann* and for the LISAplus study group¹

*Department of Environmental Immunology, ¹Department of Human Exposure Research and Epidemiology, UFZ – Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany; ²Institute for Immunology, University Heidelberg, Heidelberg, Germany; ³Epidemiology, IUF-Institute for Environmental Medicine Research, Duesseldorf, Germany; ⁴Division Environmental Dermatology and Allergy GSF-TUM, ZAUM – Centre for Allergy and Environment, Technical University Munich, Munich, Germany; ⁵Children's Hospital, Municipal Hospital St Georg, Leipzig, Germany; ⁶Department of Pediatrics, University of Leipzig, Leipzig, Germany; ⁷GSF-National Research Centre for Environment and Health, Institute of Epidemiology, Neuherberg, Germany and ⁸Institute of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Clinical and
Experimental
Allergy

Summary

Background Suppressors of cytokine signalling (SOCS) family members have been shown to play an important role in the balance of cytokines that determine the onset of T-helper type 1 (Th1)- and Th2-mediated immune responses. In particular, for cytokine-induced Src-homology 2 protein (CIS), SOCS1, SOCS3 and SOCS5, a role in the regulation of T cell differentiation has been discussed. However, only few data exist so far in the human system. **Objectives** The aim of the present study was to analyse the relationship between these suppressors and Th1/Th2 regulation as well as allergic sensitizations within a population-based study.

Methods Within the Lifestyle-Immune system-Allergy plus cohort study, mRNA was prepared from blood samples of 6-year-old children for the analysis of cytokines, transcription factors for T cell regulation and SOCS molecule expression by quantitative real-time polymerase chain reaction. In addition, total and specific IgE concentrations have been measured by the Pharmacia CAP System. A complete data set from 248 children was available.

Results Among the SOCS molecules investigated, only SOCS1 showed a strong positive correlation to allergic sensitizations. In addition, an up-regulated SOCS1 expression correlated with down-regulated T-box expressed in T cells (Tbet) and higher expression levels of GATA-binding protein 3 (GATA-3) and IL-4. No association between SOCS1 and forkhead box P3 (FOXP3) was observed. For SOCS3, SOCS5 and CIS, a contradictory picture was found. The expression of these SOCS molecules was positively correlated with Tbet and FOXP3 and (with the exception of CIS) negatively with IL-4.

Conclusions Our data suggest that SOCS3, SOCS5 and CIS, which correlate with an up-regulated Th1 and regulatory T cell activity, are without relevance for the allergic status. In contrast, SOCS1 might be involved in the development of a Th2-skewed immune response and subsequent allergic sensitizations.

Keywords allergic sensitization, children, CIS, IgE, SOCS1, SOCS3, SOCS5, Th1/Th2

Submitted 19 July 2007; revised 26 October 2007; accepted 9 November 2007

Correspondence:

Irina Lehmann, Department of Environmental Immunology, UFZ – Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany.
E-mail: irina.lehmann@ufz.de

¹The LISAplus study group comprises following partners:

GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Epidemiology, Neuherberg (Wichmann HE, Heinrich J, Bolte G, Belcredi P, Jacob B, Schoetzel A, Mosetter M, Schindler J, Hohnke A, Franke K, Laubereau B, Sausenthaler S, Thaqi A, Zirngibl A, Zutavern A); Department of Pediatrics, University of Leipzig (Borte M, Schulz R, Sierig G, Mirow K, Gebauer C, Schulze B); Department of Pediatrics, St Georg Hospital, Leipzig (Borte M, Diez U, Straub S); University of Leipzig, Institute of Clinical Immunology and Transfusion Medicine (Lehmann I, Sack U); Department of Pediatrics, Marien-Hospital, Wesel (von Berg A, Scholten C, Bollrath C, Groß I, Mölleman M); Bad Honnef (Schaaf B); Department of Human Exposure Research and Epidemiology, UFZ-Centre for Environmental Research

Introduction

The cytokine-induced Src-homology 2 protein (CIS) and suppressors of cytokine signalling (SOCS) are members of a family of intracellular proteins that have emerged as key physiological regulators of cytokine-mediated homeostasis including innate and adaptive immunity. These proteins are engaged in the negative regulation of cytokine signalling, primarily signalling associated with the Janus kinase – signal transducer and activator of transcription (JAK – STAT) pathway, a mechanism to modulate cytokine signalling to prevent a sustained and/or an excessive action of cytokines and growth factors. So far, eight different SOCS proteins have been described: CIS and SOCS1–7 [1].

Signal down-regulation through SOCS members has been shown to play an important role in the balance of cytokines that determine the onset of T-helper type 1 (Th1) and Th2-mediated immune responses.

Th1 and Th2 cells are two distinct T cell subsets, defined by different functional abilities and cytokine profiles [2, 3]. IFN- γ is the signature cytokine of Th1 cells and IL-4 is the corresponding signature cytokine of Th2 cells. GATA-binding protein 3 (GATA-3) is a Th2-specific transcription factor and up-regulated during Th2 differentiation [4, 5]. The transcription factor T-box expressed in T cells (Tbet) controls the expression of the hallmark Th1 cytokine IFN- γ [6]. Regulatory T cells (Treg) represent a further T cell subset that actively controls or suppresses the function of other cells. The CD4⁺CD25⁺ Tregs express the forkhead box P3 (FOXP3) transcription factor [7] and these cells are more present in healthy individuals than in allergic patients [8]. Moreover, as patients who specifically lack CD25⁺ Tregs develop severe eczema, elevated IgE levels, eosinophilia and food allergy [9], a great deal more study of Treg in allergy is warranted.

In particular, for CIS, SOCS1, SOCS3 and SOCS5, a role in the regulation of T cell differentiation has been discussed. SOCS1, which is mainly expressed in Th1 cells [10], is supposed to be particularly important for limiting IFN- γ -dependent-T cell activation [11, 12]. In addition, SOCS1 regulates responses to IL-12, *in vivo* [13]. SOCS3 is

preferentially expressed in Th2 cells [10]. This SOCS molecule also represses IFN- γ signalling but less potently than SOCS1 [11, 14]. Recent analyses indicated that SOCS3 negatively regulates the IL-12 to STAT4 Th1 pathway [12, 15]. SOCS5, which was found to be expressed in Th1 cells, plays a role as a specific negative regulator for Th2 differentiation by repressing IL-4-induced signalling [16]. Although *in vitro* studies suggest that SOCS5 in T cells appeared to bias CD4⁺ cells towards Th1, there is no defect in Th differentiation in SOCS5-deficient mice [17]. CIS is the most abundant SOCS member expressed in activated T cells. Both Th1 and Th2 cells express high levels of CIS [18]. In CIS transgenic mice, helper T cells tend to differentiate into Th2 cells [19].

SOCS molecules might control the immune system function also via Treg. A down-regulation of SOCS3 supports a regulatory phenotype of T cells [20–23] whereas insufficient expression of SOCS1 results in impaired function of Treg [24–26].

Owing to their influence on Th1/Th2 differentiation, the above-mentioned SOCS molecules might also be important for allergy development. Few studies in humans have investigated the expression levels of certain SOCS molecules in allergic patients. For example, increased SOCS3 expression in T cells has been shown to correlate with the severity of asthma and atopic dermatitis [15]. Furthermore, Ekelund et al. [27] have reported that SOCS3 is consistently more highly expressed in skin from patients with atopic dermatitis than in normal control skin. In addition, specific haplotypes of the SOCS3 gene have been shown to be significantly associated with the allergic phenotype. Recently, a significant association has been found between a polymorphism in the SOCS1 promoter, which enhances the transcription of SOCS1, and the occurrence of disease symptoms in asthmatic patients [12, 28]. So far, no data are available concerning the relevance of CIS and SOCS5 in humans.

Although, there is some evidence that the expression of SOCS molecules might in fact be important for the development of an allergic reactivity, there is still a lack of knowledge in particular regarding the functional relevance of these regulatory molecules in the human system,

Footnote Continued

Leipzig-Halle (Herbarth O, Bauer M, Franck U, Graebisch C, Mueller A, Rehwagen M, Richter M, Roeder S, Rolle-Kampczyk U, Schlink U, Albrecht S, Jorks A); Department of Environmental Immunology, UFZ-Centre for Environmental Research Leipzig-Halle (Lehmann I, Herberth G, Daegelmann C); Department of Pediatrics/Infectious diseases and Immunology, Ludwig Maximilians University, Munich (Weiss M, Albert M); Institute of Clinical Immunology, Friedrich-Schiller-University, Jena, (Fahlbusch B); Institute of Social, Occupational and Environmental Medicine (Bischof W, Koch A); IUF-Institut für Umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf (Krämer U, Link E, Ranft U, Schins R, Sugiri D); Department of Pediatrics, Technical University, Munich (Bauer CP, Brockow I, Gröbl A); Department of Dermatology, Technical University, Munich (Ring J, Grosch J, Darso U, Weidinger S); Centre for Allergy and Environment, Technical University, Munich (Behrendt H, Kasche A, Buters J, Traidl-Hoffmann C); CCG Paediatric Immunology, Ludwig Maximilians University, Munich and GSF-National Research Center for Environment and Health (Krauss-Etschmann S); Institute of Social Medicine, University of Luebeck (Schäfer T).

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd, *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 438–448

which calls for further investigations. For the first time, we have used a population-based approach to study the association of SOCS molecules and the development of an allergic reactivity. Within a children's cohort study, the relationship between CIS, SOCS1, SOCS3 and SOCS5 and Th1/Th2 regulation as well as allergic sensitizations was analysed.

Methods

Study design and subjects

The Lifestyle-Immune System-Allergy (LISA) study was designed to investigate the influence of lifestyle and environmental factors on the maturation of the immune system and the atopic risk in early childhood. Three thousand ninety-seven newborns, born between December 1997 and January 1999 in the four German cities Munich, Leipzig, Wesel and Bad Honnef, were included in this population-based study. Only healthy term neonates of German descent were included. Newborn children whose mothers suffered from autoimmune disease or infectious disorders during pregnancy were excluded. The study design has been described in detail elsewhere [29]. Children from this study were followed up regularly from infancy to 6 years of age with clinical examinations and blood sampling.

At the age of 6, a clinical investigation was performed in a children's hospital. Blood samples were taken for the determination of IgE concentrations, and in the sub cohort from the city of Leipzig for further analysis of immunological parameters. Five hundred and sixty-five 6 year old children from the city of Leipzig participated in the study. Blood samples were accessible from 324 of these children.

Participation in the study was voluntary; informed consent was obtained from the parents of all children. The study was approved by the Ethics Committees of the University of Leipzig.

RNA preparation

Heparinized blood was obtained by venipuncture and RNA extraction was performed as described previously [30]. Briefly, 1 mL of heparinized blood (1 mL) was incubated with 1 mL of complete RPMI 1640 (containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.01% penicillin, 0.0085% streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.35% β -mercaptoethanol) for 3 h at 37 °C and 5% CO₂. After red cell lysis twice with hypotonic buffer (0.83% NH₄Cl, 0.1% KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.2), leucocytes were lysed with 400 μ L of MagNA Pure lysis buffer containing additional 1% DTT (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and the sample was frozen at -80 °C.

After thawing, RNA extraction was performed with an automated standardized protocol for human whole blood

using the MagNA Pure LC system and the MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Roche Applied Science). The elution volume was set to 50 μ L. One aliquot of 8.2 μ L was reverse transcribed using AMV-RT and oligo-(dT) as the primer (First Strand cDNA synthesis Kit; Roche Applied Science) according to the manufacturer's protocol in a thermocycler. After termination of the cDNA synthesis, the reaction mix was stored at -20 °C until PCR analysis.

Real-time polymerase chain reaction

Reverse transcriptase products were amplified by a real-time PCR with a LightCycler Fast Start DNA SYBR Green Kit (Roche Applied Science). Reagent kits with primers and standards for SOCS1, SOCS3, SOCS5, CIS, GATA-3, Tbet, FOXP3 and β -Actin and the amplification protocols were obtained from Search-LC (Heidelberg, Germany, www.Search-LC.com). PCR reactions were performed according to the manufacturer's instruction. Primers for IL-4 were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). The primer sequences for IL-4 were sense 5'-AGA AGA CTC TGT CAC CGA TTGA-3' and antisense 5'-CTC TCA TGA TCG TCT TTA GCC TTT-3'. IL-4 standard was synthesized by GenExpress (Berlin, Germany). The amplification protocol used for IL-4 primers was 5 °C, 1 s; 68 °C, 10 s; 72 °C, 16 s, with a lowered annealing temperature of 0.5 °C per cycle until reaching the final annealing temperature of 58 °C at cycle 17. Data were obtained during the exponential phase of the amplification and are therefore quantitative. Quantification of transcript concentration for the measured genes was performed by external standardization. To control the integrity of mRNA, the control gene β -actin was analysed in parallel. Data are presented as the ratio between the copy number of the target gene and the copy number of the housekeeping gene β -actin.

Total and specific immunoglobulin E

To characterize the atopic status, IgE serum concentrations were determined by the Pharmacia CAP System (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany). Sera were screened for total IgE and for specific IgE against inhalant (SX1) and food allergens (FX5) by two multi-allergen panels. SX1 (CAP FEIA) includes house dust mite (HDM) (*Dermatophagoides pteronyssinus*), cat, dog, timothy, rye, birch and mugwort; FX5 (CAP FEIA) contains the food allergens hen's egg, cow's milk, fish, wheat, peanut and soy. Samples with specific IgE concentrations >0.35 kU/L were regarded as positive. Sera with positive results in the multi-allergen panels were tested for the single allergens.

For total IgE, the cut-off was set at 180 kU/L as this value was published as the 95% value of the cumulative

frequency distribution of total IgE in the reference area Borken, Germany [31, 32].

Intracellular cytokine staining

Flow-cytometric detection of intracellular cytokines was performed as previously described [33]. Briefly, 100 µL heparinized blood in 900 µL RPMI was stimulated with 10 ng/mL of phorbol myristate acetate (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) and 1 µM of ionomycin (Calbiochem, Bad Soden, Germany) in the presence of 2.5 µM of monensin (Sigma Aldrich) for 5 h at 37 °C and 5% CO₂. Stimulated cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin.

Cells were simultaneously stained with fluorescence-labelled monoclonal antibodies (MAbs) against the T cell surface markers (CD3, CD4, CD8) and against the human cytokines IFN-γ and IL-4, all obtained from Beckman-Coulter (Krefeld, Germany). Fluorescence-labelled cells were analysed in a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) using Cellquest software. In all samples, 10 000 cells were collected. Results are given as percentages of cytokine-producing cells of the respective cell populations.

Statistical analysis

Owing to the fact that the functional relationship between suppressors of cytokine signalling and allergic sensitization is not yet clear, SOCS expressions were categorized using quartiles (first, second, third, fourth) as cut-off values and included in the models with the lowest quartile as reference. Data for suppressors of cytokine signalling are presented as median with 25–75 percentiles. Trend tests were applied to detect dose-response relations. Multiple logistic regression models were used to determine adjusted odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) for the association between suppressors of cytokine signalling expressions and allergic sensitization. OR were adjusted for family atopy history (FAH), gender, parental school education, pet keeping, exposure to environmental tobacco smoke, breastfeeding and the presence of siblings. In the same models, trend calculation was performed basing on categorized SOCS expression variables. The correlation between SOCS and T cell regulatory factors was tested using the non-parametric Spearman's rank correlation test. The Jonckheere-Terpstra test was used for trend calculation for the association between suppressors of cytokine signalling expression and IFN-γ CD4⁺-producing T cells as well as with IL-4 CD4⁺-producing T cells. Statistical analysis was performed with STATISTICA for Windows Version 7.0 (Statsoft Inc.) and StatXact version 6.2 (Cytel Inc., Cambridge, MA, USA).

Results

Characteristics of the study subjects

From the initial 565 6 year old participants from Leipzig, 324 blood samples were obtained. Complete data for IgE, mRNA, intracellular cytokine staining and all confounding variables were available from 248 children [120 girls (48.4%) and 128 boys (51.6%)]. There was a reduction of case numbers because the amount of blood was not sufficient for all participants for all analyses or parents did not give consent for genetic (DNA/RNA) analysis. The basic characteristics of the subset of the population are given in Table 1. Regarding the investigated parameter, there was no difference between the analysed subcohort ($n = 248$) and the remaining children from the LISA cohort from Leipzig ($n = 317$) (Table 1). Among the 248 investigated children, 68 (27.4%) reacted against the inhalant (SX1) and 31 (12.5%) against food allergens (Table 2).

Table 1. Characteristics of the analysed sub cohort ($n = 248$) and the remaining children of the overall LISA cohort from Leipzig (due to missing information for some characteristics, number of subjects varies between 309 and 317)

Variables	Analysed subcohort <i>n/N</i> (%)	Remaining subjects of LISA cohort <i>n/N</i> (%)	<i>P</i> -value
Breastfeeding			
Yes	114/248 (46.0)	117/312 (37.5)	0.223
No	134/248 (54.0)	195/312 (62.5)	
Gender			
Male	128/248 (51.6)	146/317 (46.1)	0.437
Female	120/248 (48.4)	171/317 (53.9)	
Parental school education			
High	5/248 (2.0)	7/309 (2.3)	0.987
Intermediate	102/248 (41.1)	128/309 (41.4)	
Low	141/248 (56.9)	174/309 (56.3)	
Parental history of atopy			
None	133/248 (53.6)	188/317 (59.3)	0.349
Single positive	83/248 (33.5)	107/317 (33.8)	
Double positive	32/248 (12.9)	22/317 (6.9)	
Presence of siblings			
None	59/248 (23.8)	73/310 (23.5)	0.310
One	147/248 (59.3)	163/310 (52.6)	
Two	37/248 (14.9)	51/310 (16.5)	
Three or more	5/248 (2.0)	23/310 (7.4)	
Pet keeping			
Yes	112/248 (45.2)	144/314 (45.9)	0.921
No	136/248 (54.8)	170/314 (54.1)	
Smoking in the dwelling			
Daily	30/248 (12.1)	37/314 (11.8)	0.996
Once per week	3/248 (1.2)	5/314 (1.6)	
Occasionally	23/248 (9.3)	30/314 (9.6)	
Never	192/248 (77.4)	242/314 (77.1)	

LISA, Lifestyle-Immune System-Allergy.

Table 2. Frequency of allergic sensitizations

Variables	Frequency n/N (%)
Total IgE*	32/248 (12.9)
Specific IgE†	79/248 (31.9)
Food allergens	31/248 (12.5)
Hen's egg	6/248 (3.0)
Cow's milk	16/248 (6.5)
Peanut	9/248 (3.6)
Soy	6/248 (2.4)
Fish	3/248 (1.2)
Wheat flour	7/248 (2.8)
Inhalative allergens	68/248 (27.4)
Der p 1	41/248 (16.5)
Cat	18/248 (7.3)
Dog	10/248 (4.0)
Thimoty	35/248 (14.1)
Rye	30/248 (12.1)
Birch	25/248 (10.1)
Mugwort	16/248 (6.5)

*The total IgE were regarded as positive at values ≥ 180 kU/L.†A child was considered sensitized to specific allergens at specific IgE values ≥ 0.35 kU/L.Table 3. Mean and standard deviation of raw and relative expression levels of genes determined by real-time PCR from mRNA/cDNA separated from whole blood samples without further *ex vivo* stimulation

Median (25-75 percentile)		Relative expression level*
	Copy number/10µL	
β-actin	1 228 500 (217 700-3 145 000)	
SOCS1	6634 (3393-11 600)	5.225 (3.166-13.141)
SOCS3	4159 (640-12 835)	3.371 (2.011-5.144)
SOCS5	256 (29-721)	0.213 (0.053-0.327)
CIS	640 (91-2095)	0.548 (0.209-0.897)
GATA-3	6274 (1783-15 480)	5.607 (3.291-11.020)
Tbet	175 (27-937)	0.189 (0.080-0.394)
FOXP3	463 (116-1749)	0.516 (0.255-0.991)
IL-4	9238 (3748-17 953)	8.129 (3.814-21.398)

*Relative expression level = (copy number, e.g. SOCS1/copy number house-keeping gene β-actin) $\times$ 1000.

SOCS1, suppressors of cytokine signalling; GATA-3, GATA-binding protein 3; Tbet, T-box expressed in T cells; FOXP3, forkhead box P3; CIS, cytokine-induced Src-homology 2 protein.

Suppressors of cytokine signalling and T cell regulatory factors

The mean and standard deviation of raw and relative expression levels of each gene determined by quantitative real-time PCR are given in Table 3. For all analysed genes, the expression levels were above the background.

Table 4. Relation between suppressors of cytokine signalling and T cell regulatory factors, correlation coefficient from Spearman's correlation

	SOCS1	SOCS3	SOCS5	CIS
IL-4	0.49*	–0.16	–0.17	–0.04
GATA-3	0.36	0.07	0.20	0.29
Tbet	–0.22	0.34	0.48	0.30
FOXP3	0.04	0.37	0.32	0.22

*Significant correlation coefficients ($P < 0.05$) are marked bold.

Expression of T cell regulatory factors was analysed by quantitative real-time PCR from cDNA/mRNA samples prepared from heparinized whole blood samples of the study participants without further stimulation *ex vivo*.

GATA-3, GATA-binding protein 3; Tbet, T-box expressed in T cells; FOXP3, forkhead box P3; SOCS1, suppressors of cytokine signalling; CIS, cytokine-induced Src-homology 2 protein.

SOCS1 expression was positively correlated with GATA-3 and IL-4 expression and negatively correlated with Tbet. For SOCS3, reverse correlations were found as compared with SOCS1 (Table 4). SOCS3 was positively correlated with Tbet and negatively with IL-4. GATA-3 showed no association with SOCS3. As for SOCS3 and also for SOCS5, a positive correlation to Tbet and a negative correlation to IL-4 were found. CIS was positively correlated with both the Th1 regulatory factor Tbet and the Th2 regulation factor GATA-3. FOXP3, the marker for regulatory T cells, was not correlated with SOCS1 expression. In contrast, SOCS3, SOCS5 and CIS were positively correlated with FOXP3 (Table 4).

Suppressors of cytokine signalling and T-helper populations

Children with a higher SOCS1 mRNA expression had significantly lower amounts of PMA/ionomycin-stimulated IFN- γ -producing CD4⁺ T cells (P for trend = 0.03) than children with less SOCS1 mRNA expression. IL-4-producing T cells were not affected. Concerning SOCS3, the amount of IFN- γ or IL-4-producing T cells was not correlated with a higher SOCS3 mRNA expression. Amounts of IFN- γ producing Th1 cells tended to be elevated in children with a higher SOCS5 mRNA expression (P for trend = 0.06). Again, IL-4-producing T cells were not affected by SOCS5. In addition, there was a slightly positive trend between the amount of IL-4 producing T cells and a higher CIS mRNA expression (P for trend = 0.07). IFN- γ -producing T cells had no relationship with the level of CIS expression (Fig. 1).

Suppressors of cytokine signalling and allergic sensitization

The results of the multiple regression analysis for the association between SOCS1 and allergic sensitization

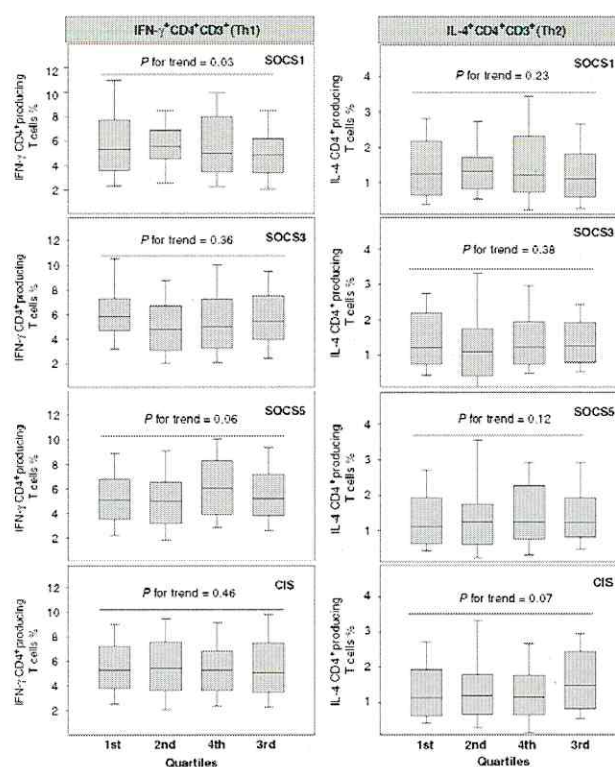


Fig. 1. Percentage of IFN- γ and IL-4 producing CD4 $^{+}$ T cells regarding SOCS1, SOCS3, SOCS5 and CIS expression. Whole blood samples of study participants were stimulated *ex vivo* for 5 h with PMA and ionomycin in the presence of monensin, subsequently stained for surface markers and intracellular cytokines and analysed by flow cytometry. SOCS1, SOCS3, SOCS5 and CIS expression levels were determined from mRNA/cDNA separated from the same blood samples by quantitative real-time PCR without further *ex vivo* stimulation. SOCS1, SOCS3, SOCS5 and CIS expression levels were categorized by using quartiles. Box plots represent medians and interquartile ranges of IFN- γ or IL-4 production in the respective quartiles; whiskers show the 10th and 90th percentile of cytokine production. P for trend from the Jonckheere-Terpstra test is given. SOCS1, suppressors of cytokine signalling; CIS, cytokine-induced Src-homology 2 protein.

(detectable IgE antibodies) are presented in Table 5. Although the trend test applied gives evidence of a positive correlation between SOCS1 expression and total IgE, the adjusted ORs did not show significance. However, there was a positive relationship between SOCS1 expression and the occurrence of any specific IgE ($OR_{0.4}$ 3.13, 95% CI 1.20–8.19; P for trend = 0.026) as well as the detectable IgE antibodies against the food allergen mix Fx5 ($OR_{0.4}$ 9.51, 95% CI 1.72–52.59; P for trend = 0.006) and the inhalative allergen mix Sx1 ($OR_{0.4}$ 3.14, 95% CI

1.17–8.40; P for trend = 0.027). Among the single inhalative allergens, SOCS1 correlated with a higher risk for allergic sensitization against HDM (Der p 1, $OR_{0.4}$ 4.65, 95% CI 1.35–16.01; P for trend = 0.003) and rye ($OR_{0.4}$ 4.27, 95% CI 1.06–17.13). However, for rye the trend test was not significant (P for trend = 0.163). Sensitizations to timothy and birch were not significantly correlated with the SOCS1 expression.

SOCS5, SOCS3 and CIS were not associated with any allergic sensitization (Tables 6–8). Owing to the low

Table 5. Frequency [% (n/N)] and risk (adjusted* OR with 95% CI) of detectable elevated serum IgE concentrations according to SOCS1 relative expression

	SOCS1				P for trend
	First quartile {0–3.2}	Second quartile {3.2–5.3}	Third quartile {5.3–13.1}	Fourth quartile {13.1–1327.7}	
Total IgE >180 kU/L	9.7% (6/62) 1.00	8.1% (5/62) 1.00 (0.09–10.92)	14.5% (9/62) 1.55 (0.49–4.92)	19.4% (12/62) 2.85 (0.91–8.97)	0.042
Specific IgE	22.6% (14/62) 1.00	33.9% (21/62) 2.94 (1.13–7.66)	33.9% (21/62) 2.10 (0.89–4.97)	37.1% (23/62) 3.13 (1.20–8.19)	0.026
Food allergens	3.2% (2/62) 1.00	12.9% (8/62) 7.96 (1.25–50.55)	16.1% (10/62) 7.5 (1.43–39.77)	17.7% (11/62) 9.51 (1.72–52.59)	0.006
Inhalative allergens	19.4% (12/62) 1.00	29.1% (18/62) 3.06 (1.09–8.60)	27.4% (17/62) 1.81 (0.73–4.52)	33.9% (21/62) 3.14 (1.17–8.40)	0.027
Der p 1	9.7% (6/62) 1.00	9.7% (6/62) 1.30 (0.25–6.77)	21.0% (13/62) 2.61 (0.87–7.82)	25.8% (16/62) 4.65 (1.35–16.01)	0.003
Timothy	9.7% (6/62) 1.00	16.1% (10/62) 2.50 (0.72–8.66)	12.79% (8/62) 1.20 (0.36–4.09)	17.7% (11/62) 3.20 (0.93–10.97)	0.135
Rye	8.1% (5/62) 1.00	14.5% (9/62) 2.93 (0.76–11.27)	9.7% (6/62) 1.20 (0.34–4.25)	16.1% (10/62) 4.27 (1.06–17.13)	0.163
Birch	9.7% (6/62) 1.00	8.1% (5/62) 1.15 (0.29–4.57)	12.9% (8/62) 1.50 (0.45–4.96)	9.7% (6/62) 1.31 (0.35–4.95)	0.567

SOCS1 expression was analysed by quantitative real-time PCR from cDNA/mRNA samples prepared from heparinized whole blood samples without further stimulation *ex vivo*.

*Adjusted for: family atopy history, gender, siblings, parental school education, pet keeping, smoking in the dwelling and breastfeeding. Significant values are marked bold.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; SOCS1, suppressors of cytokine signalling.

Table 6. Frequency [% (n/N)] and risk (adjusted* OR with 95% CI) of detectable elevated serum IgE concentrations according to SOCS3 relative expression

	SOCS3				P for trend
	First quartile {0–2.0}	Second quartile {2.0–3.4}	Third quartile {3.4–5.1}	Fourth quartile {5.1–315.8}	
Total IgE > 180 kU/L	11.3% (7/62) 1.00	11.3% (7/62) 1.03 (0.29–3.71)	11.3% (7/62) 1.09 (0.35–3.44)	17.7% (11/62) 3.01 (0.87–10.39)	0.247
Specific IgE	29.0% (18/62) 1.00	35.5% (22/62) 1.40 (0.60–3.25)	29.0% (18/62) 0.98 (0.42–2.29)	33.9% (21/62) 1.30 (0.51–3.33)	0.730
Food allergens	12.9% (8/62) 1.00	14.5% (9/62) 1.06 (0.33–3.44)	12.9% (8/62) 1.20 (0.36–4.03)	9.8% (6/62) 0.92 (0.23–3.57)	0.609
Inhalative allergens	24.2% (15/62) 1.00	29.0% (18/62) 1.36 (0.56–3.33)	22.6% (14/62) 0.93 (0.37–2.35)	33.9% (21/62) 1.97 (0.74–5.24)	0.261
Der p 1	14.5% (9/62) 1.00	17.7% (11/62) 1.16 (0.39–3.38)	11.3% (7/62) 0.74 (0.24–2.31)	22.6% (14/62) 1.90 (0.64–5.62)	0.395
Timothy	14.5% (9/62) 1.00	16.1% (10/62) 1.17 (0.40–3.47)	9.7% (6/62) 0.65 (0.20–2.14)	16.1% (10/62) 1.33 (0.42–4.20)	0.930
Rye	14.5% (9/62) 1.00	11.3% (7/62) 0.85 (0.27–2.71)	9.7% (6/62) 0.65 (0.20–2.14)	12.9% (8/62) 1.08 (0.32–3.61)	0.997
Birch	14.5% (9/62) 1.00	4.8% (3/62) 0.28 (0.07–1.13)	8.1% (5/62) 0.59 (0.16–2.18)	12.9% (8/62) 1.19 (0.35–4.04)	0.881

SOCS3 expression was analysed by quantitative real-time PCR from cDNA/mRNA samples prepared from heparinized whole blood samples without further stimulation *ex vivo*.

*Adjusted for: family atopy history, gender, siblings, parental school education, pet keeping, smoking in the dwelling and breastfeeding.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; SOCS3, suppressors of cytokine signalling.

Table 7. Frequency [% (n/N)] and risk (adjusted* OR with 95% CI) of detectable elevated serum IgE concentrations according to SOCS5 expression

	SOCS5				P for trend
	First quartile (0–0.05)	Second quartile (0.05–0.21)	Third quartile (0.21–0.33)	Fourth quartile (0.33–61.84)	
Total IgE >180 kU/L	16.1% (10/62) 1.00	16.1% (10/62) 0.92 (0.32–2.62)	11.3% (7/62) 0.70 (0.23–2.14)	8.1% (5/62) 0.33 (0.09–1.21)	0.123
Specific IgE	33.9% (21/62) 1.00	37.1% (23/62) 0.82 (0.36–1.91)	29.0% (18/62) 0.81 (0.35–1.87)	27.4% (17/62) 0.52 (0.21–1.25)	0.206
Food allergens	14.5% (9/62) 1.00	14.5% (9/62) 0.76 (0.25–2.31)	8.1% (5/62) 0.57 (0.16–1.95)	12.9% (8/62) 0.77 (0.25–2.36)	0.658
Inhalative allergens	30.6% (19/62) 1.00	32.3% (20/62) 0.78 (0.32–1.91)	24.2% (15/62) 0.69 (0.28–1.70)	22.6% (14/62) 0.48 (0.19–1.21)	0.121
Der p 1	21.0% (13/62) 1.00	12.9% (8/62) 0.34 (0.11–1.08)	16.1% (10/62) 0.67 (0.23–1.90)	16.1% (10/62) 0.52 (0.19–1.46)	0.430
Timothy	12.9% (8/62) 1.00	21.0% (13/62) 1.70 (0.56–5.16)	9.7% (6/62) 0.79 (0.24–2.62)	1.6% (1/62) 0.98 (0.32–3.00)	0.442
Rye	12.9% (8/62) 1.00	17.7% (11/62) 1.68 (0.56–5.05)	6.5% (4/62) 0.52 (0.14–1.95)	11.3% (7/62) 0.88 (0.27–2.86)	0.351
Birch	16.1% (10/62) 1.00	11.3% (7/62) 0.50 (0.15–1.65)	4.8% (3/62) 0.28 (0.06–1.18)	8.1% (5/62) 0.40 (0.12–1.37)	0.079

SOCS5 expression was analysed by quantitative real-time PCR from cDNA/mRNA samples prepared from heparinized whole blood samples without further stimulation *ex vivo*.

*Adjusted for: family atopy history, gender, siblings, parental school education, pet keeping, smoking in the dwelling and breast-feeding.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; SOCS5, suppressors of cytokine signalling.

Table 8. Frequency [% (n/N)] and risk (adjusted* OR with 95% CI) of detectable elevated serum IgE concentrations according to CIS relative expression

	CIS				P for trend
	First quartile (0–0.21)	Second quartile (0.21–0.55)	Third quartile (0.55–0.90)	Fourth quartile (0.90–65.46)	
Total IgE >180 kU/L	11.3% (7/62) 1.00	8.1% (5/62) 0.51 (0.12–2.23)	14.5% (9/62) 1.26 (0.40–3.98)	17.7% (11/62) 1.57 (0.52–4.68)	0.227
Specific IgE	25.8% (16/62) 1.00	38.7% (24/62) 1.66 (0.72–3.80)	30.6% (19/62) 1.14 (0.47–2.76)	32.3% (20/62) 1.15 (0.48–2.74)	0.848
Food allergens	9.7% (6/62) 1.00	17.7% (11/62) 2.15 (0.64–7.25)	9.7% (6/62) 0.93 (0.24–3.58)	12.9% (8/62) 1.32 (0.39–4.42)	0.938
Inhalative allergens	22.6% (14/62) 1.00	27.4% (17/62) 1.13 (0.45–2.83)	29.0% (18/62) 1.24 (0.49–3.15)	30.7% (19/62) 1.28 (0.52–3.14)	0.409
Der p 1	16.1% (10/62) 1.00	12.9% (8/62) 0.52 (0.16–1.67)	16.1% (10/62) 0.86 (0.29–2.55)	21.0% (13/62) 1.27 (0.47–3.41)	0.322
Timothy	8.1% (5/62) 1.00	16.1% (10/62) 2.37 (0.68–8.30)	16.1% (10/62) 2.43 (0.69–8.52)	16.1% (10/62) 2.37 (0.70–8.06)	0.269
Rye	8.1% (5/62) 1.00	14.5% (9/62) 1.98 (0.57–6.84)	12.9% (8/62) 1.90 (0.52–7.01)	12.9% (8/62) 1.79 (0.49–6.52)	0.480
Birch	11.3% (7/62) 1.00	9.7% (6/62) 0.76 (0.21–2.76)	6.5% (4/62) 0.33 (0.07–1.63)	12.9% (8/62) 1.23 (0.38–3.92)	0.944

CIS expression was analysed by quantitative real-time PCR from cDNA/mRNA samples prepared from heparinized whole blood samples without further stimulation *ex vivo*.

*Adjusted for: family atopy history, gender, siblings, parental school education, pet keeping, smoking in the dwelling and breastfeeding.

OR, odds ratio; CI, confidence interval; CIS, cytokine-induced Src-homology 2 protein.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd, *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 438–448

numbers of positive cases, associations between SOCS1, SOCS3, SOCS5 and CIS expression and sensitization to the single food allergens hen's egg (3.0%), cow's milk (6.5%), peanut (3.6%), fish (1.2%), wheat (2.8%), soy (2.4%) and to the single inhalative allergens cat (7.3%), dog (4.0%) and mugwort (6.5%) could not be calculated (Table 2). Thus, these allergens are not included in the presentation of the results.

Discussion

Among the investigated SOCS molecules, only SOCS1 showed a strong correlation to the development of allergic sensitizations. This result is supported by the positive association between SOCS1 expression and the Th2 differentiation markers GATA-3 and IL-4. In addition, we observed a negative correlation between SOCS1 and Tbet, the key transcription factor for Th1 cells, and a failing association between SOCS1 and the Treg factor FOXP3. For SOCS3, SOCS5 and CIS, a contradictory picture was found. The expression of these SOCS molecules was positively correlated with Tbet and FOXP3 and (with the exception of CIS) negatively with IL-4. SOCS3, SOCS5 and CIS were of no relevance for the allergic status.

Although whole blood was used for the expression analysis and the proportions of different cell types may differ in different samples, we were able to observe correlations between the expression of SOCS molecules and T cell regulatory factors. Even if both SOCS and T cell regulatory factors are not always co-expressed in the same cell, there should be a functional association between these factors.

It has been speculated that Th1 down-regulation by SOCS1 may not only result in an accelerated Th2 response but also in Th2-related diseases like allergy [34]. Our data obtained in the human system support this hypothesis and confirm the findings from mouse models. In association with up-regulated SOCS1 expression, not only reduced numbers of IFN- γ -producing Th1 cells but also higher sensitization frequencies were found. In addition, we found that a high expression of SOCS1 correlates with high values of IL-4 and GATA-3 expression. We hypothesize that the elevated SOCS1 expression supports the development of a Th2 phenotype and subsequently allergic sensitization. But we cannot exclude the possibility that the higher SOCS1 expression level occurs as a result of Th2-polarized T cell reactivity.

Mouse studies showed a high expression of SOCS1 in regulatory T cells [25, 26]. In our study, SOCS1 was not correlated to FOXP3 expression, the marker of regulatory T cells. Because in this study SOCS1 expression was not directly assessed in Treg and Treg, represents only a minor subset of blood T cells, this result is not contradictory to previously reported data.

Overexpression studies showed that SOCS1 and SOCS3 inhibit IL-4 and IL-13 signalling [35]. These data appear to be contradictory to the positive correlation observed between SOCS1 and allergic sensitization. However, it has been clearly shown that IL-4/STAT6 signalling is repressed in SOCS1 expressing Th1 cells but not in Th2 cells that contain relatively low amounts of SOCS1 [10, 36]. Thus, high SOCS1 expression levels may lead to Th1 inhibition but do not influence the Th2-mediated IL-4 signalling.

SOCS3 is expressed in Th1 as well as Th2 cell populations. However, cells destined to become Th2 cells produce SOCS3 levels more than 20-fold higher than that produced by Th1 cells [10]. SOCS3 also represses IFN- γ signalling but less potently than SOCS1 [11, 14]. It has been postulated that SOCS3 regulates the onset and maintenance of Th2-mediated allergic diseases [15]. SOCS3-transduced dendritic cells in mice are inducers of Th2 cell differentiation. In addition, it has been shown that the absence of SOCS3 in dendritic cells results in the induction of FOXP3-positive Treg [37]. Moreover, in *in vitro* experiments it has been demonstrated that FOXP3 acts as a transcriptional suppressor for SOCS3 and this might be a mechanism by which T lymphocytes regulate SOCS3 levels to perpetuate the Treg phenotype [22]. In our study, we observed a positive correlation of SOCS3-FOXP3. This seems to be contradictory to the *in vitro* found data. Again, it might be explicable by the fact that SOCS3 is not only expressed in T cells but also in other immune cells like dendritic cells, macrophages, neutrophils, eosinophiles and natural killer T cells.

SOCS3 mRNA expression in the blood of children was negatively correlated with IL-4 mRNA expression and positively correlated with Tbet. Although SOCS3 expression levels have consistently been found to be higher in allergic patients, we observed no correlation between SOCS3 expressions and serum IgE concentrations. The negative correlation between IL-4 and SOCS3 and the positive correlation between SOCS3 and Tbet may support the failing association between SOCS3 and the allergic status observed in our study population. Data from a further study showing that SOCS3 is also expressed in normal unstimulated peripheral blood cells [38] may help to explain these obviously reverse results from our study compared with previously reported data. Children have higher amounts of naive unstimulated cells in their blood and lower levels of Th2 cells. Thus, a higher SOCS3 expression in unstimulated peripheral blood cells may overlay the probably higher SOCS3 expression in a small Th2 population.

In contrast to SOCS3, the expression of SOCS5 is limited to Th1 cells and is undetectable in Th2 cells [16]. Therefore, SOCS5 has been suggested to be a marker of the Th1 phenotype. A cytokine environment that favours Th1 commitment may induce SOCS5 expression, leading to a concurrent suppression of IL-4-induced STAT6 activation

[16, 18]. Thus, it has been speculated that SOCS5 exerts an inhibitory function on Th2 polarization. This is consistent with our SOCS5 expression data. We found that SOCS5 was negatively correlated with IL-4 mRNA and strong positively correlated with Tbet. However, although SOCS5 expression was negatively correlated with IL-4, there was also a slightly positive correlation of SOCS5 with GATA-3. Up to now, we cannot explain this contradictory result. The *in vivo* role of SOCS5 in T-helper cell differentiation, thus, remains to be clarified.

In the present study, CIS was positively correlated with GATA-3 as well as with Tbet; this supports previous findings that CIS is expressed in both Th1 and Th2 cells [12, 18]. Moreover, CIS expression was also correlated with FOXP3, suggesting that CIS might also be expressed in regulatory T cells. In mice, CIS has been shown to skew T-helper cell development towards Th2 [18, 19]. Our results cannot confirm these observations in the human system.

However, one general remark has to be made concerning the comparability of the data presented in this study with earlier published data. It has been shown that naïve CD4 T cells express lower levels of SOCS as well as Tbet, GATA-3 and FOXP3 compared with primed Th1 or Th2 cells [10, 39, 40]. The expression analyses in our study were carried out with whole-blood samples containing a mixture of naïve, effector and memory T cell subsets. This is likely the main reason why we have controversial results compared with previous data.

To the authors' knowledge, this study analyses for the first time the relationship between SOCS factors and allergic sensitization against the background of a population-based study. Besides the opportunity to study SOCS expression in a healthy population, a further strength of our study is the high number of study subjects included. In addition, no data on SOCS regulation in children were available so far. However, as usual, in population-based studies we also have the limitation to define the cause-effect relation in our observed associations. Another limitation of this study is the low case number of children sensitized for some specific allergens. The results obtained, therefore, have to be interpreted with caution, but nevertheless they provide orientation and encourage for further studies.

In summary, our data show that SOCS1 correlates with Th2 development and a higher risk for allergic sensitizations whereas SOCS3, SOCS5 and CIS are associated with an activation of Th1 and Treg and thereby are not relevant or even protective for allergy development. Although the molecular bases of SOCS molecule activity have been extensively investigated, there are still open questions concerning the *in vivo* relevance of these molecules in particular in the human system. It has been suggested that the current cytokine environment may

influence the expression profile of SOCS molecules. Thus, in the *in vivo* situation a different microenvironment compared with the situation in experimental settings may induce other SOCS profiles. Further investigations are necessary to clarify the role of SOCS molecules in *in vivo* situations.

Acknowledgements

We thank all of the families for their participation in this study. The study was supported by a grant from the Federal Ministry of Environment (FKZ 20462296).

References

- Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS *et al*. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:114–9.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145–73.
- Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 635–73.
- Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997; 272:21597–603.
- Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587–96.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100:655–69.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M *et al*. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737–42.
- Akdis M, Verhagen J, Taylor A *et al*. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567–75.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:430–5.
- Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 2002; 168: 3181–7.
- Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 1998; 273: 35056–62.
- Starr R, Willson TA, Viney EM *et al*. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387:917–21.

- 13 Eyles JL, Metcalf D, Grusby MJ, Hilton DJ, Starr R. Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1. *J Biol Chem* 2002; 277:43735–40.
- 14 Federici M, Giustizieri ML, Scarponi C, Girolomoni G, Albanesi C. Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol* 2002; 169:434–42.
- 15 Seki Y, Inoue H, Nagata N et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses. *Nat Med* 2003; 9:1047–54.
- 16 Seki Y, Hayashi K, Matsumoto A et al. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13003–8.
- 17 Brender C, Columbus R, Metcalf D et al. SOCS5 is expressed in primary B and T lymphoid cells but is dispensable for lymphocyte production and function. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6094–103.
- 18 Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Vistica BP, Gery I, Egwuagu CE. Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells. *J Biol Chem* 2003; 278:29752–9.
- 19 Matsumoto A, Seki Y, Kubo M et al. Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6396–407.
- 20 Kinjyo I, Inoue H, Hamano S et al. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* 2006; 203:1021–31.
- 21 Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K et al. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179:2170–9.
- 22 Muthukumarana P, Chae WJ, Maher S, Rosengard BR, Bothwell AL, Metcalfe SM. Regulatory transplantation tolerance and "stemness": evidence that Foxp3 may play a regulatory role in SOCS-3 gene transcription. *Transplantation* 2007; 84 (Suppl.): S6–11.
- 23 Pillemer BB, Xu H, Oriss TB, Qi Z, Ray A. Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function. *Eur J Immunol* 2007; 37:2082–9.
- 24 Fujimoto M, Tsutsui H, Xinshou O et al. Inadequate induction of suppressor of cytokine signaling-1 causes systemic autoimmune diseases. *Int Immunol* 2004; 16:303–14.
- 25 Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3:33–41.
- 26 McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16:311–23.
- 27 Ekelund E, Saaf A, Tengvall-Linder M et al. Elevated expression and genetic association links the SOCS3 gene to atopic dermatitis. *Am J Hum Genet* 2006; 78:1050–5.
- 28 Harada M, Nakashima K, Hirota T et al. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:491–6.
- 29 Borte M, Schulz R, Lehmann I et al. Influence of lifestyle and behaviour on the development of the immune system and allergic diseases. The LISA birth cohort study. In: Merker N, Göpfert P, Kirch W, eds. *Public health research and practise*. Regensburg: S. Roderer Verlag, 2001; 59–77.
- 30 Herberth G, Daegelmann C, Weber A et al. Association of neuropeptides with Th1/Th2 balance and allergic sensitization in children. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1408–16.
- 31 Kramer U, Link E, Oppermann H et al. Studying school beginners in western and eastern Germany: allergy trends and sensitizations 1991–2000. *Gesundheitswesen* 2002; 64:657–63.
- 32 Behrendt H, Krämer U, Dolgner R et al. Elevated levels of total serum IgE in East German children: atopy, parasites, or pollutants? *Allergo J* 1993; 2:31–40.
- 33 Lehmann I, Thielke A, Weiss M et al. T cell reactivity in neonates from an East and a West German city – results of the LISA study. *Allergy* 2002; 57:129–36.
- 34 Elliott J, Johnston JA. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol* 2004; 25:434–40.
- 35 Hebenstreit D, Luft P, Schmidlechner A, Duschl A, Horejs-Hoeck J. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells. *Mol Immunol* 2005; 42:295–303.
- 36 Dickensheets H, Vazquez N, Sheikh F et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes Immun* 2007; 8: 21–7.
- 37 Li Y, Chu N, Rostami A, Zhang GX. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006; 177:1679–88.
- 38 Egwuagu CE, Yu CR, Li Z, Nussenblatt RB. SOCS5 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): a potential biomarker for monitoring response of uveitis patients to Daclizumab therapy. *J Autoimmun* 2005; 24:39–46.
- 39 Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods* 2003; 278:157–69.
- 40 Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin Invest* 2003; 112:1437–43.

ORIGINAL PAPER

Clinical and Experimental Allergy, 36, 1408–1416

© 2006 The Authors

Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd

Association of neuropeptides with Th1/Th2 balance and allergic sensitization in children

G. Herberth*, C. Daegelmann*, A. Weber*, S. Röder†, T. Giese†, U. Krämer§, R. P. F. Schins§, H. Behrendt||, M. Borte**†† and I. Lehmann*, for the LISApplus study group

*Department of Environmental Immunology, UFZ Centre for Environmental Research, Leipzig-Halle, Germany; †Department of Human Exposure Research and Epidemiology, UFZ Centre for Environmental Research, Leipzig-Halle Leipzig, Germany; ‡Institute for Immunology, University Heidelberg, Heidelberg, Germany; §IUF-Institut fuer Umweltmedizinische Forschung, Epidemiology, Dusseldorf, Germany; ¶IUF-Institut fuer Umweltmedizinische Forschung, Particle Research Group, Dusseldorf, Germany; ||Division Environmental Dermatology and Allergy GSF/TUM, ZAUM-Center for Allergy and Environment, Technical University Munich, Munich, Germany; **Children's Hospital, Municipal Hospital 'St Georg', Leipzig, Germany and ††Department of Pediatrics, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Clinical and
Experimental
Allergy

Summary

Background Among neurogenic factors, the neuropeptides have an important regulatory influence on immune system activity and may lead to allergic sensitization.

Objective The aim of our study was to investigate the relationship of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin (SOM) and substance P (SP) on modulation of Th1/Th2 balance and allergic sensitization in children.

Methods Within the LISApplus (Life style-Immune system-Allergy) study, blood samples of 321 six-year-old children were analysed for concentration of neuropeptides, Th1 and Th2 cytokines, transcription factors for T cell regulation and suppressors of cytokine signalling. In addition, samples were screened for specific IgE against inhalant and food allergens.

Results Children with high SOM values showed a Th2 polarization and a reduced expression of FOXP3, the marker for regulatory T cells. High (VIP) levels correlated inversely with the expression of T cell transcription factors (Tbet and SOCS3). In contrast, elevated levels of SP were associated with reduced GATA3 and SOCS3 expression and with increased IFN- γ concentrations. Allergic sensitization was more prevalent in children with higher SOM and VIP concentrations but not associated with SP levels.

Conclusion Our data reveal an association between neuropeptides and modulatory effects on immune cells *in vivo*, especially on Th1/Th2 balance with a correlation to allergic sensitization in children. We suggest that elevated SOM and VIP concentrations and the inducing factors should be considered as allergy risk factors.

Keywords allergic sensitization, children, neuropeptides, somatostatin, substance P, Th1/Th2 balance, vasoactive intestinal peptide

Submitted 15 May 2006; revised 03 July 2006; accepted 16 August, 2006

Correspondence:
Gunda Herberth, UFZ Centre for
Environmental Research Leipzig-Halle,
Department of Environmental
Immunology, Permoserstrasse 15,
Leipzig 04318, Germany.
E-mail: gunda.herberth@ufz.de

LISApplus Study Group: GSF-National Research Centre for Environment and Health, Neuherberg, Institute of Epidemiology (H. E. Wichmann, J. Heinrich, T. Illig); IUF-Institut für Umweltmedizinische Forschung Düsseldorf, Epidemiology and Particle Research Group (U. Krämer, U. Ranft, R. P. F. Schins); UFZ-Centre for Environmental Research, Leipzig, Department of Environmental Immunology (I. Lehmann, G. Herberth), Department of Human Exposure Research and Epidemiology (O. Herbarth, S. Röder, U. Rolle-Kampczyk, U. Schlink, M. Rehwagen); Marien-Hospital Wesel, Department of Pediatrics (A. von Berg, B. Schaaf, C. Scholten, C. Bollrath); Technical University Munich, Department of Pediatrics (C.-P. Bauer), Department of Dermatology and Allergy (J. Ring), ZAUM-Center for Allergy and Environment (H. Behrendt); Municipal Hospital 'St Georg', Leipzig, Children's Hospital (M. Borte, U. Diez); Ludwig-Maximilians-University Munich, Dr von Haunersches Kinderspital, Paediatric Immunology (S. Krauss-Etschmann); Medical University Lübeck, Department of Social Medicine (T. Schäfer).

Introduction

Increasing evidence suggests that mediators of the nervous system play a role in the regulation of immune system function and may influence the development of immune system-related diseases. The neuro-immune axis is a bidirectional pathway of intersystem communication: immune responses alter neural function and, in turn, neural activity modifies immunologic function. It is clear that exchange of information is facilitated by the release of neuromediators and cytokines by either of these systems and by the shared expression of reciprocal receptors for these mediators. Besides the well-known neurogenic factors, glucocorticoids and catecholamines, which can modulate immune responses, neuropeptides are also discussed for their immunological effects. As an example, T lymphocytes and dendritic cells express receptors for the neuropeptides substance P (SP), somatostatin (SOM) and vasoactive intestinal peptide (VIP).

Several *in vitro* studies and, moreover, *in vivo* mouse models were able to demonstrate the immunomodulatory effects of these neuropeptides. In general, an immunosuppressive, anti-inflammatory mode of action is reported for VIP [1]. Thus, VIP is a suppressive neuropeptide for T cell proliferation and for the production of IL-2 and IFN- γ , acting as an anti-inflammatory mediator [2, 3]. Similarly, SOM is also inhibitory for T cell proliferation and has an anti-inflammatory capacity inhibiting IFN- γ production from human and murine T cells [4]. In contrast, SP has an immunostimulatory function with direct effects on T cell activation [5, 6].

In particular, the risk for the development of an allergic hyperreactivity depends directly on the differentiation of functional active T cell subpopulations. Thus, it can be speculated that the presence of neuropeptides in the microenvironment of differentiating T cells might have an influence on allergy risk. The aim of the present study was to investigate whether the concentration of neuropeptides in the serum of healthy children is associated with Th1/Th2 balance and allergic sensitizations. We analysed the concentration of the neuropeptides SOM, VIP and SP in whole-blood samples of 6-year-old children and correlated the neuropeptide levels in blood with specific immuneparameters of relevance for Th1/Th2 regulation: IFN- γ as an indicator for Th1 reactivity and IL-4, IL-5 and IL-9 as indicators for Th2 reactivity. In addition, the expression of the T cell transcription factors Tbet (expressed in Th1 cells) GATA3 (expressed in Th2 cells), and FOXP3 (expressed in regulatory T cells), and the suppressors of cytokine signalling (SOCS) SOCS1 and SOCS3 were analysed from mRNA samples by quantitative polymerase chain reaction (PCR).

Methods

Study design and subjects

Whole-blood samples were drawn from 6-year-old children from the LISAplus (Life style Immune System Allergy) study. This study was designed to investigate the influence of life style and environmental factors on the maturation of the immune system and the atopic risk in early childhood. Three thousand ninety-seven newborns, born between December 1997 and January 1999 in the four German cities Munich, Leipzig, Wesel and Bad Honnef, were recruited for the LISA study. Only healthy-term neonates of German descent were included. Newborn children whose mothers suffered from autoimmune disease or infectious disorders during pregnancy were excluded. The design of LISA has been described in detail elsewhere [7].

At the age of 6, a clinical investigation was performed in a children's hospital. Blood samples were taken for the determination of specific IgE concentrations, and in the subcohort from the city of Leipzig for further determinations of immunological parameters and neuropeptides. For the present analysis, we used only data from the city of Leipzig cohort, as the measurement of neuropeptides and T cell regulatory factors was performed only in this subgroup. Five hundred sixty-five 6-year-old children from the city of Leipzig participated in the study. For 324 of these children, parents gave consent for with blood collection.

Participation in the study was voluntary and informed consent was obtained from the parents of all children. The study was approved by the Ethics Committees of the University of Leipzig.

Blood Sampling

Heparinized blood (7 mL) was obtained by venipuncture and prepared within 4 h for further analysis. For neuropeptide ELISA, 500 μ L of whole blood was diluted with 500 μ L of RPMI-1640 medium without supplements and centrifuged at 800 *g* for 5 min at 4 °C. Collected cell-free supernatants were stored at -80 °C until analysis. For cytokine measurement, blood samples (1 mL heparinized blood) were diluted 1 : 1 with RPMI-1640 medium without supplements and incubated for 4 h at 37 °C to equilibrate. After centrifugation, the supernatant was collected and stored at -80 °C until analysis. Blood samples for RNA extraction (1 mL heparinized blood) were prepared without stimulation according to a standardized protocol until further handling [8].

RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction was performed with an automated standardized protocol for human whole blood using the MagNA

1410 G. Herberth et al.

Pure LC system and the MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Blood samples (1 mL) were diluted 1 : 1 with cell culture medium (RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 0.01% Penicillin, 0.0085% Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.35% β -mercaptoethanol) and left to equilibrate for 3 h at 37 °C and 5% CO₂. Lysis of erythrocytes was performed twice with hypotonic buffer (0.83% NH₄Cl, 0.1% KHCO₃, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 7.2). Pelleted cells were lysed with the guanidinium thiocyanate lysis buffer from the isolation kit containing additional 1% dithiothreitol and stored at -80 °C.

cDNA was synthesized using the First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science).

Real-time polymerase chain reaction

Reverse transcriptase products were amplified by real-time PCR with a LightCycler Fast Start DNA SYBR Green kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science). Primers and standards for GATA3, Thet, FOXP3, SOCS1, SOCS3 and β -actin and the amplification protocol were obtained from Search-LC (Heidelberg, Germany). Primers for IL-4 were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). The primer sequences for IL-4 were sense 5'-AGA AGA CTC TGT CAC CGA TTGA-3' and antisense 5'-CTC TCA TGA TCG TCT TTA GCC TTT-3'. IL-4 standard was synthesized by GenExpress (Berlin, Germany). The amplification protocol used for IL-4 primers was: 5 °C, 1 s; 68 °C, 10 s; 72 °C, 16 s, with a lowered annealing temperature of 0.5 °C per cycle until reaching the final annealing temperature of 58 °C at cycle 17. Quantification of transcript concentration for the measured genes was calculated by external standardization. Data are presented as the ratio between the copy number of target gene and copy number of the housekeeping gene β -actin.

Neuropeptide ELISA

The ELISA kits for VIP, SOM, and SP were purchased from Phoenix Europe (Karlsruhe, Germany) and are based on the principle of competitive enzyme immunoassay. All measurements were performed in duplicate. The concentration of neuropeptides has been determined with the EasyWin kinetics 32 (TECAN, Crailsheim, Germany) software by extrapolation to the standard curve. To correct interassay variation, a control sample has been included on each plate. Neuropeptide concentrations were normalized by multiplication with the calculated factor for the control sample.

The detection limit for each neuropeptide was 7 pg/mL.

Cytometric bead array

Concentrations of the cytokines IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-9 were measured by flow cytometry using the BD CBA

Human Soluble Flex Set system (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions.

In brief, cytokine-specific antibody-coated beads were incubated for 1 h with 25 μ L of blood samples or standard solution. Thereafter, samples were incubated with the corresponding PE-labelled detection antibodies for 2 h. After one washing step, samples were measured by flow cytometry. Analysis of data and quantification of cytokines were performed using FACSArray™ software (Becton Dickinson) on the basis of corresponding standard curves. Finally, the plasma dilution factor was determined.

The detection limits were 4 pg/mL for IFN- γ and IL-9 and 3 pg/mL for IL-5 and IL-4, respectively.

Specific IgE

Specific IgE was determined by the Pharmacia CAP System (Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany). To establish atopic status, sera were screened for specific IgE against inhalant (SX1) and food allergens (Fx5) by two multiallergen panels. SX1 (CAP FEIA) includes house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*), cat, dog, timothy, rye, birch, mugwort and *Cladosporium herbarum*; Fx5 CAP FEIA contains the food allergens hen's egg, cow's milk, fish, wheat, peanut and soy. Samples with specific IgE concentrations >0.35 kU/L were regarded as positive. Sera with positive results in the multiallergen panels were tested for the single allergens.

Statistical analysis

Owing to the fact that the functional relationship between neuropeptide levels, T cell regulatory factors and allergic sensitization is not yet clear, neuropeptide concentrations were categorized by using quartiles (Q1, Q2, Q3, Q4) as cut-off values and included in the models with the lowest quartile as the reference. Data for T cell regulatory factors are presented as median with 25th–75th percentiles. Cytokine and neuropeptide concentrations below the limit of detection were assigned a value of one half of the detection limit and were taken into account for calculation. Trend tests were applied to detect dose-response relations. The Jonckheere-Terpstra test was used for trend calculation for the association between neuropeptides and T cell regulatory factors. Multiple logistic regression models were used to determine adjusted OR with 95% CI for the association between neuropeptide concentrations and allergic sensitization. OR were adjusted for family atopy history (FAH), gender, social economic status, pet keeping, smoking during pregnancy, breastfeeding and season of birth. The Cochran-Armitage test was used for trend calculation for the association between neuropeptides and allergic sensitization. Correlation between T cell regulatory factors (cytokines and transcription factors)

© 2006 The Authors

Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd, *Clinical and Experimental Allergy*, 36: 1408–1416

and specific IgE was analysed using the non-parametric Mann-Whitney Rank sum test. A Bonferroni correction, for multiple testing has been performed for all results. After this correction the significant *P*-value for the association of neuropeptides and T cell regulatory factors changed from 0.05 to *P* < 0.005 and from 0.05 to *P* < 0.004 for neuropeptides and allergic sensitization. Statistical analysis was performed with STATISTICA for Windows Version 7.1 (Statsoft Inc.) and StatXact version 6.2 (Cytel Inc., Cambridge, MA, USA).

Results

Characteristics of study subjects

From the initial 565 six-year-old participants from Leipzig, 324 blood samples were obtained. In cases where no sufficient amount of blood was available, serum for IgE measurements was collected with the highest priority, followed by heparinized blood for neuropeptide analysis, cytometric bead array and mRNA preparation. Therefore, reduced case numbers resulted for some parameters. Complete data for IgE, neuropeptides and cytokines were available from 321 children [154 girls (47.9%) and 167 boys (52.0%)]. The subsample of children with mRNA measurements was smaller (*n* = 277) because the amount of blood available was not sufficient or parents did not give consent for genetic (DNA/RNA) analysis.

The plasma concentration of neuropeptides ranged from 3.5 to 233.6 pg/mL for SOM, from 3.5 to 561.2 pg/mL for VIP and from 3.5 to 1274.2 pg/mL for SP. Measured cytokine concentrations varied between 2 and 152.4 pg/mL IFN- γ , 1.5 and 38.2 pg/mL IL-4, 1.5 and 4.3 pg/mL IL-5 and 2 and 102.2 pg/mL IL-9.

Neuropeptides and T cell regulation

In Tables 1–3, the relations between SOM, VIP and SP and T cell regulatory factors are shown. Trend tests were

applied to detect dose-response relations. A positive association was found between high SOM values and GATA3, IL-4 (protein) and SOCS1 expression (*P* for trend: 0.0008, 0.001 and 0.003, respectively, Table 1). In contrast, IFN- γ correlated negatively with SOM (*P* for trend: 0.001, Table 1). After Bonferroni correction, only a tendency for a negative correlation between FOXP3 and SOM has been observed (*P* for trend: 0.007, Table 1). No correlation has been found between SOM and transcription factor Tbet and the cytokine IL-9 (Table 1). VIP was negatively correlated with SOCS3 mRNA expression (*P* for trend: 0.003, Table 2) and showed a tendency for a negative correlation to the Th1 transcription factor Tbet. Although not significant, IL-4 and GATA mRNA expression increased with higher VIP concentrations, whereas FOXP3 tended towards a reversed relationship (Table 2). SP revealed a positive relationship with IFN- γ concentration (*P* for trend: 0.0005) and a negative relationship with the Th2 transcription factor GATA3 and SOCS3 expression (*P* for trend: 0.0009 and 0.001, respectively, Table 3).

Neuropeptides and allergic sensitization

Among the 321 investigated children, 92 (28.7%) reacted against inhalant (SX1) and 41 (12.8%) against food (FX5) allergens. The results of the multiple regression analysis for the association between neuropeptides and allergic sensitization are presented in Tables 4 (SOM) and 5 (VIP). Owing to low numbers of positive cases, associations between neuropeptide levels and sensitization to the single food allergens fish (1.5%), wheat (3.1%) and soy (2.8%) and the inhalative allergen *Cladosporium herbarum* (1.9%), could not be calculated. Thus, these allergens are not included in the presentation of the results.

SP concentrations were not associated with any allergic sensitization (data not shown). In contrast, there was a positive relationship between SOM and VIP levels and

Table 1. Associations between SOM concentrations and T cell regulatory factors

	1st quartile (3.50–21.50 pg/mL)	2nd quartile (21.50–30.30 pg/mL)	3rd quartile (30.30–42.80 pg/mL)	4th quartile (42.80–233.60 pg/mL)	<i>P</i> *
IL-4 mRNA	5.99 (2.52–18.47)	9.97 (5.18–34.97)	8.36 (4.79–18.76)	8.54 (4.55–20.85)	0.06
IL-4 protein	1.50 (1.50–7.40)	6.30 (1.50–9.20)	6.64 (1.50–11.8)	6.30 (1.50–9.40)	0.001
IL-5 protein	1.50 (1.50–2.08)	1.50 (1.50–2.36)	2.08 (1.50–2.50)	2.00 (1.50–2.34)	0.02
IL-9 protein	6.74 (2.00–14.28)	11.22 (2.00–17.2)	9.60 (2.00–20.14)	8.74 (2.00–15.76)	0.100
IFN- γ protein	8.58 (2.00–15.18)	9.38 (2.00–13.66)	6.72 (2.00–14.41)	2.00 (2.00–12.86)	0.001
GATA3 mRNA	4.12 (2.36–9.98)	5.10 (3.33–9.90)	6.07 (3.83–10.58)	7.12 (4.07–16.44)	0.0008
Tbet mRNA	0.21 (0.06–0.46)	0.17 (0.04–0.38)	0.20 (0.10–0.35)	0.16 (0.08–0.29)	0.220
FOXP3 mRNA	0.51 (0.24–1.11)	0.58 (0.32–1.13)	0.52 (0.29–0.85)	0.37 (0.13–0.67)	0.007
SOCS1 mRNA	4.00 (2.13–13.37)	5.31 (2.72–17.75)	5.62 (3.49–8.97)	6.00 (3.90–17.28)	0.003
SOCS3 mRNA	2.77 (1.81–4.78)	3.37 (2.15–5.67)	3.94 (3.04–6.13)	2.97 (0.81–4.06)	0.224

Medians for SOM quartiles (25th – 75th percentile) and *P* for trend (*P**) are shown. Significant *P*-values after Bonferroni's correction are highlighted. SOM, somatostatin.

1412 G. Herberth *et al*

Table 2. Associations between VIP concentrations and T cell regulatory factors

	1st quartile (3.50–141.20 pg/mL)	2nd quartile (141.20–196.7 pg/mL)	3rd quartile (197.7–249.2 pg/mL)	4th quartile (249.2–561.2 pg/mL)	<i>P</i> *
IL-4 mRNA	8.33 (3.19–21.54)	7.30 (3.91–15.25)	9.40 (4.11–23.4)	9.57 (5.63–27.13)	0.06
IL-4 protein	5.94 (1.50–10.08)	4.80 (1.50–9.56)	5.85 (1.50–8.45)	5.76 (1.50–9.40)	0.374
IL-5 protein	1.50 (1.50–2.36)	1.50 (1.50–2.34)	1.12 (1.50–2.36)	1.50 (1.50–2.34)	0.463
IL-9 protein	9.60 (2.00–17.22)	9.90 (2.00–15.76)	9.17 (2.00–17.22)	7.80 (2.00–15.76)	0.493
IFN- γ protein	9.55 (2.00–15.68)	5.68 (2.00–10.77)	7.31 (2.00–13.07)	8.54 (2.00–13.88)	0.353
GATA3 mRNA	4.69 (3.36–9.58)	6.55 (3.09–13.32)	6.82 (3.70–12.42)	5.69 (3.30–12.05)	0.09
Thet mRNA	0.22 (0.10–0.44)	0.21 (0.12–0.34)	0.12 (0–0.29)	0.16 (0.07–0.30)	0.03
FOXP3 mRNA	0.53 (0.25–1.07)	0.52 (0.30–1.04)	0.47 (0.13–0.83)	0.43 (0.16–0.83)	0.06
SOCs1 mRNA	5.00 (3.38–14.85)	4.89 (3.28–9.50)	5.59 (3.31–13.37)	5.96 (2.97–18.92)	0.155
SOCs3 mRNA	4.09 (2.68–6.25)	3.26 (2.21–4.56)	2.68 (0.58–4.54)	3.17 (2.00–4.33)	0.003

Medians for VIP quartiles (25th – 75th percentile) and *P* for trend (*P**) are shown. Significant *P* values after Bonferroni's correction are highlighted. VIP, vasoactive intestinal peptide.

Table 3. Associations between SP concentrations and T cell regulatory factors

	1st quartile (3.50–128.4 pg/mL)	2nd quartile (128.4–193.0 pg/mL)	3rd quartile (193.0–254.7 pg/mL)	4th quartile (254.7–1274.0 pg/mL)	<i>P</i> *
IL-4 mRNA	8.56 (4.03–25.71)	7.90 (3.96–19.9)	7.79 (3.08–16.7)	8.62 (4.47–23.40)	0.353
IL-4 protein	5.94 (1.50–11.46)	5.00 (1.5–7.68)	6.30 (1.50–9.22)	5.80 (1.50–9.48)	0.492
IL-5 protein	2.16 (1.50–2.50)	1.50 (1.50–2.16)	1.50 (1.50–2.34)	1.50 (1.50–2.14)	0.097
IL-9 protein	9.60 (2.00–20.14)	6.82 (2.00–14.28)	9.60 (2.00–15.76)	9.60 (2.00–16.49)	0.331
IFN- γ protein	5.68 (2.00–11.6)	7.32 (2.00–11.66)	7.36 (2.00–14.79)	10.36 (1.00–16.2)	0.0005
GATA3 mRNA	6.71 (4.27–14.42)	7.57 (3.36–13.06)	4.12 (2.93–10.86)	4.64 (3.13–8.78)	0.0009
Thet mRNA	0.18 (0.11–0.40)	0.16 (0.05–0.40)	0.19 (0.02–0.35)	0.21 (0.08–0.33)	0.220
FOXP3 mRNA	0.51 (0.33–1.07)	0.56 (0.24–0.87)	0.39 (0.21–0.85)	0.48 (0.29–0.98)	0.176
SOCs1 mRNA	5.55 (3.34–10.83)	5.60 (3.85–12.34)	5.07 (2.87–13.81)	5.17 (3.06–14.15)	0.238
SOCs3 mRNA	4.00 (2.69–6.14)	3.24 (0.99–5.38)	3.08 (1.52–5.62)	2.77 (1.88–4.08)	0.001

Medians for SP quartiles (25th – 75th Percentile) and *P* for trend (*P**) are shown. Significant *P*-values after Bonferroni's correction are highlighted. SP, substance P.

sensitizations against the tested allergens. Multiple logistic regression models confirmed that atopic sensitization to the food allergen mix Fx5 (OR_{Q3} 4.71, 95% CI 1.39–15.91 and OR_{Q4} 4.93, 95% CI 1.57–15.47; *P* for trend = 0.001) and the single food allergen cow's milk (OR_{Q3} 11.0, 95% CI 1.25–97.44 and OR_{Q4} 8.81, 95% CI 1.01–76.72; *P* for trend = 0.002) was influenced by SOM concentration, Table 4. Also, for peanut, a higher allergy risk (OR_{Q4} 16.0, 95% CI 1.67–154.5) was observed, but after Bonferroni correction, the calculated trend failed to be significant (*P* for trend = 0.008). Although a significant association for SOM and the inhalative allergen mix was not found, single inhalative allergens correlated with SOM concentrations. The risk for allergic sensitization against timothy-grass-pollen and rye increased in the third and fourth quartile of SOM concentration (timothy: OR_{Q3} 4.58, 95% CI 1.47–14.28 and OR_{Q4} 4.13, 95% CI 1.33–12.85; rye: OR_{Q3} 3.34, 95% CI 1.01–11.09 and OR_{Q4} 4.17, 95% CI 1.35–12.87). Similar to SOM, estimated risks of sensitization to the food allergen mix Fx5 (OR_{Q4} 3.5, 95% CI

1.25–9.82; *P* for trend = 0.004) were influenced by VIP concentration, Table 5. For cow's milk, an increased allergy risk was observed in children with the highest VIP values compared with children with the lowest values (OR_{Q4} 4.0, 95% CI 1.02–15.67). In addition, we found a positive relationship between high VIP concentrations and rye-pollen sensitization (OR_{Q4} 3.22, 95% CI 1.12–9.29). Adjusted ORs differ in all cases only slightly from the calculated crude ORs, indicating that the observed effects were not confounded by FAH, gender, social economic status, cat allergens, smoking during pregnancy, breastfeeding and season of birth.

T cell regulatory factors and allergic sensitization

As expected, T cell regulatory factors supporting a Th2-driven immune response were positively correlated with specific IgE levels. GATA3 mRNA expression correlated with sensitization to the inhalative allergen Derp1 (*P* = 0.03). The expression of IL-4 also correlated positively

Table 4. Frequency [% (n)] and risk (adjusted* OR with 95% CI) of allergic sensitization (specific IgE) according to SOM concentrations

	SOM				P for trend
	1st quartile (3.5–21.5 pg/mL)	2nd quartile (21.5–30.3 pg/mL)	3rd quartile (30.3–42.8 pg/mL)	4th quartile (42.8–233.6 pg/mL)	
Food allergens	6.25% (5) 1.00	7.40% (6) 1.45 (0.39–5.41)	16.45% (13) 4.71 (1.39–15.91)	20.98% (17) 4.93 (1.57–15.47)	0.001
Hen's egg	2.50% (2) 1.00	1.23% (1) 0.57 (0.04–8.08)	6.23% (5) 4.28 (0.67–27.40)	4.39% (4) 2.74 (0.43–17.34)	0.191
Cow's milk	1.25% (1) 1.00	2.46% (2) 2.39 (0.18–30.78)	10.12% (8) 11.0 (1.25–97.44)	11.11% (9) 8.81 (1.01–76.72)	0.002
Peanut	1.25% (1) 1.00	1.23% (1) 1.54 (0.07–34.21)	3.79% (3) 6.28 (0.54–72.01)	8.64% (7) 16 (1.67–154.5)	0.008
Inhalative allergens	22.5% (18) 1.00	25.9% (2) 1.30 (0.56–3.00)	35.4% (28) 2.48 (1.10–5.59)	30.9% (25) 1.99 (0.90–4.39)	0.127
Derp1	13.75% (11) 1.00	16.04% (13) 1.27 (0.47–3.44)	18.98% (15) 2.02 (0.77–5.29)	17.28% (14) 1.48 (0.58–3.75)	0.467
Cat	1.25% (1) 1.00	7.40% (6) 7.29 (0.79–66.62)	7.59% (6) 6.75 (0.67–67.56)	8.64% (7) 8.49 (0.93–77.24)	0.064
Dog	1.25% (1) 1.00	4.93% (4) 3.04 (0.29–31.50)	3.79% (3) 4.91 (0.41–58.35)	6.17% (5) 5.53 (0.59–51.29)	0.166
Timothy	6.25% (5) 1.00	11.11% (9) 1.73 (0.50–6.11)	21.51% (17) 4.58 (1.47–14.28)	18.51% (15) 4.13 (1.33–12.85)	0.007
Rye	6.25% (5) 1.00	9.87% (8) 1.68 (0.47–6.03)	13.92% (11) 3.34 (1.01–11.09)	18.51% (15) 4.17 (1.35–12.87)	0.012
Birch	5.00% (4) 1.00	11.11% (9) 2.59 (0.71–9.46)	15.18% (12) 3.85 (1.07–13.82)	12.34% (10) 3.25 (0.90–11.69)	0.095
Mugwort	6.25% (5) 1.00	3.70% (3) 0.58 (0.12–2.73)	5.06% (4) 1.04 (0.24–4.40)	11.11% (9) 2.52 (0.75–8.49)	0.192

Significant *P*-values after Bonferroni's correction are highlighted.

*Adjusted for family atopy history, gender, social economic status, pet keeping, smoking during pregnancy, breastfeeding and season of birth.

SOM, somatostatin; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

with sensitization to Derp1 as well as with sensitization to cow's milk allergen ($P=0.02$ and 0.04 , respectively). Furthermore, children with sensitizations to food or inhalative allergens had higher SOCS1 mRNA levels ($P=0.03$ for food allergen mix and $P=0.03$ for inhalative allergen mix). In contrast, lower IFN- γ levels were observed in children sensitized to food allergen mix ($P=0.01$) and lower Tbet mRNA levels in children sensitized to inhalative allergen mix ($P=0.03$).

Discussion

The present study provides the first epidemiologic survey demonstrating an association of neuropeptides SOM, VIP and SP with immune system regulation and allergic sensitization in children. We were able to show that individuals with high levels of SOM revealed a higher expression of the Th2 transcription factor GATA3. The influence of GATA3 for Th2 differentiation and allergic sensitization is well documented in a number of *in vitro* and *in vivo* studies [9]. It was shown that up-regulation of GATA3 expression in T cells is a hallmark of the early phase of Th2 recall responses to specific antigens in

atopic individuals [10]. This process is accompanied by release of type 2 cytokines like IL-4 and IL-5 in allergen-specific immune responses in atopics. Thus, factors like SOM, which may up-regulate GATA3 expression, might alter the Th1/Th2 balance and lead to allergic sensitization in healthy individuals as well. Indeed, in our study, subjects with high levels of GATA3 were characterized by high IL-4 production (Spearman's correlation: $P<0.001$, data not shown) and sensitization against inhalant allergens. Moreover, a direct correlation between increased SOM and IL-4 and a tendency towards increased IL-5 levels was observed. These data confirm results from earlier *in vitro* studies referring to the induction of a Th2-like pattern (IL-4, IL-10) of cytokine secretion by SOM [11]. Furthermore, we detected a reduced IFN- γ production in children with high SOM levels and with sensitization to food allergens. Reduced IFN- γ is discussed as a further risk factor for the development of IgE-mediated disorders in childhood [12, 13]. Th1-suppressive capacity of SOM has also been demonstrated in mouse studies where the authors could show that SOM acts directly on T cells to inhibit T cell receptor (TCR)-stimulated IFN- γ release [14].

Table 5. Frequency [% (n)] and risk (adjusted* OR with 95% CI) of allergic sensitization (specific IgE) according to VIP concentrations

	VIP				P for trend
	1st quartile (3.5–141.2 pg/mL)	2nd quartile (141.2–196.7 pg/mL)	3rd quartile (197.7–249.2 pg/mL)	4th quartile (249.2–561.2 pg/mL)	
Food allergens	7.40% (6)	8.86% (7)	12.5% (10)	22.22% (18)	0.0038
	1.00	1.34 (0.40–4.48)	1.48 (0.48–4.55)	3.50 (1.25–9.82)	
Hen's egg	3.70% (3)	2.53% (2)	1.25% (1)	7.40% (6)	0.297
	1.00	0.62 (0.09–4.30)	0.15 (0.01–2.03)	2.17 (0.46–10.25)	
Cow's milk	3.70% (3)	3.79% (3)	3.75% (3)	13.58% (11)	0.014
	1.00	1.19 (0.21–6.60)	0.88 (0.16–4.90)	4.00 (1.02–15.67)	
Peanut	1.23% (1)	3.79% (3)	6.25% (5)	3.70% (3)	0.297
	1.00	3.11 (0.29–32.74)	4.67 (0.48–45.11)	2.94 (0.28–31.01)	
Inhalative allergens	30.86% (25)	20.25% (16)	30.00% (24)	33.33% (27)	0.451
	1.00	0.61 (0.27–1.35)	0.91 (0.42–1.97)	1.07 (0.52–2.21)	
Derp1	18.51% (15)	13.92% (11)	16.25% (13)	17.28% (14)	0.937
	1.00	0.81 (0.32–2.05)	0.81 (0.33–1.98)	0.84 (0.36–1.96)	
Cat	8.64% (7)	2.53% (2)	5.00% (4)	8.64% (7)	0.842
	1.00	0.37 (0.06–2.01)	0.75 (0.19–2.94)	1.09 (0.33–3.53)	
Dog	4.93% (4)	2.53% (2)	3.75% (3)	4.93% (4)	0.903
	1.00	0.65 (0.10–4.15)	1.16 (0.21–6.16)	0.92 (0.20–4.03)	
Timothy	12.34% (10)	8.86% (7)	13.75% (11)	22.22% (18)	0.048
	1.00	0.82 (0.28–2.42)	1.41 (0.52–3.83)	2.32 (0.92–5.85)	
Rye	7.40% (6)	7.59% (6)	13.75% (11)	19.75% (16)	0.008
	1.00	1.12 (0.33–3.81)	2.23 (0.73–6.85)	3.22 (1.12–9.29)	
Birch	7.40% (6)	8.86% (7)	13.75% (11)	13.58% (11)	0.132
	1.00	1.14 (0.35–3.73)	1.62 (0.53–4.95)	1.95 (0.63–5.98)	
Mugwort	6.17% (5)	7.59% (6)	3.75% (3)	8.64% (7)	0.768
	1.00	1.38 (0.38–4.96)	0.57 (0.12–2.72)	1.44 (0.41–5.05)	

Significant *P*-values after Bonferroni's correction are highlighted.

*Adjusted for family atopy history, gender, social economic status, pet keeping, smoking during pregnancy, breastfeeding and season of birth.

VIP, vasoactive intestinal peptide; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Several recent studies indicate that besides Th2 cells, one other group of effector cells, the regulatory T cells, plays a pivotal role in the development of allergic diseases [15, 16]. In human studies, a suppressive function of regulatory T cells to allergen-driven T cell activation and development of allergic disease is also evident [17, 18]. Here, we assessed the transcription factor FOXP3 as a marker for regulatory T cells. Our data indicate that for children with high SOM levels, there is a tendency for reduced expression of FOXP3. Although this association is not significant after Bonferroni correction of data ($P = 0.007$), one can speculate that even a weak relationship may lead to a diminished control of Th2 cell activity and, among the other factors, would contribute to the observed allergic sensitization in association with elevated SOM levels.

Among regulatory molecules, which can influence an immune response, the SOCS family are key physiological regulators of the immune response [19–21]. By targeting signalling intermediates for degradation, these molecules attenuate cytokine signal transduction in a classic feedback loop [22]. Thus, signal down-regulation through SOCS members may have an important role in the balance

of cytokines that determine the onset of Th1- and Th2-mediated immune responses, and their altered expression may cause immune system-related diseases. Our data show that increased amounts of SOCS1 mRNA occur in individuals with elevated SOM levels, indicating that expression of this factor can be influenced by SOM. Furthermore, we found that high expression of SOCS1 correlates with high values of IL-4 and GATA3 expression mRNA (Spearman's correlation: $P < 0.001$, data not shown). In mouse models, it has been confirmed that SOCS1 is a crucial inhibitor of IFN- γ *in vivo* [23]. However, we could not find any association of SOCS1 with IFN- γ expression. On the other hand, there is evidence from TCR-transgenic T cell experiments that SOCS1 is mainly expressed in Th1 cells [24] and therefore negatively regulates Th1 differentiation, inducing a Th2 response [25].

In the current study, we also observed that the frequency of food allergen sensitization increases in children with higher SOM concentrations (P for trend = 0.001) and in children with the highest SOM concentrations an increased allergy risk for single inhalative allergens (timothy, rye) was observed (Table 4). Thus, taken together,

our data demonstrate that SOM is associated with the development of a Th2-driven T cell response. As IgE-mediated allergic reactions are based on a Th2-driven T cell response, SOM may also therefore be involved in allergy development. In fact, in our study we were able to demonstrate an association between SOM and allergy risk in healthy individuals.

Similar to SOM, the neuropeptide VIP also revealed a positive relationship for allergic sensitization with food allergens (P for trend = 0.004) and in addition children with high VIP concentrations (fourth quartile) had an increased allergy risk for the single inhalative allergen rye (Table 5). Interestingly, VIP was negatively associated with the suppressor of cytokine signalling member SOCS3. This molecule is selectively expressed in Th2 cells and has the ability to inhibit IL-12-mediated STAT4 activation, thereby blocking Th1 development [24] and is involved in the maintenance of Th2-mediated allergic response [26]. On the other hand, our results point to direction that VIP is associated with low expression of the Th1 transcription factor Tbet and has a tendency to increase IL-4 and GATA3 mRNA expression, which might lead to the allergic risk. Low expressions of Tbet at mRNA level correlated with low levels of IFN- γ in supernatants from unstimulated blood cells and with sensitization to inhalative allergens. One might speculate that inhibition of Tbet by VIP might overcome the 'beneficial' inhibition of SOCS3, leading to an allergic sensitization. Recent findings could show that VIP-generated dendritic cells induce functional regulatory T cells *in vitro* and *in vivo* [27]. These regulatory T cells (CD4 as well as CD8 positive) suppress primarily antigen-specific Th1-mediated responses [28]. Thus, in accordance with our data, the Th1-suppressive capacity of VIP, although it can be beneficial for the treatment of some autoimmune diseases, might be responsible for Th2 bias and in this way may also contribute to the allergic risk.

Somehow the results regarding the effect of VIP and SOM on IgE production *in vitro* are contradictory. Early studies from Kimata et al. [29, 30] showed that spontaneous IgE release from B cells is inhibited by VIP and SOM and not by SP, but only in the presence of T cells and monocytes. However, recent publications from the same group demonstrated that stress enhances allergen-specific IgE, with a concomitant increase of plasma levels of VIP and SP in patients with atopic dermatitis [31, 32]. It has also been reported by others that serum levels of VIP are elevated in patients with atopic dermatitis and may contribute to the pathology of this disease [33, 31]. These findings indicate that the results from *in vitro* studies may not reflect the *in vivo* situation for IgE production.

While SOM and VIP were associated with allergic sensitization, in our study SP had no effect on allergic responses. This might result from secondary effects. We showed that down-regulation of Th2 transcription factor

GATA3 is predominant in individuals with high SP levels. Furthermore, our data show that these individuals are characterized by high IFN- γ levels and by a reduction of SOCS3 expression. These findings support the idea that elevated IFN- γ secretion, as well as the reduced SOCS3 expression, has a protective effect against Th2 development, thereby diminishing the allergy risk. The fact that other studies were able to show that SP evoke pro-inflammatory responses, especially IFN- γ production, and may participate in development of inflammatory diseases, is in accordance with our data [34–36]. But, it is also noteworthy that SP can induce mast cell degranulation and thereby contributes to allergic inflammation [37, 38].

In summary, our data reveal an association between neuropeptides, modulation of Th1/Th2 balance and, for SOM and VIP, also a relation to allergic sensitization in children. As mentioned, some reports could show that neuropeptides are released after stress signals [31, 32]. Thus, future research on the influence of stress regarding the risk of allergic sensitization has to focus on factors influencing the level of neuropeptide expression.

Acknowledgements

We thank all of the families for their participation in this study. This study was supported by a grant of the Federal Ministry of Environment (FKZ 20462296).

References

- 1 Pozo D, Delgado M, Martinez M *et al.* Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunol Today* 2000; 21:7–11.
- 2 Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004; 56:249–90.
- 3 Pozo D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 2004; 18:1325–34.
- 4 Krantic S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. *Peptides* 2000; 21:1941–64.
- 5 Scicchitano R, Biennenstock J, Stanis AM. *In vivo* immunomodulation by the neuropeptide substance P. *Immunology* 1988; 63:733–5.
- 6 O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201:167–80.
- 7 Borte M, Schulz R, Lehmann I *et al.* Influence of lifestyle and behaviour on the development of the immune system and allergic diseases. The ISA birth cohort study. *Public Health Research and Practice* 2001; 3:60–77.
- 8 Giese T, Zeier M, Schemmer P *et al.* Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. *Transplantation* 2004; 77:339–44.
- 9 Macaubas C, Holt PG. Regulation of cytokine production in T-cell responses to inhalant allergen: GATA-3 expression distinguishes between Th1- and Th2-polarized immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124:176–9.

- 10 Macaubas C, Lee PT, Smallacombe TB *et al.* Reciprocal patterns of allergen-induced GATA-3 expression in peripheral blood mononuclear cells from atopics vs. non-atopics. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:97–106.
- 11 Levite M. Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:12544–9.
- 12 Scott-Taylor TH, Hourihane JB, Harper J *et al.* Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1473–80.
- 13 Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:796–802.
- 14 Elliott DE, Li J, Blum AM *et al.* SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur J Immunol* 1999; 29:2454–63.
- 15 Akbari O, Stock P, DeKruyff RH *et al.* Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:627–33.
- 16 Umetsu DT, Akbari O, DeKruyff RH. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:480–7.
- 17 Ling EM, Smith T, Nguyen XD *et al.* Relation of CD4+ CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608–15.
- 18 Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J *et al.* Human CD4+ CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:862–8.
- 19 Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 2003; 4:1169–76.
- 20 Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:503–29.
- 21 Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28:205–20.
- 22 Elliott J, Johnston JA. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol* 2004; 25:434–40.
- 23 Alexander WS, Starr R, Fenner JE *et al.* SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 1999; 98:597–608.
- 24 Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M *et al.* Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 2002; 168:3181–7.
- 25 Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A *et al.* Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 2000; 13:805–15.
- 26 Seki Y, Inoue H, Nagata N *et al.* SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses. *Nat Med* 2003; 9:1047–54.
- 27 Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175:7311–24.
- 28 Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A *et al.* Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 2006; 107:3632–8.
- 29 Kimata H, Yoshida A, Fujimoto M *et al.* Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J Immunol* 1993; 150:4630–40.
- 30 Kimata H. Vasoactive intestinal peptide differentially modulates human immunoglobulin production. *Adv Neuroimmunol* 1996; 6:107–15.
- 31 Kimata H. Enhancement of allergic skin wheal responses and *in vitro* allergen-specific IgE production by computer-induced stress in patients with atopic dermatitis. *Brain Behav Immun* 2003; 17:134–8.
- 32 Kimata H. Enhancement of allergic skin wheal responses in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome by playing video games or by a frequently ringing mobile phone. *Eur J Clin Invest* 2003; 33:513–7.
- 33 Umemoto N, Kakurai M, Okazaki H *et al.* Serum levels of vasoactive intestinal peptide are elevated in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2003; 31:161–4.
- 34 Joachim RA, Quarcoo D, Arck PC *et al.* Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. *Psychosom Med* 2003; 65:811–5.
- 35 Joos GF, De Swert KO, Pauwels RA. Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2001; 429:239–50.
- 36 Blum AM, Metwali A, Elliott DE *et al.* T cell substance P receptor governs antigen-elicited IFN-gamma production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284:G197–204.
- 37 Lau AH, Chow SS, Ng YS. Immunologically induced histamine release from rat peritoneal mast cells is enhanced by low levels of substance P. *Eur J Pharmacol* 2001; 414:295–303.
- 38 Guhl S, Lee HH, Babina M *et al.* Evidence for a restricted rather than generalized stimulatory response of skin-derived human mast cells to substance P. *J Neuroimmunol* 2005; 163:92–101.

4. Diskussion

Wie schon ausgeführt erfolgten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Bedeutung immunregulatorischer Faktoren für die Allergieentstehung im Kindesalter. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Korrelation von T-Zell-Regulationsfaktoren und Transkriptionsfaktoren untereinander, sowie deren Zusammenhang zur Th1/Th2-Differenzierung und allergischen Sensibilisierung. Da in der Literatur unter anderem auch, die Bedeutung von Stress als Auslöser pathologischer Immunantworten und Risikofaktor bei der Ausbildung von Allergien diskutiert wird (Crozier et al., 1988, Kimata, 2003a, Kimata, 2003b), erfolgten darüber hinaus auch Untersuchungen zum Zusammenhang von T-Zell-Regulationsfaktoren und Neuropeptiden (Stressproteine) sowie allergischer Sensibilisierung.

4.1 Zusammenhang zwischen SOCS-Molekülen, Th1/Th2/Treg-Differenzierung und allergischer Sensibilisierung

Wie aus mehreren Arbeiten hervorgeht, fällt der SOCS-Familie eine Schlüsselrolle, unter den regulatorischen Molekülen, welche die Immunantwort beeinflussen können, zu (Alexander and Hilton, 2004, Kubo et al., 2003, Yoshimura, 2005). Indem Signalvermittler abgebaut werden, schwächen diese Moleküle die Zytokinsignaltransduktion in einem klassischen Rückkopplungsmechanismus (Elliott and Johnston, 2004). Diese Hemmung der Signaltransduktion durch SOCS-Mitglieder hat Auswirkungen auf das Zytokingleichgewicht, welches die Differenzierung von Th-Subpopulationen reguliert.

Erstmals wurde in dieser Arbeit die Expression von SOCS-Molekülen im Rahmen einer Populationsstudie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die Expression von SOCS1 mit allergischer Sensibilisierung korreliert. Dieses Ergebnis wurde unterstützt durch die positive Assoziation zwischen der SOCS1-Expression und den Th2-Differenzierungsmarkern GATA-3 und IL-4 und die negative Korrelation zwischen SOCS1 und dem Th1-Transkriptionsfaktor Tbet. Insgesamt deuten diese Beobachtungen daraufhin, dass eine erhöhte SOCS1-Expression mit der Entwicklung des Th2-Phänotyps sowie allergischen Sensibilisierungen einhergeht. Dagegen war die Expression von SOCS3, SOCS5 und CIS ohne Relevanz für die allergische Sensibilisierung. Diese drei SOCS-Moleküle korrelierten positiv mit Tbet und dem Transkriptionsfaktor für Treg-Zellen FOXP3, sowie (mit Ausnahme von CIS) negativ mit IL-4, dem Leitzytokin für Th2-Zellen. SOCS3, SOCS5

und CIS sind also offensichtlich weder mit einer Th2-Differenzierung noch mit einer erhöhten Neigung zu einer allergischen Reaktionsfähigkeit assoziiert.

Unabhängig voneinander generierten 2 Arbeitsgruppen SOCS1-Knockout-Mäuse, die den gleichen Phänotyp aufwiesen (Naka et al., 1998, Starr et al., 1998). Die Mäuse zeigten Wachstumsverzögerungen und starben mit 2-3 Wochen aufgrund von Verfettung und Nekrose der Leber. Zusätzlich verfügten die Mäuse über eine verminderte Anzahl von Lymphozyten im Thymus, in der Milz und im Knochenmark und eine Infiltration von Monozyten in die Bauchspeicheldrüse, das Herz und die Lungen. Die Nekrose der Leber von SOCS1^{-/-} Mäusen wurde zurückgeführt auf eine IFN- γ -Fehlregulation, da SOCS1^{-/-}/IFN- γ ^{-/-} Mäuse bis ins Erwachsenenalter gesund waren (Alexander et al., 1999, Marine et al., 1999b). Laut Literatur schien die frühkindliche Symptomatik der SOCS1^{-/-} Mäuse zum einen auf einem Anstieg der IFN- γ -Produktion von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen und zum anderen auf einer erhöhten Signalantwort von IFN- γ -sensitiven Zielgeweben zu beruhen (Alexander et al., 1999, Brysha et al., 2001, Marine et al., 1999b).

Eine Vielzahl vorangegangener Mausstudien (Alexander et al., 1999, Brysha et al., 2001, Diehl et al., 2000, Marine et al., 1999b) und eine *in vitro* Arbeit mit HeLa-Zellen (Song and Shuai, 1998) verweisen auf eine durch SOCS1 verursachte Hemmung der Th1-Antwort. Daraufhin wurde von Elliott und Johnston (2004) vermutet, dass die Hemmung der Th1-Antwort durch SOCS1 nicht nur zu einer beschleunigten Th2-Antwort führt, sondern sich auch auf eine Erhöhung des Risikos an Th2-vermittelten Erkrankungen zu leiden auswirken könnte. Unsere Daten aus dem Humansystem unterstützen diese aus Mausmodellen abgeleitete Hypothese, für die es bisher keine belegbaren Hinweise gab. In Verbindung mit einer Zunahme der SOCS1-Expression wurden in unserer Studie nicht nur eine verringerte Anzahl IFN- γ produzierender Th1-Zellen, sondern auch höhere Sensibilisierungsraten vermerkt. Zusätzlich korrelierte eine erhöhte Expression von SOCS1 positiv mit der IL-4- und GATA-3-Expression. Obwohl alle bisherigen Arbeiten darauf hinweisen, dass SOCS1 in Th1-Zellen exprimiert wird, in diesen zu einer Hemmung der IFN- γ -Synthese führt und somit eine erhöhte SOCS1-Expression die Entwicklung des Th2-Phänotyps und folglich eine allergische Sensibilisierung unterstützt, kann man die Möglichkeit nicht ausschließen, dass die höheren SOCS1-Expressions-Level als Ergebnis einer Th2-polarisierten T-Zell-Aktivität auftraten. Das Studiendesign der LISApplus-Studie erlaubte es nicht, die Kausalität der Ereignisse zu überprüfen. Pro Kind stand nur eine Blutprobe zum 6. Geburtstag zur Verfügung. Die Abklärung der Kausalität der SOCS1-Expressionslevel zur Th2-Differenzierung hätten mehrere, zeitlich aufeinander folgende Blutuntersuchungen pro Kind erfordert, was im

Rahmen der LISApplus-Studie nicht möglich war. Zur Klärung wären somit noch weiterführende experimentelle Untersuchungen notwendig.

In einer experimentellen Studie, in der SOCS1 und SOCS3 *in vitro* in verschiedenen Zellen überexprimiert wurde, wurde eine Hemmung der IL-4- und IL-13-Produktion gefunden. Diese Hemmung korrelierte mit verringerten Mengen von aktiven STAT6 (Hebenstreit et al., 2005). Innerhalb dieser Experimente führte die Transfektion von SOCS1- und SOCS3-Expressionsvektoren in humane embryonale Nierenzellen (HEK293) zu einer Inhibition der IL-4/IL-13 induzierten Abgabe von Eotaxin/CCL26. Im Reporterassay wurden HEK293-Zellen eingesetzt und transient mit dem Eotaxin-3/CC126 Promotor transfiziert. So konnte gezeigt werden, dass nach der Kotransfektion von SOCS1- und SOCS3-Expressionsvektoren, die IL-4 und IL-13 induzierte Luziferaseaktivität stark reduziert war (Hebenstreit et al., 2005).

Diese Daten scheinen im Widerspruch mit der von uns beobachteten positiven Korrelation zwischen SOCS1 und allergischer Sensibilisierung zu stehen. Jedoch wurde klar gezeigt, dass der IL-4/STAT6-Signalweg in SOCS1-exprimierenden Th1-Zellen unterdrückt wird, aber nicht in Th2-Zellen, welche nur geringe Mengen von SOCS1 bilden (Dickensheets et al., 2007, Egwuagu et al., 2002). Folglich könnten hohe SOCS1-Expressionslevel zu einer Th1-Hemmung führen, würden aber nicht die Th2-vermittelte IL-4-Bildung hemmen.

In der Vergangenheit wurde berichtet, dass SOCS3 in Th1- und in Th2-Zellen exprimiert wird, wobei die Expression in Th2-Zellen 20-mal höher war, verglichen mit Th1-Zellen (Egwuagu et al., 2002). Viele Publikationen konnten zeigen, dass SOCS3 auch den IFN- γ Signalweg inhibiert, aber weniger stark als SOCS1 (Federici et al., 2002, Song and Shuai, 1998). Somit wurde postuliert, dass SOCS3 den Beginn und die Aufrechterhaltung Th2-vermittelter allergischer Erkrankungen reguliert (Seki et al., 2003). Li et al. (2006) fanden, dass SOCS3-transgene dendritische Zellen in Mäusen eine Th2-Zelldifferenzierung induzieren. Zusätzlich zeigten sie, dass das Fehlen von SOCS3 in dendritischen Zellen zu einer Induktion FOXP3-positiver Treg-Zellen führt. Die Beobachtungen unserer Studie scheinen kontrovers zu bisherigen Forschungsergebnissen zu sein. Obwohl in anderen Untersuchungen beständig gefunden wurde, dass die SOCS3-Expressionslevel höher in Allergiepatienten sind, sahen wir keine Korrelation zwischen der SOCS3-Expression und allergischer Sensibilisierung. Allerdings unterstützt, die in unserer Studie gefundene negative Korrelation zwischen IL-4 und SOCS3 und die positive Korrelation zwischen SOCS3 und Tbet sowie FOXP3 die fehlende Assoziation zwischen SOCS3 und den spezifischen IgE-Konzentrationen. Eine mögliche Erklärung dieser offensichtlich entgegen gesetzten Ergebnisse verglichen mit bisherigen Forschungsergebnissen könnte darauf basieren, dass

SOCS3 auch in unstimulierten peripheren Blutzellen exprimiert wird (Egwuagu et al., 2005). Der Anteil naiver, unstimulierter Zellen im Blut von Kindern ist viel größer, als die Menge ausgereifter Th2-Zellen. Somit könnte eine hohe SOCS3-Expression der unstimulierten peripheren Blutzellen die vielleicht höhere SOCS3-Expression der anteilig kleineren Th2-Zellpopulation überlagern.

Im Gegensatz zu SOCS3 wurde die SOCS5-Expression nur in Th1-Zellen identifiziert und war nicht nachweisbar in Th2-Zellen. Deshalb wurde SOCS5 als Th1-Phänotypmarker vorgeschlagen (Seki et al., 2002). In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Zytokininmilieu, welches die Th1-Differenzierung begünstigt eine SOCS5-Expression hervorruft und dies zu einer gleichzeitigen Hemmung der IL-4 induzierten STAT-6-Aktivierung führt (Kubo et al., 1997, Yu et al., 2003). Folglich wurde spekuliert, dass SOCS5 eine hemmende Funktion auf die Th2-Polarisierung ausübt. Experimentelle Untersuchungen, die zeigten, dass T-Zellen von transgenen Mäusen, die konstitutiv SOCS5 exprimierten, eine verringerte IL-4 vermittelte Th2-Differenzierung aufwiesen, unterstützen die Hypothese, dass SOCS5 ein spezifischer negativer Regulator des IL-4-Signalwegs ist und somit die Th2-Differenzierung kontrolliert (Seki et al., 2002). Passend dazu fanden wir bei der hier untersuchten Studienpopulation, dass SOCS5 negativ mit IL-4 und positiv mit Tbet korreliert war. Des Weiteren korrelierte SOCS5 in unserer Studie auch nicht mit allergischer Sensibilisierung. Bisher gab es keine Daten aus dem Humansystem, die die Relevanz von SOCS5 im Hinblick auf die Allergieentwicklung betreffen. Unsere Daten verweisen erstmals darauf, dass SOCS5 zumindest im Humansystem zu einer Hemmung der Th2- und Induktion der Th1-Aktivität führt.

Mehrere Forschungsarbeiten zeigten, dass der Regulationsfaktor CIS in Th1- und Th2-Zellen exprimiert wird (Starr et al., 1997, Yu et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete positive Korrelation der CIS-Expression mit GATA-3 sowie mit Tbet unterstützt somit bisherige Veröffentlichungen. Im Hinblick auf die FOXP3-Expression wurde ebenfalls eine positive Assoziation mit CIS festgestellt. Demzufolge könnte man spekulieren, dass CIS auch in Treg-Zellen exprimiert wird. In weiteren Untersuchungen mit Mausmodellen konnte ein Zusammenhang von CIS mit der Th-Differenzierung in Richtung Th2-Entwicklung beobachtet werden (Matsumoto et al., 1999, Yu et al., 2003). In unserer Studie fanden wir keine Korrelation zwischen CIS und allergischer Sensibilisierung. Unsere Ergebnisse aus dem humanen System können die vorangegangenen Betrachtungen aus Mausmodellen daher nicht bestätigen. Marine und Mitarbeiter (1999a) zeigten, dass die T-Zellentwicklung in CIS-Knockout-Mäusen ungestört ist. Die genaue physiologische Rolle von CIS bleibt somit unklar.

und bedarf weiterer Aufklärung. Darüber hinaus gab es auch noch keine Untersuchungen von CIS im Zusammenhang mit dem Allergierisiko.

Obwohl die Expression der SOCS-Moleküle auf molekularer Ebene gründlich untersucht wurde, gibt es immer noch offene Fragen, was die *in vivo* Bedeutung dieser Moleküle insbesondere im humanen System angeht. Es ist anzunehmen, dass das jeweils gegenwärtige Zytokinmilieu das Expressionsprofil der SOCS-Moleküle beeinflusst. Somit ist die *in vivo* Situation eine andere, verglichen mit den experimentellen *in vitro* Bedingungen, was sich in anderen SOCS-Expressionsprofilen widerspiegelt. Weitere Untersuchungen müssen daher dazu beitragen, die funktionelle Bedeutung der SOCS-Moleküle *in vivo* besser aufzuklären.

4.2 Zusammenhang zwischen den Transkriptionsfaktoren (GATA-3, Tbet, FOXP3), Th1/Th2-Differenzierung und allergischer Sensibilisierung

In einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Studien wurde der Einfluss von GATA-3 auf die Th2-Differenzierung und allergische Sensibilisierung gut dokumentiert (Macaubas and Holt, 2001). Es wurde gezeigt, dass eine Induktion der GATA-3-Expression in T-Zellen ein Kennzeichen der zeitigen Th2-Antwort gegenüber spezifischen Antigenen in atopischen Individuen ist (Macaubas et al., 2002). Dieser Prozess wird begleitet durch die Abgabe typischer Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-5 in allergenspezifischen Immunantworten bei Atopikern.

In der Tat korrelierte bei Kindern aus unserer Studie, die Expression des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 positiv mit der Expression von IL-4 (Spearman'sche $R = 0,30$). Darüber hinaus hatten die Kinder, die eine hohe Expression von GATA-3 aufwiesen, häufiger eine Sensibilisierung gegen die Hausstaubmilbe, im Vergleich zu Kindern mit einer niedrigeren GATA-3-Expression ($p=0,03$). Dieses Ergebnis wurde auch nach Adjustierung mit potentiellen Allergierisikofaktoren (Stillen, Geschlecht, sozialer Stand, atopische Familienanamnese, Geschwister, Haustiere, Rauchen) bestätigt. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren zeigten Kinder mit erhöhten GATA-3-Expressionen (>75 . Perzentile) im Vergleich zu Kindern mit niedrigen GATA-3-Expressionen (<25 . Perzentile) ein >4 -fach erhöhtes Risiko (adjustiertes OR 4,52, 95% KI 1,26-16,23) an einer Sensibilisierung gegen Hausstaubmilbe zu leiden. Die mRNA-Expression für das Th2-Zytokin IL-4 korrelierte in unserer Studie ebenfalls mit einer Sensibilisierung gegen Hausstaubmilbe (adjustiertes OR 4,63, 95% KI 1,46-14,73) und zusätzlich mit einer Sensibilisierung gegen Milcheiweiß (Herberth et al., 2006).

Erwartungsgemäß korrelierte die Expression des Th1-Transkriptionsfaktors Tbet negativ mit der Expression von IL-4 (Spearman'sche $R = -0,40$) und positiv mit der IFN- γ -Konzentration in unstimulierten Blutproben. Ferner wurden niedrigere Tbet-Expressionslevel bei Kindern mit Sensibilisierungen gegen Inhalationsallergene vermerkt (Herberth et al., 2006). Das bedeutet, dass Kinder mit verminderter Th1-Reaktivität ein höheres Risiko für allergische Sensibilisierungen zeigten. Liu und Kollegen (2004) untersuchten die Expression von Tbet in Blutproben von atopischen Asthmapatienten. Sie fanden ebenfalls eine Korrelation der Tbet-Expression auf mRNA-Level und IFN- γ in Zellüberständen und einen negativen Zusammenhang zwischen der Tbet- mRNA und dem IL-4-Protein. Darüber hinaus war die Tbet-mRNA-Expression niedriger in der Patientengruppe mit atopischen Asthma, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die in einer definierten Gruppe atopischer Patienten erhobenen Ergebnisse konnten von uns in einer Querschnittspopulation 6-jähriger Kinder bestätigt werden. Dies zeigt einerseits, dass die von uns eingesetzten Methoden geeignet sind, wesentliche Zusammenhänge korrekt wieder zu finden und andererseits, dass auch in einer Populationsstudie wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf zugrunde liegende molekulare Mechanismen gewonnen werden können. In einer weiteren *in vivo* Studie waren die Tbet-Level in T-Zellen aus den Atemwegen von Asthmapatienten ebenfalls erniedrigt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Asthma (Finotto et al., 2002). Eine verringerte Expression des Transkriptionsfaktors Tbet, der die IFN- γ -Expression stimuliert (Shier et al., 2000, Szabo et al., 2000), könnte somit als Risikofaktor bei der Entstehung von Allergien eine Rolle spielen. Neuere Studien deuteten an, dass neben den Th1- und Th2-Zellen eine weitere Gruppe von Effektorzellen, die Treg-Zellen, eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von allergischen Erkrankungen spielen (Akbari et al., 2003, Umetsu et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in der Bronchoalveolarflüssigkeit (BALF) von Kindern mit Asthma im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verringert war (Hartl et al., 2007). In weiteren Humanstudien wurde eine unterdrückende Funktion der Treg-Zellen auf die allergenvermittelte T-Zell-Aktivierung und der Entwicklung allergischer Erkrankungen beschrieben (Bellinghausen et al., 2003, Ling et al., 2004). Es werden deshalb Strategien diskutiert, wie die Aktivität der CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen erhöht werden könnte, um eine Verbesserung der Allergitherapie bzw. einen Schutz vor der Ausprägung allergischer Erkrankungen zu erreichen. Es konnte in zwei unabhängigen Humanstudien gezeigt werden, dass eine Glukokortikoid-Therapie zu einem Anstieg der FOXP3-mRNA-Expression führt und die Anzahl der CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zunimmt (Hartl et al., 2007, Karagiannidis et al., 2004). In einer anderen Studie wirkte sich die Bienengift-Immuntherapie positiv auf die

Anzahl der CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen in Allergie-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe aus. Zusätzlich stieg durch Therapie die FOXP3-Expression auf der mRNA-Ebene an (Pereira-Santos et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls der Transkriptionsfaktor FOXP3 als ein Marker für CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen untersucht. Gegen Birkenpollen sensibilisierte Kinder hatten eine signifikant niedrigere FOXP3-Expression, als Kinder ohne diese Sensibilisierung (Mann-Whitney U-Test $p=0,04$). Jartti und Kollegen (2007) fanden eine negative Korrelation zwischen dem Gesamt-IgE und FOXP3/CD4⁺CD25^{high+} Treg-Zellen, wobei FOXP3 nach einer intrazellulären Färbung in isolierten CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde. In den anderen erwähnten Studien wurde FOXP3 ebenfalls direkt in isolierten CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen untersucht. Die FOXP3-Expressionsanalysen der vorliegenden Studie wurden dagegen mit Proben aus Vollblut durchgeführt, was eher schwierig ist, da CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen nur eine kleine Untergruppe im Zellgemisch einnehmen. Dies ist sicherlich ein Grund dafür, dass z.B. kein Zusammenhang zwischen Gesamt-IgE und der FOXP3-Expression nachgewiesen wurde.

4.3 Zusammenhang zwischen T-Zell-Regulationsfaktoren (Th1/Th2-Antwort) und Stressregulation, sowie allergischer Sensibilisierung

Insbesondere bei allergischen Erkrankungen besteht der Verdacht, dass Stressfaktoren eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen. Es ist bekannt, dass sich das Immun- und Nervensystem gegenseitig beeinflussen. Diese Verbindung zwischen Immun- und Nervensystem könnte die Zusammenhänge zwischen psychischen Faktoren (z.B. Stress) und Erkrankungen erklären. Neben sozioökonomischen Faktoren werden insbesondere psychosoziale Faktoren, wie z.B. zwischenmenschliche Konflikte, der Verlust von Angehörigen oder das Erleben von Ablehnung durch andere Menschen, als Ursache für stressbedingte Lebenssituationen thematisiert.

Kimata (2003a) zeigte, dass das Spielen von Computerspielen in einer definierten Stressstudie das Zytokingleichgewicht in Richtung Th2 verlagert, die IgE-Produktion steigert und die Mastzelldegranulation triggert. Diese Reaktionen waren auch mit erhöhten Blutkonzentrationen von den Neuropeptiden Substanz P und VIP assoziiert. Auch eine andere Publikationen weist darauf hin, dass Neuropeptide unter Stress (Handy klingeln) vermehrt ausgeschüttet werden (Kimata, 2003b). Weiterhin wurde in einer klinischen Studie der Zusammenhang zwischen präoperativen Stress und Stressmarkern untersucht. In dieser Studie

wurde beobachtet, dass der VIP-Level gemeinsam mit den „typischen Stresshormonen“ Cortisol und Katecholamin anstieg (Crozier et al., 1988).

Das am häufigsten untersuchte Stresshormon ist Cortisol. Wobei Cortisol einer Periodizität im Tagesrhythmus unterliegt. Eine punktuelle Einzelmessung, wie sie im Rahmen des Studiendesigns der LISApplus-Studie erfolgte, würde bei der Analyse von Cortisol als Stressmarker eine große Variabilität der Messdaten zur Folge haben. Eine Cortisolanalyse hätte Mehrfachmessungen in kurzen Zeitabständen und die Aufnahme von Kinetiken erfordert. Doch bei sensiblen Kindern kann die Blutentnahme bereits einen erheblichen Stressor darstellen. Des Weiteren ist die Halbwertszeit von Cortisol im Blut sehr gering (Dickerson and Kemeny, 2004). Im Gegensatz zum Cortisol gibt es bei den Neuropeptiden VIP und SP keinen prägnanten Tagesrhythmus (Cugini et al., 1991, Hofman et al., 1996, Kerdelhue et al., 1981, Löckinger et al., 2004, Rolandi et al., 1990). Für SOM liegen keine Hinweise auf einen Tagesrhythmus vor. Deshalb wurde im Rahmen der LISA-Studie entschieden nicht eines der klassischen Stresshormone zu messen, sondern die Neuropeptide SOM, VIP und SP im Blut mittels einem Enzym-Immunassay (ELISA) nachzuweisen.

In unserer Studie wurde zum ersten Mal anhand einer epidemiologischen Studie die Verbindung zwischen der Immunsystemregulation, der Ausschüttung der Neuropeptide SOM, VIP und SP und allergischer Sensibilisierung in Kindern aufgezeigt. Kinder mit hohen SOM-Serumkonzentrationen im Blut zeigten eine Th2-Polarisierung und eine verminderte Expression von FOXP3. Die VIP-Konzentrationen im Blut waren negativ mit Tbet und SOCS3 korreliert. Darüber hinaus waren Kinder mit erhöhten SOM- und VIP-Konzentrationen häufiger allergisch sensibilisiert. Erhöhte Konzentrationen der Neuropeptide SOM und VIP im Blut gehen demnach mit einer allergiefördernden, Th2-verschobenen Immunreaktionslage und mit allergischer Sensibilisierung daher. Dagegen wurde keine Korrelation zwischen SP und allergischer Sensibilisierung gefunden.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Expression von SOCS1 und dem Neuropeptid SOM erbrachten, dass erhöhte SOCS1-Expressionen bei Kindern mit erhöhten SOM-Plasmakonzentrationen vorhanden sind. Außerdem wiesen Kinder mit erhöhten SOM-Plasmakonzentrationen eine erhöhte Expression des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 auf. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine positive Korrelation zwischen erhöhten SOM-Plasmakonzentrationen und IL-4 beobachtet. Diese Daten bestätigen Ergebnisse von bisherigen *in vitro* Studien, die auf eine Induktion der Th2-Differenzierung durch SOM hinweisen (Levite, 1998, Krantic et al., 2004). Des Weiteren war in der vorliegenden Studie die Häufigkeit von Nahrungsmittelsensibilisierungen größer bei Kindern mit hohen SOM-

Konzentrationen (p für Trend = 0,001) und für Sensibilisierungen gegen die Einzelinhalationsallergene Lieschgras und Roggen (p für Trend = 0,007 und 0,012). Erhöhte Blutkonzentrationen des Neuropeptids SOM sind also mit einer Th2-verschobenen Reaktionslage und einem erhöhten Risiko für allergische Sensibilisierungen assoziiert. Ebenso fanden wir eine abgeschwächte IFN- γ -Produktion bei Kindern mit hohen SOM-Plasmakonzentrationen. Auch in Mausstudien wurde die Th1-unterdrückende Kapazität von SOM demonstriert. Die Autoren konnten zeigen, dass SOM direkt an den T-Zellen angreift, indem die TZR-stimulierte Abgabe von IFN- γ inhibiert wird (Elliott et al., 1999).

Dem Neuropeptid VIP kommt eine bedeutende entzündungshemmende Rolle zu, die verbunden ist mit einer Unterdrückung der T-Zell-Proliferation, wie Resultate aus mehreren Arbeiten bestätigen (Nio et al., 1993, Groneberg et al., 2004, Leceta et al., 2000). Dabei inhibierte VIP die Mediatorfreisetzung von Mastzellen und Makrophagen und die entzündungsfördernden Effekte von Th-Lymphozyten (Groneberg et al., 2004). Leceta et al. (2000) demonstrierten, dass VIP die Produktion von IL-6, IL-12, TNF- α , und Stickstoffmonoxid hemmt, und die IL-10-Produktion stimuliert. Interessanterweise wurde darüber hinaus gezeigt, dass VIP auch von Th2-Zellen produziert wird (Pozo and Delgado, 2004). Jüngste Studien beschrieben, dass mit VIP ausgereifte dendritische Zellen funktionelle Treg-Zellen *in vitro* und *in vivo* induzieren (Delgado et al., 2005). Diese Treg-Zellen unterdrückten primär die antigenspezifische Th1-vermittelte Immunantwort (Gonzalez-Rey et al., 2006). In der vorliegenden Studie korrelierte eine hohe VIP-Produktion mit einer verringerten Expression des Th1-Transkriptionsfaktors Tbet. Darüber hinaus gab es einen Trend für eine erhöhte IL-4- und GATA-3-Expression. Somit und im Einklang zu oben genannten Studien von Delgado und Mitarbeitern (2005) und Gonzalez-Rey und Mitarbeitern (2006) könnte die Th1-unterdrückende Wirkung von VIP für eine Th2-Ausrichtung verantwortlich sein und so zu einem allergischen Risiko beitragen.

Ähnlich wie SOM, korrelierte das Neuropeptid VIP positiv mit einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene (p für Trend = 0,004) und gegen das Inhalationsallergen Roggen (p für Trend = 0,008). Doch die Ergebnisse, die eine *in vitro* Wirkung von VIP und SOM auf die IgE-Produktion betreffen, wurden widersprüchlich in der Literatur diskutiert. Studien von Kimata und Mitarbeitern (2003a, 2003b) zeigten, dass die Abgabe von IgE von B-Zellen durch VIP und SOM inhibiert wird, aber nur in Anwesenheit von T-Zellen und Monozyten. Jedoch berichteten Veröffentlichungen der gleichen Gruppe, dass durch Stress allergenspezifisches IgE erhöht wird, mit einem gleichzeitigen Anstieg der Plasmakonzentration von VIP in Patienten mit atopischer Dermatitis (Kimata, 2003a, Kimata,

2003b). Übereinstimmend damit fand eine andere Gruppe, dass die Konzentrationen von VIP im Serum von Patienten mit atopischer Dermatitis erhöht sind und dies zur Symptomatik dieser Krankheit beitragen könnte (Umemoto et al., 2003). Diese Betrachtungen deuten an, dass die Ergebnisse aus *in vitro* Studien nicht ausreichend die *in vivo* IgE-Produktion widerspiegeln.

Während SOM und VIP mit allergischer Sensibilisierung assoziiert waren, hatte das Neuropeptid SP in unserer Studie keinen Einfluss auf die allergische Sensibilisierung. Dies könnte unterschiedliche Gründe haben. Wir zeigten, dass der Th2-Transkriptionsfaktor GATA-3, sowie SOCS3 in Kindern mit hohen SP-Serumkonzentrationen vermindert exprimiert wird. Zusätzlich zeigten Kinder mit hohen SP-Serumkonzentrationen auch erhöhte IFN- γ -Konzentrationen. Die Tatsache, dass in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass SP proinflammatorische Antworten hervorruft und somit an der Entwicklung entzündlicher Erkrankungen beteiligt sein könnte, ist in Übereinstimmung mit unseren Daten (Blum et al., 2003, Joachim et al., 2003, Joos et al., 2001, Joos et al., 2000). SP führt bei Th-Lymphozyten zu einer Steigerung der IL-2- und IFN- γ -Produktion und begünstigt somit die Th1-Entwicklung bei gleichzeitiger Inhibierung der Th2-Differenzierung (Lambrecht, 2001, Rameshwar et al., 1993). Ferner aktivierte SP die antikörperabhängige Zytotoxizität (Murriss-Espin et al., 1995) und die Freisetzung von Superoxiden, sowie IL-1 und IL-12 durch Makrophagen (Kincy-Cain and Bost, 1997).

Nachdem wir einen Zusammenhang zwischen der T-Zell-Regulation, Neuropeptiden und allergischer Sensibilisierung bei Kindern aufzeigen konnten, wurde in einer weiteren Promotionsarbeit innerhalb der LISApplus-Studie der Zusammenhang zwischen psychosozialen Faktoren aus dem Lebensumfeld der Kinder und Neuropeptidkonzentrationen, sowie Immunregulation untersucht (Weber, 2007). Mögliche Stressoren, wie Scheidung/Trennung der Eltern, Arbeitslosigkeit der Eltern und Erkrankung/Tod eines Familienmitgliedes wurden innerhalb eines Sozialfragebogens erfasst. Die 6-jährigen Kinder der vorliegenden LISApplus-Studie, deren Eltern sich trennten bzw. scheiden ließen, wiesen eine signifikant höhere Blutkonzentration von dem stress-relevanten Neuropeptid VIP (302 pg/ml) auf, verglichen mit Kindern ohne diesem Lebensereignis (188,6 pg/ml, $p=0,005$). Weiterhin hatten die Trennungs/Scheidungs-Kinder eine höhere Blutkonzentration des Th2-Zytokins IL-4 ($p=0,02$) (Herberth et al., 2007c, Weber, 2007). Daraus könnte ein erhöhtes Risiko dieser Kinder für eine potentielle Allergieentwicklung resultieren. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse einer früheren Untersuchung innerhalb der LISA-Studie in der Bockelbrink und Kollegen (2006) berichteten, dass die Scheidung oder Trennung der Eltern

in den ersten beiden Lebensjahren der Kinder mit einem erhöhten Vorkommen von atopischem Ekzem bis zum 4. Geburtstag der Kinder assoziiert ist.

Eine Trennung der Eltern ist für Kinder ein emotionales Trauma und kann bis ins Erwachsenenalter zu Problemen führen. Denn zu dem Verlieren eines Elternteils treten oftmals noch weitere Veränderungen, etwa auch der Verlust des entsprechenden Großelternpaares, eine Verminderung des Einkommens oder der Umzug in eine kleinere Wohnung (Huurre et al., 2006, Schor, 2003). In dem Fragebogen unserer Studie wurde nicht nach dem mit der Trennung der Eltern verbundenem, subjektiv empfundenem Stress der Kinder gefragt. Aber es liegt nahe, dass die Trennung/Scheidung der Eltern ein sehr tief greifendes Lebensereignis in der Kindheit darstellt. Es kann zur Abgabe von Stressmediatoren kommen, welche dann einen Effekt auf die Immunregulation ausüben. Somit bestände die Möglichkeit, dass während dieser Lebensphase, in der die T-Zell-Reaktivität in Richtung Th2-Antwort verschoben ist (vermittelt durch VIP), eine allergische Sensibilisierung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit stattfindet. Wenn ein Kind erst einmal sensibilisiert ist, könnte dies zu einem höheren Risiko, unter einer allergischen Erkrankung im späteren Leben zu leiden, führen. Der dosisabhängige Zusammenhang zwischen der Konzentration von VIP und dem Risiko einer allergischen Sensibilisierung, der bereits weiter vorn ausgeführt wurde, unterstützt diese Hypothese.

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass, obwohl eine allergische Sensibilisierung nicht mit einer allergischen Erkrankung gleichzusetzen ist, sie einen bedeutenden Risikofaktor für die Manifestation dieser darstellt. So wurde z.B. in der Multizentrischen Allergie Studie (MAS-Studie) belegt, dass Kinder, die in ihrer frühen Kindheit gegen Nahrungsmittel sensibilisiert waren, später sehr viel häufiger an allergischen Erkrankungen der Atemwege litten. Daher wurde insbesondere eine länger nachweisbare Sensibilisierung als ein stark prognostischer Faktor für die spätere Entwicklung einer atopischen Erkrankung beschrieben (Kulig et al., 1998). Der Anteil allergisch sensibilisierter Kinder aus der LISApplus-Studie war unter den Scheidungskindern mit deutlicher Tendenz erhöht. Dieser Trend steht im Einklang mit bisherigen Studien, die für Kinder geschiedener Eltern, bzw. für Kinder aus Familien mit gestörten innerfamiliären Beziehungen ein erhöhtes Risiko einer atopischen Erkrankung feststellten (Bockelbrink et al., 2006, Slattery et al., 2002).

Neben der Bedeutung von Scheidung/Trennung als Stressfaktor wurde in der LISApplus-Studie auch die Auslösung von Stress bei den Kindern durch einen Umzug untersucht. Ein Umzug könnte für die Kinder mit einer Änderung des Wohnumfeldes und der Wohnung, mit dem Verlust von Freunden, einer Veränderung der sozialen Aktivitäten und einem Wechsel

des Kindergartens oder der Schule verbunden gewesen sein. Zusätzlich könnten die Umstände, die zu einem Umzug führten, beim Kind Stress ausgelöst haben, etwa eine Scheidung oder neue Partnerschaft der Eltern, die Geburt eines weiteren Geschwisterkindes oder eine neue Arbeitsstelle der Mutter oder des Vaters. Die Ergebnisse der vorliegenden LISApplus-Studie zeigten, dass Kinder deren Eltern einen Umzug innerhalb des 6. Lebensjahres angegeben hatten, signifikant erhöhte Blutkonzentrationen (220.7 pg/ml) des Neuropeptides VIP, verglichen mit Kindern die nicht umgezogen waren, aufwiesen (198.5 pg/ml, $p=0.034$) (Herberth et al., 2007b, Weber, 2007). Ergebnisse aus einer klinischen Studie, in der Kinder, welche seit einem Jahr im Ausland lebten, häufiger allergisch sensibilisiert waren als die Kontrollgruppe, unterstützen unsere Beobachtungen. Als mögliche Ursache für die höhere Sensibilisierungsrate wurde der verbundene Stress mit dem Verlust des sozialen Umfeldes und dem Einleben in eine fremde Kultur angeführt (Anderzen et al., 1997). Die Kinder der LISApplus-Studie sind innerhalb ihres Heimatlandes umgezogen, doch auch dies wirkte bereits als Stressfaktor. Für die Neuropeptide SOM und SP wurden keine Assoziationen mit dem Ereignis Umzug festgestellt. Da für VIP sowohl eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts in Richtung Th2 als auch eine allergische Sensibilisierung beschrieben wurde, bieten unsere Ergebnisse eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der Entstehung Immunsystem-bedingter Erkrankungen (vor allem Allergien) nach stressenden Lebensereignissen.

Basierend auf Daten der vorliegenden Studie konnten wir eine Verbindung zwischen der Modulation des Th1/Th2-Gleichgewichts und Neuropeptidkonzentrationen im Blut aufzeigen, für SOM und VIP in Richtung allergischer Sensibilisierung bei Kindern. Es konnte in der Studie auch Stressfaktoren beschrieben werden, die zur Freisetzung von Neuropeptiden führen. Durch die Untersuchungen im Rahmen der LISA-Studie wissen wir nun mehr darüber, wie Stressfaktoren auf das Immunsystem wirken und so z.B. das Allergierisiko erhöhen können.

4.4 Stärken / Schwächen-Analyse

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus dieser Studie mit vorher publizierten Daten, muss im Folgenden eine generelle Anmerkung gemacht werden. Viele Autoren berichteten, dass naive $CD4^+$ T-Zellen viel geringere Mengen an SOCS-Molekülen, sowie Tbet, GATA-3 und FOXP3 exprimieren, als ausdifferenzierte Th1- oder Th2-Zellen (Chakir et al., 2003, Egwuagu et al., 2002, Walker et al., 2003). Die Expressionsanalysen der vorliegenden Studie wurden aber mit Proben aus Vollblut durchgeführt. Vollblut enthält eine

Mischung aus naiven, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. Dieses Zellgemisch dürfte der Hauptgrund sein, warum unsere Ergebnisse teilweise von schon publizierten Daten abweichen. Um Widersprüche zu bisherigen Veröffentlichungen aufzuklären, würde es daher weiterer Untersuchungen auf Einzelzellebene bedürfen.

Bei Populationsstudien ist es darüber hinaus schwierig, die Ursache-Wirkungs-Beziehung der beobachteten Korrelationen zu definieren. Eine weitere Einschränkung dieser Studie ist die niedrige Anzahl sensibilisierter Kinder für einige spezifische Allergene. Außerdem sind Schwankungen der Immunregulation und die Bedeutung von Einflussfaktoren (dies betrifft tägliche, als auch kurzfristige Einflüsse) mit nur einer Blutprobe pro Kind nur schwer erfassbar. Bei gesunden Kindern wäre jedoch eine mehrmalige Blutentnahme innerhalb eines Lebensjahres ethisch nicht zu vertreten. Durch die große Fallzahl der untersuchten Probanden hebt sich dieses Defizit im Querschnitt der Population jedoch wieder auf.

Nach unserem Wissen, analysiert diese Studie zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen SOCS-Faktoren und allergischer Sensibilisierung, sowie Neuropeptiden, auf der Grundlage einer Populationsstudie. Daten zur SOCS-Regulation bei Kindern lagen bisher nicht vor. Eine weitere Stärke der Studie ist die hohe Probandenzahl.

Die beobachteten Ergebnisse müssen sicherlich kritisch diskutiert werden, liefern aber dennoch interessante Hinweise zur Aufklärung von Faktoren, die für die Entwicklung einer allergischen Reaktionslage von Bedeutung sein könnten und ermutigen für weitere Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer umweltepidemiologischen Kohortenstudie. Die LISA-Studie (Einfluss von Lebensbedingungen und Verhaltensweisen auf die Entwicklung von Immunsystem und Allergien im Ost-West-Vergleich) basiert auf der Hypothese, dass bestimmte Lebensstil- und Umweltfaktoren in der frühen Kindheit einen Einfluss auf die Reifung und Entwicklung des Immunsystems ausüben. Es wird angenommen, dass derartige Faktoren eine ausschlaggebende Bedeutung bei der Steuerung von Immunantworten besitzen, welche entweder schützend oder unterstützend zur Entwicklung von Allergien beitragen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit im Rahmen dieser Studie war die molekularbiologische Untersuchung der Expression von Signalproteinen, die insbesondere im Rahmen der T-Zell-Differenzierung eine Rolle spielen und damit potentiell auch für die Entwicklung einer allergischen Reaktionslage von Bedeutung sein könnten, innerhalb einer Querschnittspopulation 6-jähriger Kinder. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Korrelation von T-Zell-Regulationsfaktoren und Transkriptionsfaktoren untereinander, sowie deren Zusammenhang zur Th1/Th2- (T-Helfer-Zellen vom Typ 1 und vom Typ 2) Differenzierung und allergischer Sensibilisierung. Da in der Literatur, die Bedeutung von Stress als Auslöser pathologischer Immunantworten und Risikofaktor bei der Ausbildung von Allergien diskutiert wird, erfolgten darüber hinaus auch Untersuchungen zum Zusammenhang von T-Zell-Regulationsfaktoren und Neuropeptiden (Stressproteinen), sowie allergischer Sensibilisierung.

Die Untersuchung der Expression relevanter Signalmoleküle erfolgte über eine Präparation von mRNA aus Vollblutproben und eine nachfolgende quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR).

Erstmals wurde in dieser Arbeit die Expression von suppressor of cytokine signalling- (SOCS) Molekülen im Rahmen einer Populationsstudie untersucht.

- Gegen inhalative Allergene und/oder Nahrungsmittelallergene sensibilisierte Kinder wiesen signifikant erhöhte SOCS1-Expressionen auf. Dieses Ergebnis wurde unterstützt durch die positive Assoziation zwischen der Expression von SOCS1, dem Th2-Differenzierungsmarker GATA-bindendes Protein 3 (GATA-3) und Interleukin-4 (IL-4). Im Gegensatz dazu war der Th1-Transkriptionsfaktor T-box expressed in T cells (Tbet) erniedrigt und die Menge Interferon-gamma (IFN- γ) produzierender CD4⁺ T-Zellen geringer in Kindern mit erhöhter SOCS1-Expression.

- Die SOCS-Moleküle SOCS3, SOCS5 und das cytokine-inducible SH2 Domäne enthaltende Protein (CIS) korrelierten positiv mit Tbet und dem Transkriptionsfaktor für Treg-Zellen forkhead box P3 (FOXP3), sowie (mit Ausnahme von CIS) negativ mit IL-4, dem Leitzytokin für Th2-Zellen und sie zeigten keine Relevanz für die allergische Sensibilisierung.

Insgesamt deuten diese Beobachtungen daraufhin, dass eine erhöhte SOCS1-Expression mit der Entwicklung des Th2-Phänotyps sowie allergischen Sensibilisierungen einhergeht, während SOCS3, SOCS5 und CIS mit einer Stimulation der Th1-Antwort und regulatorischen T-Zellaktivität korrelieren.

Bereits bekannte Ergebnisse, im Hinblick auf T-Zell-Regulationsfaktoren, Th1/Th2-Regulation und allergischer Sensibilisierung konnten auf der Basis dieser Untersuchungen bestätigt werden.

- Die Expression des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 war positiv korreliert mit der Expression des Th2-Leitzytokins IL-4.
- Kinder aus unserer Studie, die eine hohe Expression des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 aufwiesen, hatten häufiger eine Sensibilisierung gegen die Hausstaumilbe, im Vergleich zu Kindern mit einer niedrigeren GATA-3-Expression. Die mRNA-Expression für IL-4 korrelierte ebenfalls mit einer Sensibilisierung gegen Hausstaumilbe. Darüber hinaus wurden niedrigere Tbet-Expressionslevel bei Kindern mit Sensibilisierungen gegen Inhalationsallergene vermerkt.
- Die Expression des Th1-Transkriptionsfaktors Tbet war negativ korreliert mit der Expression von IL-4 und positiv korreliert mit der IFN- γ -Konzentration in unstimulierten Blutproben.

Ebenfalls erstmalig im Rahmen einer Populationsstudie wurde die Verbindung zwischen der T-Zell-Regulation, den Neuropeptiden Somatostatin (SOM), vasoaktives Intestinalpeptid (VIP) und Substanz P (SP) und allergischer Sensibilisierung in Kindern aufgezeigt.

- Hohe SOM-Konzentrationen im Blut der Kinder waren assoziiert mit einer Th2-Polarisierung (erhöhte GATA-3, SOCS1-Werte) und einer verminderten Expression von FOXP3.
- Hohe VIP-Konzentrationen zeigten eine negative Korrelation mit Tbet und SOCS3.
- Darüber hinaus besaßen Kinder mit erhöhten SOM- und VIP-Konzentrationen im Blut ein höheres Risiko für allergische Sensibilisierungen.

- Im Gegensatz dazu wurde für SP eine negative Korrelation zu GATA-3 gefunden. Dieses Neuropeptid zeigte folgerichtig keinen Zusammenhang zu allergischen Sensibilisierungen.

Erhöhte Konzentrationen der Neuropeptide SOM und VIP im Blut gehen demnach mit einer allergiefördernden, Th2-verschobenen Immunreaktionslage und daraus resultierend einem erhöhten Risiko für allergische Sensibilisierungen einher.

Generell liefert diese Arbeit erste Hinweise, die Entwicklung allergischer Manifestationen, insbesondere im Kindesalter, besser zu verstehen. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte SOCS1-Expression mit der Entwicklung des Th2-Phänotyps, sowie allergischen Sensibilisierungen einhergeht. Darüber hinaus wurde eine Verbindung zwischen der Modulation des Th1/Th2-Gleichgewichts und Neuropeptidkonzentrationen im Blut, sowie allergischer Sensibilisierung bei Kindern beobachtet.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas A K, Murphy K M, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; (383): 787-793.
- Afkarian M, Sedy J R, Yang J, Jacobson N G, Cereb N, Yang S Y, Murphy T L, Murphy K M. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2002; (3): 549-557.
- Akbari O, Stock P, DeKruyff R H, Umetsu D T. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003; (15): 627-633.
- Alexander W S, Hilton D J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; (22): 503-529.
- Alexander W S, Starr R, Fenner J E, Scott C L, Handman E, Sprigg N S, Corbin J E, Cornish A L, Darwiche R, Owczarek C M, Kay T W, Nicola N A, Hertzog P J, Metcalf D, Hilton D J. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 1999; (98): 597-608.
- Anderzen I, Arnetz B B, Soderstrom T, Soderman E. Stress and sensitization in children: a controlled prospective psychophysiological study of children exposed to international relocation. *J Psychosom Res* 1997; (43): 259-269.
- Becker A B. Primary prevention of allergy and asthma is possible. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; (28): 5-16.
- Behrendt H, Krämer U, Dolgner R, Hinrichs J, Willer H, Hagenbeck H, Schlipkötter H W. Elevated levels of total serum IgE in East German children: atopy, parasites, or pollutants? *Allergo J* 1993; (2): 31-40.
- Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; (111): 862-868.
- Blum A M, Metwali A, Elliott D E, Weinstock J V. T cell substance P receptor governs antigen-elicited IFN-gamma production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; (284): G197-G204.
- Bockelbrink A, Heinrich J, Schafer I, Zutavern A, Borte M, Herbarth O, Schaaf B, von B A, Schafer T. Atopic eczema in children: another harmful sequel of divorce. *Allergy* 2006; (61): 1397-1402.
- Brysha M, Zhang J G, Bertolino P, Corbin J E, Alexander W S, Nicola N A, Hilton D J, Starr R. Suppressor of cytokine signaling-1 attenuates the duration of interferon gamma signal transduction in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2001; (276): 22086-22089.
- Cavaillon J M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2001; (47): 695-702.

- Chakir H, Wang H, Lefebvre D E, Webb J, Scott F W. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods* 2003; (278): 157-169.
- Chen C M, Rzehak P, Zutavern A, Fahlbusch B, Bischof W, Herbarth O, Borte M, Lehmann I, Behrendt H, Kramer U, Wichmann H E, Heinrich J. Longitudinal study on cat allergen exposure and the development of allergy in young children. *J Allergy Clin Immunol* 2007; (119): 1148-1155.
- Chen Y, Kuchroo V K, Inobe J, Hafler D A, Weiner H L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; (265): 1237-1240.
- Crozier T A, Drobnik L, Stafforst D, Kettler D. Opiate modulation of the stress-induced increase of vasoactive intestinal peptide (VIP) in plasma. *Horm Metab Res* 1988; (20): 352-356.
- Cugini P, Lucia P, di P L, Re M, Leone G, Battisti P, Canova R, Gasbarrone L, Cianetti A. Vasoactive intestinal peptide fluctuates in human blood with a circadian rhythm. *Regul Pept* 1991; (34): 141-148.
- Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 2005; (175): 7311-7324.
- Dickensheets H, Vazquez N, Sheikh F, Gingras S, Murray P J, Ryan J J, Donnelly R P. Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes Immun* 2007; (8): 21-27.
- Dickerson S S, Kemeny M E. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull* 2004; (130): 355-391.
- Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle J N, Fikrig E, Rincon M. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 2000; (13): 805-815.
- Diez U, Kroessner T, Rehwagen M, Richter M, Wetzig H, Schulz R, Borte M, Metzner G, Krumbiegel P, Herbarth O. Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. Leipzig Allergy High-Risk Children Study. *Int J Hyg Environ Health* 2000; (203): 23-28.
- Duhme H, Weiland S K, Rudolph P, Wienke A, Kramer A, Keil U. Asthma and allergies among children in West and East Germany: a comparison between Munster and Greifswald using the ISAAC phase I protocol. International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Eur Respir J* 1998; (11): 840-847.
- Egwuagu C E, Yu C R, Li Z, Nussenblatt R B. SOCS5 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC): a potential bio-marker for monitoring response of uveitis patients to Daclizumab therapy. *J Autoimmun* 2005; (24): 39-46.
- Egwuagu C E, Yu C R, Zhang M, Mahdi R M, Kim S J, Gery I. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 2002; (168): 3181-3187.

- Ekelund E, Saaf A, Tengvall-Linder M, Melen E, Link J, Barker J, Reynolds N J, Meggitt S J, Kere J, Wahlgren C F, Pershagen G, Wickman M, Nordenskjöld M, Kockum I, Bradley M. Elevated expression and genetic association links the SOCS3 gene to atopic dermatitis. *Am J Hum Genet* 2006; (78): 1060-1065.
- Elliott D E, Li J, Blum A M, Metwali A, Patel Y C, Weinstock J V. SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur J Immunol* 1999; (29): 2454-2463.
- Elliott J, Johnston J A. SOCS: role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol* 2004; (25): 434-440.
- Eyles J L, Metcalf D, Grusby M J, Hilton D J, Starr R. Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1. *J Biol Chem* 2002; (277): 43735-43740.
- Federici M, Giustizieri M L, Scarponi C, Girolomoni G, Albanesi C. Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol* 2002; (169): 434-442.
- Ferber I A, Lee H J, Zonin F, Heath V, Mui A, Arai N, O'Garra A. GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol* 1999; (91): 134-144.
- Finotto S, Neurath M F, Glickman J N, Qin S, Lehr H A, Green F H, Ackerman K, Haley K, Galle P R, Szabo S J, Drazen J M, De Sanctis G T, Glimcher L H. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 2002; (295): 336-338.
- Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; (4): 330-336.
- Freeman G J, Boussiotis V A, Anumanthan A, Bernstein G M, Ke X Y, Rennert P D, Gray G S, Gribben J G, Nadler L M. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995; (2): 523-532.
- Fujimoto M, Naka T. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol* 2003; (24): 659-666.
- Fujimoto M, Tsutsui H, Xinshou O, Tokumoto M, Watanabe D, Shima Y, Yoshimoto T, Hirakata H, Kawase I, Nakanishi K, Kishimoto T, Naka T. Inadequate induction of suppressor of cytokine signaling-1 causes systemic autoimmune diseases. *Int Immunol* 2004; (16): 303-314.
- Gambineri E, Torgerson T R, Ochs H D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; (15): 430-435.
- Gavin M A, Clarke S R, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 2002; (3): 33-41.

- Gehring U, Bolte G, Borte M, Bischof W, Fahlbusch B, Wichmann H E, Heinrich J. Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2001; (108): 847-854 [Correction. *JACI* 2002; 109:648].
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 2006; (107): 3632-3638.
- Groneberg D A, Rabe K F, Wagner U, Fischer A. [Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract: physiology and pathophysiology]. *Pneumologie* 2004; (58): 330-338.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, De Vries J E, Roncarolo M G. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; (389): 737-742.
- Gubelt R. Einfluss ausgewählter Schadstoffbelastungen auf die Immunreaktivität sechsjähriger Kinder. 2008. Medizinische Dissertation, Universität Leipzig.
- Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; (36): 491-496.
- Hartl D, Koller B, Mehlhorn A T, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel D J, Griesse M, Krauss-Etschmann S. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; (119): 1258-1266.
- Hebenstreit D, Luft P, Schmiedlechner A, Duschl A, Horejs-Hoeck J. SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IL-4 and IL-13 induced activation of Eotaxin-3/CCL26 gene expression in HEK293 cells. *Mol Immunol* 2005; (42): 295-303.
- Herberth G, Daegelman C, Weber A, Röder S, Giese T, Krämer U, Schins R P, Behrendt H, Borte M, Lehmann I. Association of neuropeptides with Th1/Th2 balance and allergic sensitization in children. *Clin Exp Allergy* 2006; (36): 1408-1416.
- Herberth G, Diez U, Borte M, Rehwagen M, Röder S, Herbarth O, Lehmann I. Priming of the fetal immune system by chemical exposure increases the risk for allergy development later in children's life. *Am J Reprod Immunol* 2007a; (58): 196-197.
- Herberth G, Weber A, Lehmann I, Röder S, Herbarth O, Krämer U, Borte M, Diez U, Borte M, Heinrich J. The stress of relocation and neuropeptides: an epidemiological study in children. *J Psychosom Res* 2007b; (63): 451-452.
- Herberth G, Weber A, Röder S, Elvers H D, Krämer U, Schins R P, Diez U, Borte M, Heinrich J, Schäfer T, Herbarth O, Lehmann I. Relation between stressful life events, neuropeptides and cytokines: results from the LISA birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19(8): 722-9.
- Hilton D J, Richardson R T, Alexander W S, Viney E M, Willson T A, Sprigg N S, Starr R, Nicholson S E, Metcalf D, Nicola N A. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 114-119.

- Hofman M A, Zhou J N, Swaab D F. No evidence for a diurnal vasoactive intestinal polypeptide (VIP) rhythm in the human suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 1996; (722): 78-82.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; (299): 1057-1061.
- Huurre T, Junkkari H, Aro H. Long-term psychosocial effects of parental divorce: a follow-up study from adolescence to adulthood. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006; (256): 256-263.
- Jang A S, Choi I S, Takizawa H, Rhim T, Lee J H, Park S W, Park C S. Additive effect of diesel exhaust particulates and ozone on airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. *J Korean Med Sci* 2005; (20): 759-763.
- Jartti T, Burmeister K A, Seroogy C M, Jennens-Clough M L, Tisler C J, Salazar L P, Dasilva D F, Evans M D, Vrtis R F, Wallace P K, Ruiz-Perez B, Gangnon R E, Lemanske R F, Jr., Gern J E. Association between CD4(+)CD25(high) T cells and atopy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2007; (120): 177-183.
- Joachim R A, Quarcoo D, Arck P C, Herz U, Renz H, Klapp B F. Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. *Psychosom Med* 2003; (65): 811-815.
- Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk A H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002; (196): 255-260.
- Joos G F, De Swert K O, Pauwels R A. Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2001; (429): 239-250.
- Joos G F, Germonpre P R, Pauwels R A. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 2000; (55): 321-337.
- Kaplan M H, Sun Y L, Hoey T, Grusby M J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996; (382): 174-177.
- Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley N J, Hense G, Ruckert B, Mantel P Y, Menz G, Akdis C A, Blaser K, Schmidt-Weber C B. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; (114): 1425-1433.
- Kerdelhue B, Palkovits M, Karteszi M, Reinberg A. Circadian variations in substance P, luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) contents in hypothalamic and extrahypothalamic brain nuclei of adult male rats. *Brain Res* 1981; (206): 405-413.
- Kilpi T. [Vaccinations have their benefits--but what are their adverse effects?]. *Duodecim* 2002; (118): 63-69.
- Kimata H. Enhancement of allergic skin wheal responses and in vitro allergen-specific IgE production by computer-induced stress in patients with atopic dermatitis. *Brain Behav Immun* 2003a; (17): 134-138.

- Kimata H. Enhancement of allergic skin wheal responses in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome by playing video games or by a frequently ringing mobile phone. *Eur J Clin Invest* 2003b; (33): 513-517.
- Kincy-Cain T, Bost K L. Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages. *J Immunol* 1997; (158): 2334-2339.
- Kramer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H. Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 2000; (11): 64-70.
- Krantic S, Goddard I, Saveanu A, Giannetti N, Fombonne J, Cardoso A, Jaquet P, Enjalbert A. Novel modalities of somatostatin actions. *Eur J Endocrinol* 2004; (151): 643-655.
- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 2003; (4): 1169-1176.
- Kubo M, Ransom J, Webb D, Hashimoto Y, Tada T, Nakayama T. T-cell subset-specific expression of the IL-4 gene is regulated by a silencer element and STAT6. *EMBO J* 1997; (16): 4007-4020.
- Kulig M, Bergmann R, Niggemann B, Burow G, Wahn U. Prediction of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergens. The MAS Study Group. Multicentre Allergy Study. *Clin Exp Allergy* 1998; (28): 1397-1403.
- Lambrecht B N. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res* 2001; (2): 133-138.
- Leceta J, Gomariz R P, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M. Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci* 2000; (921): 92-102.
- Lee H J, O'Garra A, Arai K, Arai N. Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the IL-5 gene: a role for a GATA-binding protein. *J Immunol* 1998; (160): 2343-2352.
- Lee H J, Takemoto N, Kurata H, Kamogawa Y, Miyatake S, O'Garra A, Arai N. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* 2000; (192): 105-115.
- Lehmann I, Rehwagen M, Diez U, Seiffart A, Rolle-Kampczyk U, Richter M., Wetzig H, Borte M, Herbarth O. Enhanced in vivo IgE production and T cell polarization to the type 2 phenotype in association with indoor exposure to VOC: results of the LARS study. *Int J Hyg Environ Health* 2001; (204): 211-221.
- Lehmann I, Thoeke A, Rehwagen M, Rolle-Kampczyk U, Schlink U, Schulz R, Borte M, Diez U, Herbarth O. The influence of maternal exposure to volatile organic compounds on the cytokine secretion profile of neonatal T cells. *Environ Toxicol* 2002a; (17): 203-210.
- Lehmann I, Thoeke A, Weiss M, Schlink U, Schulz R, Diez U, Sierig G, Emmrich F, Jacob B, Belcredi P, Bolte G, Heinrich J, Herbarth O, Wichmann H E, Borte M. T cell reactivity in neonates from an East and a West German city- results of the LISA study. *Allergy* 2002b; (57): 129-136.

- Leonard W J, O'Shea J J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; (16): 293-322.
- Levite M. Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 12544-12549.
- Li Y, Chu N, Rostami A, Zhang G X. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006; (177): 1679-1688.
- Ling E M, Smith T, Nguyen X D, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr V A, Robinson D S. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; (363): 608-615.
- Liu C T, Wang G, Luo F M, Wang Z L, Liu R, Wang C L. [Imbalanced T cell-specific transcription factors T-bet and GATA-3 contributes to type 2 T helper cell polarization in asthmatic patients]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2004; (27): 398-402.
- Löckinger A, Köberle D, König P, Saria A, Herold M, Cornélissen G, Halber F. Neuropeptide chronomics in clinically healthy young adults: circaoctohoran and circadian patterns. *Peptides* 2004; (25): 533-542.
- Macaubas C, Holt P G. Regulation of cytokine production in T-cell responses to inhalant allergen: GATA-3 expression distinguishes between Th1- and Th2-polarized immunity. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; (124): 176-179.
- Macaubas C, Lee P T, Smallacombe T B, Holt B J, Wee C, Sly P D, Holt P G. Reciprocal patterns of allergen-induced GATA-3 expression in peripheral blood mononuclear cells from atopics vs. non-atopics. *Clin Exp Allergy* 2002; (32): 97-106.
- Marine J C, McKay C, Wang D, Topham D J, Parganas E, Nakajima H, Pendeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle J N. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 1999a; (98): 617-627.
- Marine J C, Topham D J, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle J N. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 1999b; (98): 609-616.
- Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, Ohtsuka S, Suzuki A, Hayashi I, Tsuji K, Nakahata T, Okabe M, Yamada S, Yoshimura A. Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1999; (19): 6396-6407.
- Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, Tanaka K, Chinen T, Shichita T, Wyss-Coray T, Sato K, Yoshimura A. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2007; (179): 2170-2179.
- McHugh R S, Whitters M J, Piccirillo C A, Young D A, Shevach E M, Collins M, Byrne M C. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; (16): 311-323.

- Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W, Giedlin M A, Coffman R L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; (136): 2348-2357.
- Mosmann T R, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [see comments]. *Immunol Today* 1996; (17): 138-146.
- Müller A, Lehmann I, Seiffart A, Diez U, Wetzig H, Borte M, Herbarth O. Increased incidence of allergic sensitisation and respiratory diseases due to mould exposure: results of the Leipzig Allergy Risk children Study (LARS). *Int J Hyg Environ Health* 2002; (204): 363-365.
- Murris-Espin M, Pinelli E, Pipy B, Leophonte P, Didier A. Substance P and alveolar macrophages: effects on oxidative metabolism and eicosanoid production. *Allergy* 1995; (50): 334-339.
- Muthukumarana P, Chae W J, Maher S, Rosengard B R, Bothwell A L, Metcalfe S M. Regulatory transplantation tolerance and "stemness": evidence that Foxp3 may play a regulatory role in SOCS-3 gene transcription. *Transplantation* 2007; (84): S6-11.
- Naka T, Matsumoto T, Narazaki M, Fujimoto M, Morita Y, Ohsawa Y, Saito H, Nagasawa T, Uchiyama Y, Kishimoto T. Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 15577-15582.
- Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha R A, Soussi-Gounni A, Zhang D H, Ray A, Hamid Q. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; (103): 215-222.
- Negele K, Heinrich J, Borte M, von B A, Schaaf B, Lehmann I, Wichmann H E, Bolte G. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; (15): 48-54.
- Nickel R, Lau S, Niggemann B, Gruber C, von M E, Illi S, Kulig M, Wahn U. Messages from the German Multicentre Allergy Study. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; (13 Suppl 15): 7-10.
- Nio D A, Moylan R N, Roche J K. Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol* 1993; (150): 5281-5288.
- Nowak D, Heinrich J, Jorres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, Boczor S, Claussen M, Wichmann H E, Magnussen H. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur Respir J* 1996; (9): 2541-2552.
- Ouyang W, Ranganath S H, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy T L, Sha W C, Murphy K M. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998; (9): 745-755.
- Pereira-Santos M C, Baptista A P, Melo A, Alves R R, Soares R S, Pedro E, Pereira-Barbosa M, Victorino R M, Sousa A E. Expansion of circulating Foxp3(+)CD25(bright) CD4(+) T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2007; (38) 2: 291-7

- Perussia B, London L, Trinchieri G. Phenotypic characteristics of human natural killer cells. *Biomed Pharmacother* 1985; (39): 13-18.
- Pillemer B B, Xu H, Oriss T B, Qi Z, Ray A. Deficient SOCS3 expression in CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells and SOCS3-mediated suppression of Treg function. *Eur J Immunol* 2007; (37): 2082-2089.
- Pozo D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 2004; (18): 1325-1334.
- Radon K, Ehrenstein V, Praml G, Nowak D. Childhood visits to animal buildings and atopic diseases in adulthood: an age-dependent relationship. *Am J Ind Med* 2004; (46): 349-356.
- Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol* 1993; (151): 2484-2496.
- Reiner S L. Helper T cell differentiation, inside and out. *Curr Opin Immunol* 2001; (13): 351-355.
- Rengarajan J, Szabo S J, Glimcher L H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; (21): 479-483.
- Rolandi E, Franceshini R, Cataldi A, Barreca T. Twenty-four-hour secretory pattern of vasoactive intestinal polypeptide in the elderly. *Gerontology* 1990; (36): 356-360.
- Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, von B A, Wichmann H E, Heinrich J. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 2007; (85): 530-537.
- Sausenthaler S, Kompauer I, Borte M, Herbarth O, Schaaf B, Berg A, Zutavern A, Heinrich J. Margarine and butter consumption, eczema and allergic sensitization in children. The LISA birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; (17): 85-93.
- Schor E L. Family pediatrics: report of the Task Force on the Family. *Pediatrics* 2003; (111): 1541-1571.
- Seki Y, Hayashi K, Matsumoto A, Seki N, Tsukada J, Ransom J, Naka T, Kishimoto T, Yoshimura A, Kubo M. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; (99): 13003-13008.
- Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, Komine O, Hamano S, Himeno K, Inagaki-Ohara K, Cacalano N, O'Garra A, Oshida T, Saito H, Johnston J A, Yoshimura A, Kubo M. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med* 2003; (9): 1047-1054.
- Shier P, Hofstra C L, Ma X J, Wu Y, Ngo K, Fung-Leung W P. Tbt-1, a new T-box transcription factor induced in activated Th1 and CD8+ T cells. *Immunogenetics* 2000; (51): 771-778.
- Slattery M J, Klein D F, Mannuzza S, Moulton J L, III, Pine D S, Klein R G. Relationship between separation anxiety disorder, parental panic disorder, and atopic disorders in

- children: a controlled high-risk study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002; (41): 947-954.
- Song M M, Shuai K. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 1998; (273): 35056-35062.
- Spiegl U. Einfluss von Sozial- und Lebensstilfaktoren auf die T-Zell-Funktion im zweiten Lebensjahr. 2003. Medizinische Dissertation, Universität Leipzig.
- Starr R, Metcalf D, Elefanti A G, Brysha M, Willson T A, Nicola N A, Hilton D J, Alexander W S. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 14395-14399.
- Starr R, Willson T A, Viney E M, Murray L J, Rayner J R, Jenkins B J, Gonda T J, Alexander W S, Metcalf D, Nicola N A, Hilton D J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; (387): 917-921.
- Strachan D P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; (299): 1259-1260.
- Szabo S J, Kim S T, Costa G L, Zhang X, Fathman C G, Glimcher L H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; (100): 655-669.
- Szabo S J, Sullivan B M, Stemmann C, Satoskar A R, Sleckman B P, Glimcher L H. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; (295): 338-342.
- Umemoto N, Kakurai M, Okazaki H, Kiyosawa T, Demitsu T, Nakagawa H. Serum levels of vasoactive intestinal peptide are elevated in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2003; (31): 161-164.
- Umetsu D T, Akbari O, DeKruyff R H. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; (112): 480-487.
- von Mutius E, Fritzsche C, Weiland S K, Roll G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 1992; (305): 1395-1399.
- von Mutius E, Martinez F D, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann H H. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; (149): 358-364.
- von Mutius E, Weiland S K, Fritzsche C, Duhme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 1998; (351): 862-866.
- Walker M R, Kasprlowicz D J, Gersuk V H, Benard A, Van L M, Buckner J H, Ziegler S F. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin Invest* 2003; (112): 1437-1443.
- Weber A. Einfluss von Stress und sozialen Faktoren auf die Immunreaktivität sechsjähriger Kinder. 2008. Medizinische Dissertation, Universität Leipzig.

- Wichmann H E. Possible explanation for the different trends of asthma and allergy in East and West Germany. *Clin Exp Allergy* 1996; (26): 621-623.
- Wilson S B, Delovitch T L. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; (3): 211-222.
- Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; (28): 205-220.
- Yu C R, Mahdi R M, Ebong S, Vistica B P, Gery I, Egwuagu C E. Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells. *J Biol Chem* 2003; (278): 29752-29759.
- Zhang D H, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997; (272): 21597-21603.
- Zhang D H, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 1999; (11): 473-482.
- Zheng W, Flavell R A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; (89): 587-596.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung der Arbeit und die vielen wertvollen Diskussionen und hilfreichen experimentellen Ratschläge / Anregungen danke ich recht herzlich Frau Dr. Irina Lehmann und Herrn Prof. Dr. Frank Emmrich.

Herrn Dr. Thomas Giese danke ich für das Erlernen einer etablierten Methode für die mRNA-Präparation während meines Aufenthaltes in Heidelberg.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor spreche ich Frau Alexandra Renkert meinen Dank aus.

Dr. Gunda Herberth danke ich für ihre stete Diskussions-, und Hilfsbereitschaft. Ihre humorvolle, freundliche und lebensfrohe Art wird mir in bester Erinnerung bleiben. Auch ihre Sportbegeisterung und die gemeinsamen „Lauf-Einheiten“ werden unvergessen bleiben.

Mit Gundula Fischäder, Carmen Röder-Stolinski und Beate Tammer wurde neben der Pipette auch der eine oder andere Lachmuskel strapaziert. Ich danke Euch für tröstende Worte und offene Ohren!

Bei allen Mitgliedern des Departments Umweltimmunologie möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken; z. B. allen Medizindoktoranden sei gedankt für die Beantwortung meiner vielen Fragen, vielen Mitarbeitern danke ich für Tipps in Computerfragen.

Meinem Ehemann Enrico Dägelmann und wundervollen Söhnen Paul und Karl danke ich für ihre Liebe, die mich so glücklich macht.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich ganz besonders für die Unterstützung bei der Betreuung von Paul und Karl, sowie ihre Hilfe bei allen meinen Vorhaben.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 29.01.2008

Clarissa Dägelmann

Lebenslauf

Name:	Clarissa Dägelmann (geb. Weiß)
Geburtsdatum/-ort:	20.01.1979, Leipzig
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	Paul, geb. 24.07.2005 Karl, geb. 09.05.2008
Schulbildung	
1985 – 1992	Polytechnische Oberschule in Leipzig
1992 – 1997	Uhlandgymnasium in Leipzig
	Abschluss: Abitur
Studium	
1997 – 2003	Studium der Biowissenschaften (Hauptstudienfach Mikrobiologie, Nebenfächer: Genetik und Immunologie), Universität Jena
1999 – 2000	Auslandsaufenthalt, Studium der Biowissenschaften, Universität Bath (UK)
2002 – 2003	Diplomarbeit im Department Umweltimmunologie am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ Thema: „Untersuchungen zur Immuntoxizität/Immunmodulation von Oberflächenwasser aus der Saale“ Abschluss: Diplom-Biologin
Promotion	
2003-2007	Anfertigung einer Promotionsarbeit im Department Umweltimmunologie am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ in Kooperation mit dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig
07/05-09/06	Elternzeit
seit 05/08	Elternzeit

Anlage

Die LISAplus-Studiengruppe vereint folgende Partner:

Institut für Epidemiologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg (Wichmann HE, Heinrich J, Bolte G, Belcredi P, Jacob B, Schoetzau A, Mosetter M, Schindler J, Höhnke A, Franke K, Laubereau B, Sausenthaler S, Thaqi A, Zirngibl A, Zutavern A.); Universitätskinderklinik Leipzig (Borte M, Schulz R, Sierig G, Mirow K, Gebauer C, Schulze B,); Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Städtisches Klinikum „St. Georg“ Leipzig (Borte M, Diez U, Straub S); Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Leipzig (Sack U, Lehmann I); Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Marien-Hospital, Wesel (von Berg A, Scholten C, Bollrath C, Groß I, Möllemann M); Bad Honnef (Schaaf B.), Department Expositionsforschung und Epidemiologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ (Herbarth O, Bauer M, Franck U, Gräbsch C, Müller A, Rehwagen M, Richter M, Röder S, Rolle-Kampczyk U, Schlink U, Albrecht S, Jorks A); Department Umweltimmunologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ (Lehmann I, Herberth G, Daegelman C); Ludwig-Maximilians-Universität München, Dr von Haunersches Kinderspital, Abteilung für Infektionskrankheiten und Immunologie (Weiss M, Albert M); Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Klinische Immunologie (Fahlbusch B), Institut für Arbeits-, Sozial-Umweltmedizin und Hygiene (Bischof W, Koch A); Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF), Düsseldorf (Krämer U, Link E, Ranft U, Schins R, Sigiri D); Kinderklinik der Technischen Universität München (Bauer CP, Brockow I, Grübl A); Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, KKG Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM, ZAUM der Technischen Universität München (Ring J, Grosch J, Darsow, Weidinger S); Zentrum für Allergie und Umwelt der Technischen Universität München (Behrendt H, Kasche A, Buters J, Traidl-Hoffmann C); Arbeitsgruppe Pädiatrische Immunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dr von Haunersches Kinderspital (Krauss-Etschmann S); Institut für Sozialmedizin, Universität Lübeck (Schäfer T).

Auszüge dieser Arbeit wurden in folgenden Fachartikeln veröffentlicht bzw. auf folgenden Konferenzen vorgestellt:

Originalarbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem

Daegelman C, Herberth G, Röder S, Herbarth O, Giese T, Krämer U, Behrendt H, Borte M, Heinrich J, Emmrich F, Lehmann I.; for the LISApplus study group. Association between suppressors of cytokine signalling, T-helper type 1/ T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children. Clin Exp Allergy 2007; (38): 438-448

Herberth G, Daegelman C, Weber A, Röder S, Giese T, Krämer U, Schins R P, Behrendt H, Borte M, Lehmann I. Association of neuropeptides with Th1/Th2 balance and allergic sensitization in children. Clin Exp Allergy 2006; (36): 1408-1416.

Publizierte Kongressbeiträge

Dägelmann C, Herberth G, Röder S, Herbarth O, Giese T, Krämer U, Behrendt H, Borte M, Lehmann I. Association between SOCS1 and SOCS3 expression, T-cell regulation and development of allergic manifestations in children. Allergy 2007; 62 (Supplement 83), 461-462.

Herberth G, Daegelman C, Weber A, Röder S, Giese T, Krämer U, Schins R P, Behrendt H, Borte M, Lehmann I. Association between neuropeptides, Th1/Th2 polarization and allergy risk in children. Cell Proliferation 2006; (39) 5: 365.

Poster / Vorträge

Dägelmann C, Herberth G, Röder S, Herbarth O, Giese T, Krämer U, Behrendt H, Borte M, Lehmann I. Association between SOCS1 and SOCS3 expression, T-cell regulation and development of allergic manifestations in children. XXVI EAACI Congress 2007, June 9-13, Göteborg, Sweden

Herberth G, Daegelman C, Röder S, Weber A, Schins R P, Krämer U, Borte M, Lehmann I. Impact of neuropeptides on modulation of Th1/ Th2 balance and allergenic sensitization. XXV EAACI Congress 2006, June 10 – 14, Wien, Austria

Herberth G, Daegelman C, Weber A, Röder S, Giese T, Schins R P, Krämer U, Behrendt H, Borte M, Lehmann I. Association between neuropeptides, Th1/Th2 polarization and allergy risk in children. XXVI DGFI Congress 2006, Sept. 6 – 9, Paris, France

Dägelmann C. Vortrag: Stress macht krank – Analysen zeigen warum. 3.UFZ-Doktoranden-Konferenz 2007, Mai 15-16, Leipzig, Deutschland

Helmholtz-Zentrum
für Umweltforschung GmbH – UFZ
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Internet: www.ufz.de

