

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. Steffen Emmert

**Bestimmung des antigenspezifischen T-Zellprofils  
im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie  
durch Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen  
direkt und ex-vivo**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Samira Saleh geb. am 10.05.1993 in Duisburg

aus Kiel

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00003058](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003058)

Rostock, 27.03.2020



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Emmert

(Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Margitta Worm

(Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin)

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller Hilke

(Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock)

Datum der Einreichung: 27.03.2020

Datum der Verteidigung: 04.05.2021

**Gewidmet meiner lieben Familie und  
meinem Freund Jannik Ifland**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Wespengiftallergie.....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Symptome.....	1
1.1.3 Diagnostik .....	2
1.1.4 Therapie.....	4
1.1.5 Spezifische Immuntherapie (SIT) .....	4
1.1.5.1 Therapieschema der SIT.....	5
1.1.5.2 Indikationen und Kontraindikationen .....	7
1.1.5.3 Nebenwirkungen .....	8
1.1.5.4 Therapieerfolg- und versagen.....	9
1.2 Immunologische Mechanismen der Typ I Allergie.....	10
1.3 T-Zell-Differenzierung .....	11
1.4 Immunologische Mechanismen der SIT .....	14
2 Fragestellung.....	16
3 Material .....	17
3.1 Klinikmaterialien .....	17
3.2 Antikörper.....	18
3.3 Chemikalien und Reagenzien .....	18
3.4 Puffer und Lösungen .....	19
3.5 Verbrauchsmaterialien.....	20
3.6 Laborgeräte.....	20
3.7 Software.....	21

4	Methoden .....	21
4.1	Patientenkollektiv .....	21
4.2	Etablierung der Messungen .....	22
4.3	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut .....	26
4.4	Zellzahlbestimmung .....	27
4.5	Zellkultur und Stimulation.....	27
4.6	Antigenspezifische T-Zell-Anreicherung .....	29
	(ARTE: Antigen-reactive T cell enrichment).....	30
4.6.1	Magnetische Markierung antigenspezifischer T-Zellen.....	30
4.6.2	Magnetische Separierung antigenspezifischer T-Zellen in Kombination mit Oberflächen- und Intrazellulärfärbung.....	31
4.7	Durchflusszytometrie.....	34
4.8	Gating Strategie .....	35
4.9	Auswertung.....	36
4.10	Statistische Auswertung .....	37
5	Ergebnisse .....	39
5.1	Antigenspezifische T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie .....	39
5.2	Antigenspezifische Gedächtniszellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie ... .....	42
5.3	Antigenspezifische IL-2 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift- Immuntherapie.....	46
5.4	Antigenspezifische T <sub>H</sub> 2-Antwort im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie .....	48
5.4.1	IL-4 produzierende T <sub>H</sub> 2-Zellen .....	48
5.4.2	IL-5 produzierende T <sub>H</sub> 2-Zellen .....	51
5.4.3	IL-9 produzierende T <sub>H</sub> 2-Zellen .....	53
5.4.4	IL-13 produzierende T <sub>H</sub> 2-Zellen .....	55
5.5	Antigenspezifische IL-10 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift- Immuntherapie.....	57

5.6	Antigenspezifische IFN- $\gamma^+$ T <sub>H</sub> 1-Antwort im Verlauf einer Wespengift- Immuntherapie.....	60
5.7	Antigenspezifische Ki-67 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift- Immuntherapie.....	62
5.8	Korrelation zwischen Klinik und Messergebnissen .....	64
6	Diskussion.....	67
6.1	Diskussion des ARTE-Protokolls zur Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen..... .....	68
6.2	Veränderungen der wespengiftspezifischen T-Zellfrequenz im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie .....	69
6.3	Die Entwicklung des wespengiftspezifischen T-Zellprofils im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie .....	71
6.3.1	Die Entwicklung der wespengiftspezifischen T <sub>H</sub> 1 und T <sub>H</sub> 2 Antwort .....	71
6.3.2	Die Entwicklung wespengiftspezifischer Gedächtniszellen.....	75
6.3.3	Die Entwicklung wespengiftspezifischer IL-10 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	76
6.4	Diskussion des immunologischen Mechanismus einer Wespengift-Immuntherapie	78
6.5	Ausblick.....	80
7	Zusammenfassung.....	82
8	Summary .....	84
9	Literaturverzeichnis .....	85
10	Anhang.....	101
11	Thesen .....	103
12	Eidesstattliche Versicherung .....	105
13	Vorträge und Posterpräsentationen .....	105
14	Lebenslauf.....	106
15	Danksagungen.....	109

## Abkürzungsverzeichnis

AB Serum	Serum der human Blutgruppe AB
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ARTE	Antigen-reactive T cell enrichment (antigenspezifische T-Zell-Anreicherung)
BE	Blutentnahme
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
CD14	Cluster of differentiation 14
CD20	Cluster of differentiation 20
CD40	Cluster of differentiation 40
CD45-RO	Cluster of differentiation 45-RO
EACCI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSC	Vorwärtsstreulicht
HSA Lösung	Humanserumalbumin-Lösung
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL5	Interleukin 5
IL-9	Interleukin 9
IL-10	Interleukin 10
IL-13	Interleukin 13
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ki-67	Proliferationsmarker Ki-67
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
PBMC	Periphral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PEB Puffer	PBS + EDTA + BSA Puffer
$\rho$	Dichte in g/ ml
RPMI 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

SCC	Seitwärtsstreulicht
SIT	Spezifische Immuntherapie
SCIT	Subkutane Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
STAT 1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT 4	Signal transducer and activator of transcription 4
STAT 6	Signal transducer and activator of transcription 6
T-bet	Transkriptionsfaktor bet
TCR	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
T <sub>H</sub> 1	T-Helfer-Zelle 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helfer-Zelle 2
TGF-β	Transforming growth factor beta

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Chronologische Darstellung der Untersuchungsmesspunkte von Messreihe 1 .	22
Abbildung 2. Schema der Blutentnahmen; Untersuchungsmesspunkte der Messreihe 2 .....	25
Abbildung 3. Magnetische Markierung und Separierung antigenspezifischer (CD154 <sup>+</sup> ) T-Zellen unter Anwendung des ARTE Protokolls, inspiriert von (Miltenyi Biotec® 2019). ....	29
Abbildung 4. Darstellung der Gating-Strategie zur Bestimmung antigenspezifischer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach magnetischer Anreicherung CD154 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	35
Abbildung 5. Kurvendiagramm der Frequenz von wespengiftspezifischen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der Einleitungsphase einer Wespengift-Immuntherapie.....	40
Abbildung 6. Streudiagramm der Frequenz von CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	41
Abbildung 7. FACS Bilder der wespengiftspezifischen Gedächtniszellen.....	42
Abbildung 8. Streudiagramm der Frequenz der CD45-RO <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	43
Abbildung 9. Streudiagramm des prozentualen Anteils an CD45-RO <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	44
Abbildung 10. Streudiagramm der IL-4 und IL-10 Sekretion von antigenspezifischen Gedächtniszellen. ....	45
Abbildung 11. Streudiagramm der IFN-γ und IL-10 Sekretion von antigenspezifischen Gedächtniszellen. ....	46
Abbildung 12. FACS Bilder der IL-2 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	47
Abbildung 13. Streudiagramm der Frequenz der IL-2 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	47



Abbildung 14. Streudiagramm des prozentualen Anteils an IL-2 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	48
Abbildung 15. FACS Bilder der IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	48
Abbildung 16. Streudiagramm der Frequenz der IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	50
Abbildung 17. Streudiagramm des prozentualen Anteils an IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	50
Abbildung 18. FACS Bilder von IL-5 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	51
Abbildung 19. Streudiagramm der Frequenz der IL-5 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	52
Abbildung 20. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	52
Abbildung 21. FACS Bilder der IL-9 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	53
Abbildung 22. Streudiagramm der Frequenz IL-9 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	54
Abbildung 23. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-9 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	54
Abbildung 24. FACS Bilder der IL-13 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	55
Abbildung 25. Streudiagramm der Frequenz IL-13 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	56
Abbildung 26. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-13 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	56
Abbildung 27. FACS Bilder der IL-10 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	57
Abbildung 28. Streudiagramm der Frequenz IL-10 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	58
Abbildung 29. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-10 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	59
Abbildung 30. FACS-Bilder eines Wespengiftallergikers mit hoher IL-10 Aktivität. ....	60
Abbildung 31. FACS Bilder der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	61
Abbildung 32. Streudiagramm der Frequenz IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	61
Abbildung 33. Streudiagramm des prozentualen Anteils IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	62
Abbildung 34. FACS Bilder der Ki-67 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	63
Abbildung 35. Streudiagramm Frequenz Ki-67 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	63
Abbildung 36. Streudiagramm des prozentualen Anteils Ki-67 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen. ....	64
Abbildung 37. Streudiagramm der Frequenz IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Wespengiftallergiker. ....	65
Abbildung 38. Streudiagramm der Frequenz IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	

in Abhängigkeit vom Geschlecht der Wespengiftallergiker. ....	65
Abbildung 39. Streudiagramm der Frequenz IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen bei Wespengiftallergikern, die gleichzeitig an Asthma oder allergische Rhinitis litten. ....	66
Abbildung 40. Streudiagramm der Frequenz IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie (BE1/BE2/BE3/BE4) in Abhängigkeit vom anamnestisch erhobenen Müller-Grad.....	66

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Klassifikation anaphylaktischer Reaktionen nach Ring und Meßmer .....	2
Tabelle 2: Therapieschema der Ultra-Rush-Desensibilisierung.....	6
Tabelle 3: Herkunft und Wirkung der verwendeten Zytokine .....	14
Tabelle 4: Verwendete Klinikmaterialien .....	17
Tabelle 5: Verwendete Antikörper .....	18
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	18
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	20
Tabelle 9: Verwendete Laborgeräte .....	20
Tabelle 10: Verwendete Software .....	21
Tabelle 11: Oberflächenfärbung der Messreihen 1 und 2 .....	23
Tabelle 12: Intrazellulärfärbung der Messreihe 1 .....	24
Tabelle 13: Intrazellulärfärbung der Messreihe 2 .....	25
Tabelle 14: Herstellung der Färbelösung .....	30
Tabelle 15: Herstellung der Oberflächenfärbung.....	31
Tabelle 16: Herstellung der Oberflächenfärbung von Messreihe 1 .....	32
Tabelle 17: Herstellung der Intrazellulärfärbung von Messreihe 2.....	33
Tabelle 18: Auswertung der Messungen der Durchflusszytometrie .....	37

# **1 Einleitung**

## **1.1 Wespengiftallergie**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Insektengiftallergien gehören neben Nahrungsmittel- und Medikamentenallergien zu den Hauptverursachern von schweren anaphylaktischen Reaktionen in Deutschland (Worm et al. 2014). Ca. 1,2 – 3,5% der Allgemeinbevölkerung reagieren auf einen Hymenopterenstich systemisch (Hymenoptera: Ordnung der Hautflügler, zu denen Wespen gehören), wodurch jährlich bis zu 20 Todesfälle als Folge eines Stichereignisses zu verzeichnen sind. Wahrscheinlich liegt die Rate sogar höher, da nicht alle Todesfälle als Folge eines Wespenstiches erkannt werden. Mit einer gesteigerten lokalen Reaktion reagieren schätzungsweise 2,4 – 26,4% der Bevölkerung, was durch eine Sensibilisierungsrate von 25 % der Bevölkerung (bei Kindern 50 %) auf Hymenoptergift vereinbar ist (Schäfer 2009; Przybilla et al. 2011).

### **1.1.2 Symptome**

Eine allergische Reaktion auf einen Wespenstich kann in eine lokale und eine systemische Reaktion unterteilt werden. Während eine örtliche Reaktion von bis zu 10 cm Durchmesser noch eine normale Reaktion auf das Wespengift darstellt, werden Hautreaktionen, die länger als 24 Stunden andauern und größer als 10 cm sind, den gesteigerten örtlichen Reaktionen zugeordnet (Przybilla et al. 2011). Systemische Reaktionen stehen nicht im Zusammenhang mit dem örtlichen Stichereignis und können in verschiedene Schweregrade eingeteilt werden, wobei die Einleitung nach Müller (Müller 1966) und eine modifizierte Einteilung nach Ringer und Messmer die bekannteste und am häufigsten verwendete Schweregradeinteilungen darstellt (Ring/Meßmer 1977; Przybilla et al. 2011). Demnach werden anaphylaktische Reaktionen der Haut und Schleimhäute, des Gastrointestinaltrakts, sowie des Respirationstrakts und des Herz-Kreislaufsystems abhängig von ihrer Schwere in vier Grade eingeteilt (Tabelle 1), wobei Reaktionen der Haut und Schleimhäuten die häufigsten anaphylaktischen Reaktionen darstellen. Da schwere Reaktionen des Respirationstrakts (Atemstillstand) oder des Herz-Kreislauf-Systems (Schock, Kreislaufstillstand) auch unmittelbar auftreten können, ohne dass

sie von leichteren Reaktionen angekündigt werden, können anaphylaktische Reaktion einen sehr schnell einen letalen Ausgang einnehmen (ebd.).

Tabelle 1. *Klassifikation anaphylaktischer Reaktionen nach Ring und Meßmer (modifiziert nach Ring et al. 2014).*

<b>Grad</b>	<b>Haut/ Schleimhäute</b>	<b>Gastro- intestinaltrakt</b>	<b>Respirations- trakt</b>	<b>Herz- Kreislaufsystem</b>
<b>I</b>	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	-	-	-
<b>II</b>	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	Nausea, Krämpfe, Erbrechen	Rhinorrhoe, Heiserkeit, Dyspnoe	Tachykardie (Anstieg > 20/ min) Hypotension (Abfall > 20 mmHg systolisch) Arrhythmie Schock
<b>III</b>	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	Erbrechen, Defäkation	Larynxödem, Bronchospasmus, Zyanose	
<b>IV</b>	Juckreiz, Flush, Urtikaria, Angioödem	Erbrechen, Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

### 1.1.3 Diagnostik

Die Diagnosestellung einer Wespengiftallergie erfolgte nach aktuellen Leitlinien (ebd.): der Anamnese, dem Hauttest und dem In-vitro-Test. In der Anamnese werden Informationen zum Stichereignis, dem stechenden Insekt und den auftretenden Symptomen erhoben, die einem Schweregrad nach Ring und Meßmer (s.o.) zugeteilt werden, wobei das symptomatisch schwerste Symptom den Grad bestimmt. Zudem sind Faktoren zu ermitteln, die ein erhöhtes Risiko für schwer verlaufende anaphylaktische Reaktionen darstellen, wie ein hohes Lebensalter, Herz-Kreislaufkrankungen, ein schlecht eingestelltes Asthma bronchiale, Mastozytose, hohe basale Serumtryptase oder Medikamenteneinnahmen ( $\beta$ -Blocker, ACE-Hemmer) (ebd.; Ruëff et al. 2009; Brockow et al. 2008; Guenova et al. 2010; Przybilla et al. 2011). Eine erhöhte Wespenexposition wie sie zum Beispiel Imker, Bäcker oder Gärtner haben,

ist ebenfalls von Bedeutung, wenn es darum geht die Indikation für eine langjährigen Therapie zu stellen (Przybilla et al. 2011).

Im Anschluss an die Anamneseerhebung erfolgen allergologische Tests wie Hauttests und die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper im Serum (ebd.).

Der Hauttest kann in Form eines Prick-Tests oder eines Intrakutan-Tests erfolgen, wobei das Wespengiftallergen in steigender Konzentration (Prick-Test: 1,0/ 10/ 100 und ggf. 300 µg/ml; Intradermal-Test: 0,001/ 0,01/ 0,1/ 1,0 µg/ml) entweder mit einer Lanzette in die obersten Hautschichten eingebracht (Prick-Test) oder direkt intradermal gespritzt wird. Um schweren allergischen Reaktionen sofort entgegenwirken zu können, wird empfohlen, die Hauttests insbesondere bei Patienten mit schweren Stichereignissen in der Anamnese bei liegendem intravenösen Zugang durchzuführen (ebd.). Zudem sollten Medikamente, die Einfluss auf das Testergebnis haben und dieses womöglich verfälschen – wie z. B. Antihistaminika – vor dem Test abgesetzt werden (Ruëff et al. 2010).

Ein Testergebnis ist positiv zu werten, wenn sich nach 15 – 20 min eine mindestens 3 mm große Quaddel bildet (beim Intrakutantest: eine mindestens 5 mm große Quaddel) und gleichzeitig die Negativkontrolle (Kochsalzlösung) keinerlei Reaktion zeigt, während bei der Positivkontrolle (Histamindihydrochlorid) eine deutliche Reaktion zu sehen ist (ebd.).

Mit dem in-vitro Test werden wespengiftspezifische IgE-Antikörper im Serum gemessen, wobei eine Antikörperkonzentration ab  $\geq 0,35$  kU/l (CAP-Klasse 1) als positives Testergebnis zu werten ist (Przybilla et al. 2011). Sollten die Ergebnisse der genannten allergologischen Tests nicht mit der Anamnese übereinstimmen, können zudem Antikörper gegen das rekombinant hergestellte Wespengift-Hauptallergen - den Ves v5 - bestimmt und ein Basophilenaktivierungstest bzw. ein Leukotrien-Freisetzungstest durchgeführt werden, wobei diese Tests nicht zu den Standardtest in der Allergiediagnostik gehören (ebd.; Erdmann et al. 2004; Korosec et al. 2009; Renz et al. 2010). Eine Bestimmung der basalen Serumtryptasekonzentration ist insbesondere bei Fällen schwerer Stichereignissen von Bedeutung, da ein Zusammenhang zwischen hohen basalen Serumtryptase-Konzentrationen ( $\geq 95$ . Perzentile/  $\geq 11,4$  µg/l) und schweren anaphylaktischen Reaktionen, wie auch Mastozytose beobachtet wurde (Guenova et al. 2010; Haeberli et al. 2003; Ludolph-Hauser et al. 2001). Stichprovokationen werden zur Wespengiftallergiediagnostik nicht empfohlen, da eine schrittweise Steigerung der Allergendosis nicht möglich ist, sodass schwer beherrschbare anaphylaktische Reaktionen auftreten können (Przybilla et al. 2011).

#### 1.1.4 Therapie

Die Therapie der Wespengiftallergie beinhaltet zwei Säulen. Die symptomatische Therapie zur Akutbehandlung der anaphylaktischen Reaktion und die Spezifische Immuntherapie als kausale Behandlung

Unabhängig von diesen beiden Ansätzen werden prophylaktisch Verhaltensmaßnahmen (z. B. Verzicht auf Süßspeisen im Freien) empfohlen, um Gefährdungssituationen zu reduzieren und so Wespenstichen zu vermeiden (ebd.).

Während lokale Wespenstichreaktionen gut mit kühlenden Umschlägen, Glukokortikoidhaltigen Cremes und ggf. oralen Antihistaminika und Glukokortikoiden zu kontrollieren sind, ist die unverzügliche und ganzheitliche Behandlung von systemischen Stichreaktionen von lebensnotwendiger Dringlichkeit. Daher wird jedem Wespenstichallergiker mit systemischen Stichreaktionen in der Anamnese ein sogenanntes Notfallset verschrieben. Das wichtigste Medikament des Notfallsets ist ein intramuskulär anzuwendender Adrenalin-Autoinjektor, der durch Vasokonstriktion, Erniedrigung der Gefäßpermeabilität, Bronchodilatation und positive inotrope Wirkung am Herzen dem Pathomechanismus der Allergie entgegenwirkt (Ring et al. 2014). Weitere – oral einzunehmende – Medikamente des Notfallsets sind ein schnell wirkendes H1-blockierendes Antihistaminikum (wie Ceterizin oder Levoceterizin) und ein Glukokortikoid (100 mg Prednisolonäquivalenz bei Erwachsenen, bei Kindern gegebenenfalls als Suspension). Ist anamnestisch eine bronchokonstriktive Reaktion auf das Wespengift bekannt, so kann zusätzlich ein schnell wirkendes  $\beta_2$ -Symptomimetikum (wie Salbutamol oder Fenoterol) gegeben werden (Przybilla et al. 2011). Im weiteren Verlauf ist bei kardiovaskulären und pulmonalen Reaktionen die Sauerstoff- und Volumengabe indiziert, sodass über die Volumengabe der aus der Anaphylaxie resultierenden Hypovolämie entgegengewirkt werden kann (ebd.; Ring et al. 2014).

Der einzige kausal orientierte Therapieansatz der Wespengiftallergie ist derzeit die Spezifische Immuntherapie (nachfolgend SIT), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

#### 1.1.5 Spezifische Immuntherapie (SIT)

Im Jahr 1911 beschrieb Leonard Noon zum ersten Mal die bei Gräserpollenallergikern angewendete SIT, die seither stetig weiterentwickelt wurde (Durham/Nelson 2011). Mehrere Studien beschreiben die Wirksamkeit (Müller et al. 1979; Hunt et al. 1978) der seit 30 Jahren auch in der Behandlung von Wespengiftallergikern eingesetzten SIT (ebd.).

### 1.1.5.1 **Therapieschema der SIT**

Im Rahmen der Wespengift-Immuntherapie wird über einen Zeitraum von drei bis fünf Jahren – manchmal sogar lebenslänglich – das Wespengiftallergen in Form einer wässrigen Allergenzubereitung oder eines an ein Aluminiumhydroxid adsorbierten Depotpräparates subkutan in den Oberarm des Patienten injiziert (Przybilla et al. 2011; Kleine-Tebbe et al. 2009). Ein häufig verwendetes Wespengiftprodukt ist das in dieser Untersuchung verwendete Venomil® Wespe der Firma Bencard® Allergie. Das Therapeutikum besteht aus natürlichem Gift verschiedener Wespenspezies, die in Nordamerika und in Europa heimisch sind (*Vespula flavopilosa*, *Vespula germanica*, *Vespula maculifrons*, *Vespula pensylvanica*, *Vespula vulgaris*, *Vespula squamosal*), wodurch eine simultane Desensibilisierung gegen eine Reihe von Wespenspezies möglich ist (Banghard 2019, persönliche Mitteilung).

Die gängigste Therapie der Wespengift-Immuntherapie ist die Ultra-Rush-Desensibilisierung, die mit einer dreitägigen Steigerungsphase (Lee et al. 2006; Bencard 2005) im Rahmen eines Klinikaufenthalts beginnt, während der das Wespengiftallergen in steigender Konzentration verabreicht wird, bis eine Gesamtdosis von 340,54 µg Wespengift erreicht ist (Lee et al. 2006; Bencard 2005).

Tabelle 2. *Therapieschema der Ultra-Rush-Desensibilisierung nach Bencard® Allergie (ebd.)*

<b>Tag</b>	<b>Konzentration (µg/ml)</b>	<b>Injektionsvolumen (ml)</b>	<b>Injektionsgift (µg)</b>	<b>Injektionsintervall</b>
<b>1</b>	0,1	0,2	0,02	30 min
		0,4	0,04	30 min
		0,8	0,08	30 min
	1	0,2	0,2	30 min
		0,4	0,4	30 min
		0,8	0,8	30 min
	10	0,2	2	30 min
		0,4	4	30 min
		0,8	8	letzte Injektion des Tages
<b>2</b>	10	0,8	5	60 min
	100	0,2	20	60 min
		0,4	40	60 min
		0,8	80	letzte Injektion des Tages
<b>3</b>	100	0,8	80	60 min
		1,0	100	letzte Injektion des Tages

Auf die Steigerungsphase folgt die Erhaltungsphase, in der dem Patienten während eines Zeitraums von drei bis fünf Jahren in regelmäßigen Abständen eine gleichbleibende Menge von 100 µg Wespengift verabreicht wird. Die erste Erhaltungsdosis erhält der Patient eine Woche nach Ende der Steigerungsphase, die zweite Erhaltungsdosis zwei Wochen später und die dritte Erhaltungsdosis nach weiteren vier Wochen. Alle folgenden Erhaltungsdosen werden dann bis zum Ende der SIT in einem Abstand von vier bis sechs Wochen verabreicht (ebd.)



### 1.1.5.2 Indikation und Kontraindikation

Laut der aktuellen Empfehlung der EACCI besteht die Indikation für eine SIT, wenn anamnestisch auf einen Wespenstich mit einer Anaphylaxie des Schweregrades  $\geq$  II reagiert wurde, zusätzlich zu einem Schweregrad I weitere Risikofaktoren vorliegen, die eine Entwicklung von schwer beherrschbaren Anaphylaxie-Ereignissen begünstigen oder die Lebensqualität erheblich eingeschränkt wäre, sollte die Wespengiftallergie nicht therapiert werden (Bonifazi et al. 2005). Neben einer positiven Anamnese, muss zusätzlich eine Sensibilisierung auf das Wespengift (Hauttest, spezifische IgE-Antikörper) nachgewiesen werden, um die Indikation für eine SIT zu stellen (Przybilla et al. 2011).

Zu den Risikofaktoren, bei denen eine SIT schon bei einem Schweregrad I anzuraten ist, gehören unter anderem: kardiovaskuläre Vorerkrankungen, fortgeschrittenen Schäden am Respirationstrakt, erhöhte Serumtryptase (Ruëff et al. 2009), Mastozytose, wie auch körperliche und geistige Einschränkungen, welche die effiziente Selbsthilfe nicht ermöglichen (Przybilla et al. 2011). Während der Schwangerschaft sollte eine SIT in der Regel nicht begonnen, kann aber fortgesetzt werden, wenn diese vor dem Eintritt der Schwangerschaft begonnen und bis dahin gut vertragen wurde (ebd.; Demoly/Piette/Daures 2003).

Zu den Kontraindikationen der SIT während der Therapie gehören grippale Infekte, ein unzureichend eingestelltes Asthma bronchiale, vorausgegangene Impfungen gegen Infektionserreger und grundsätzlich aktive Neoplasien und Immunerkrankungen (Przybilla et al. 2011).

Trotz nicht einheitlicher Studienlage gehört die Einnahme von  $\beta$ -Blockern und ACE-Hemmern ebenfalls zu den relativen Kontraindikationen einer SIT, da sie das Auftreten schwerer Reaktionen während der SIT begünstigen können, weshalb sie mindestens eine Woche vor Beginn der Therapie abgesetzt bzw. umgestellt werden sollten (ebd.; Stumpf/Shehab/Patel 2006; Ruëff et al. 2009; Müller/ Haeberli 2005). Falls  $\beta$ -Blockern nicht abgesetzt werden können, sollte auf ein kardioselektives Präparat gewechselt werden und eine kontinuierliche Überwachung während der Steigerungsphase erfolgen (TenBrook et al. 2004; Müller/ Haeberli 2005).

Schlussendlich sollte aber bei jedem Patienten eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen, bevor die SIT begonnen wird. Dabei sollte beachtet werden, dass systemische Wespenstichreaktionen mit weiteren Sticheignissen an Schwere zunehmen können, während eine Spontanheilung nicht zu erwarten ist (Müller 1966).

### 1.1.5.3 Nebenwirkungen

Während der Steigerungsphase der SIT ist das Auftreten lokaler Reaktionen mit Rötung und Schwellung an der Injektionsstelle relativ häufig. Diese können durch symptomatische Behandlungsmaßnahmen wie Kühlung, Anwendung topischer Glukokortikoide oder systemische Antihistaminika gut therapiert werden (Pfaar et al. 2014; Brockow et al. 1997; Reimers/Hari/Müller 2000).

Das Auftreten schwerer systemischer Reaktionen ist hingegen relativ selten. In den überwiegenden Fällen sind die Reaktionen leicht bis mittelschwer (Pfaar et al. 2014; Mosbech/Müller 2000), gehen mit Allgemeinbeschwerden (Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Kopfschmerzen) einher und entwickeln sich ebenfalls wie die lokalen Reaktionen bevorzugt in der Steigerungsphase der SIT (Przybilla et al 2011). Da die meisten systemischen Reaktionen innerhalb der ersten 30 min nach der Wespengiftinjektion auftreten, sollte für diesen Zeitraum ein unverzügliches medizinisches Eingreifen erfolgen (Adrenalin intramuskulär, Infusionstherapie, O<sub>2</sub>) (Ring et al. 2014; Simons et al. 2013). Frühzeichen der systemischen Reaktion sind Brennen und Jucken von Handflächen, Fußsohlen und Genitalien, Harn- und Stuhl drang sowie Ptarmus und genereller Pruritus (Pfaar et al. 2014), wobei die Nebenwirkungen der SIT nach der World Allergy Organization (WAO) 2010 in fünf Schweregrade eingestuft werden können (Cox et al. 2010).

Es konnte zwar gezeigt werden, dass lokale Reaktionen nicht mit einem erhöhten Risiko systemischer Reaktionen einhergehen (Kelso 2004), dennoch gibt es Faktoren wie beispielsweise Mastzellerkrankungen (Rueff/Placzek/Przybilla 2006), eine erhöhte basale Serumtryptasekonzentration (Ruëff et al. 2009), Hyperthyreose, instabiles Asthma bronchiale, sowie Infekte und körperlicher oder psychischer Stress (Makatsori/ Calderon 2014; Kleine-Tebbe et al. 2009), die eine Entwicklung von schweren systemischen Reaktionen begünstigen und daher besonders berücksichtigt und bei Möglichkeit vermieden werden sollen (Kleine-Tebbe et al. 2009). Auch wenn das Entstehen systemischer Reaktionen nicht gänzlich vermieden werden kann, so kann die Prä- bzw. Begleitmedikation mit einem Antihistaminikum (Pfaar et al. 2014; Wedi 2011; Nielsen et al. 1996; Reimers/Hari/Müller 2000a; Brockow/Kiehn et al. 1997) oder dem Anti-IgE-Antikörper Omalizumab (Przybilla et al. 2011; Galera et al. 2009; Rerick/Ruëff/Przybilla 2008) eine Reduktion der Häufigkeit und der Schwere systemischer Reaktionen ermöglichen (Wedi 2011). In seltenen Fällen können trotz Begleitmedikation schwer beherrschbare Nebenwirkungen auftreten, die zu einem Therapieabbruch zwingen (Przybilla et al. 2011).

#### 1.1.5.4 Therapieerfolg und –versagen

Bei einer Wespengiftallergie liegt der Therapieerfolg der SIT mit 90 – 95 % (ebd.) sehr hoch und kann auch bei ursprünglichem Therapieversagen durch eine Steigerung der Erhaltungsdosis (auf 200 µg) in den meisten Fällen erreicht werden, wodurch die Lebensqualität wesentlich verbessert werden kann (Ruëff /Wenderoth/Przybilla 2001; Oude Elberink et al. 2009; Roesch et al. 2008). Da kein Laborparameter den Therapieerfolg sicher bestätigen kann, gibt es derzeit lediglich die Möglichkeit eine Reaktion auf ein Stichereignis (Stichprovokation oder Feldstich, sprich akzidentieller Wespenstich) zu beobachten. Eine standardisierte Durchführung der Stichprovokation zur Überprüfung des Therapieerfolgs kann in Einzelfällen erfolgen, wenn zum Beispiel die Gefährdung durch erneute Exposition besonders hoch ist, wobei diese dann 6 – 18 Monate nach Verabreichung der Erhaltungsdosis erfolgt (Rueff et al. 1996; Przybilla et al. 2011).

Liegen keinerlei Risikofaktoren vor, so kann eine SIT in der Regel beendet werden, wenn die Erhaltungstherapie für einen Zeitraum von 5 Jahren ohne das Auftreten von systemischen Nebenwirkungen durchgeführt wurde und ein Stich (Feldstich oder Stichprovokation) keine systemischen Reaktionen hervorgerufen hat (ebd.).

In besonderen Fällen wie z. B. bei einer erhöhten Wespenexposition oder einem besonders hohen Risiko für schwere Anaphylaxien sollte die SIT-Dauer individuell abgestimmt werden und gegebenenfalls über den empfohlenen Zeitraum hinaus fortgeführt werden. Im Falle einer Mastozytose oder anamnestisch erhobenem Herz-Kreislauf- bzw. Atemstillstand als Reaktionen auf einen Wespenstich wird sogar angeraten, die SIT lebenslang fortzuführen (ebd.).

Unabhängig vom Therapieverlauf sollte grundsätzlich jeder Patient auch nach Beendigung der Therapie das Notfallset bei sich tragen und Wespenstiche weitestgehend vermeiden. Weiterhin sollen regelmäßig Arztbesuche erfolgen, um die Haltbarkeit des Notfallsets zu überprüfen und Reaktionen auf möglich weitere Wespenstiche in Erfahrung zu bringen, sodass im Falle weiterer Stichreaktionen zügig mit der Diagnostik und der eventuellen Wiederaufnahme der SIT begonnen werden kann (ebd.).

## 1.2 Immunologische Mechanismen der Typ I Allergie

Unter dem Begriff der Allergie versteht man „eine verstärkte, spezifische Abwehrreaktion gegenüber an sich harmlosen Substanzen im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit“ (Klimek/ Vogelberg/ Werfel 2018). Nach der Einteilung von Coombs und Gell werden Überempfindlichkeitsreaktionen in vier Gruppen eingeteilt, wobei Allergien wie zum Beispiel die Wespengiftallergie dem Typ 1 und damit den IgE-vermittelten Soforttypreaktionen zugeordnet werden (Murphy/ Travers/ Walport 2014). **Allergien vom Soforttyp** zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei Allergenkontakt innerhalb von Sekunden eine tödliche allergische Reaktion hervorrufen können. Bevor es jedoch zu so einer anaphylaktischen Reaktion kommt, ist eine Sensibilisierung auf das Allergen mit einer damit einhergehenden IgE Produktion notwendig. Dies geschieht in der **Sensibilisierungsphase**. In dieser Sensibilisierungsphase entwickelt sich die B-Zelle zu einer Plasmazelle und produziert Antikörper, wofür sie die Unterstützung einer T-Helferzelle benötigt. Bedingung dafür ist, dass sowohl die B- als auch die T-Zelle zuvor von demselben Antigen aktiviert wurden. Während sich die naive T-Zelle zu einer  $T_H2$ -Zelle entwickelt, exprimiert die B-Zelle einen Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex, über den sie der T-Zelle Teile des Antigens präsentiert. Die T-Zelle bindet über ihren T-Zell-Rezeptor (nachfolgend TCR, T cell receptor) den Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex, woraufhin die B-Zelle das zu der TNF-Familie gehörende Oberflächenmolekül CD40 exprimiert. Über CD154 (CD40L) bindet die aktivierte T-Zelle CD40 und bewirkt dadurch das Exprimieren weiterer Kostimulatoren auf der B-Zelle, durch die das Wachstum und die Differenzierung der T-Zelle, aber auch die B-Zellproliferation weiter vorangetrieben werden. Im weiteren Verlauf bewirken die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 einen Isotyp-Klassenwechsel zu IgE (ebd.; Averbek et al. 2007).

Im Gegensatz zu den anderen Antikörperisotypen liegt IgE vor allem im Gewebe vor und ist dort über das Fc-Fragment des hoch affinen IgE-Rezeptors  $Fc\epsilon RI$  an Mastzellen und Basophile gebunden. Da eine einfache Antigenbindung nicht ausreicht, um eine Mastzellaktivierung zu bewirken, kommt es erst beim nächsten Allergenkontakt zu einer allergischen Reaktion. Dies geschieht in der **Effektorphase**, in der multivalente Antigene die Quervernetzung der IgE-Moleküle bewirken und dadurch die Degranulation der Mastzelle auslösen. Mastzellen enthalten in ihren Granula verschiedene Mediatoren (Heparin, Histamin, Chymasen, Trypsasen und Zytokine), die ihre Wirkung vielerorts entfalten. So erhöht sich im Magen-Darm-Trakt die Flüssigkeitssekretion und Peristaltik und begünstigt dadurch Erbrechen und Durchfall.

In den Atemwegen verringern sie den Atemwegsdurchmesser und erhöhen die Schleimsekretion, während im Gefäßsystem die Weitstellung und Durchlässigkeit von Gefäßen bewirkt wird. Da all diese Reaktionen wenige Sekunden nach der Mastzellaktivierung eintreten, werden sie auch als **Sofortreaktionen** bezeichnet. Es gibt jedoch auch Reaktionen, die sich erst innerhalb von Stunden nach der Mastzellaktivierung zeigen. Diese **Spätreaktionen** werden von z.B. Lipidmediatoren (Leukotriene) ausgelöst, die ebenfalls bei der Sofortreaktion von Mastzellen freigesetzt werden und die Anlockung von Eosinophilen und  $T_H2$ -Zellen bewirken. Innerhalb von 2–6 h nach Mastzellaktivierung entwickelt sich bei etwa 10–20% der Patienten mit Sofortreaktion eine Spätreaktion, bei der es zu einem Erythem, Ödem und einer Reaktion der glatten Muskulatur kommen kann, die sich nach ein bis zwei Tagen wieder zurückbilden (Murphy/Travers/ Walport 2014).

### 1.3 T-Zell-Differenzierung

Die Differenzierung einer naiven T-Zelle in eine T-Effektorzelle, auch Priming genannt, ist ein komplexer Prozess, für den drei Signale benötigt werden.

Da naive T-Zellen nicht wie die T-Effektorzellen ins periphere Gewebe einwandern können, pendeln naive T-Zellen zwischen Blut und lymphatisches Gewebe hin und her und warten darauf, dass eine Antigenpräsentierende Zelle (nachfolgend APZ) ihnen ihr spezifisches Antigen präsentiert. Das T-Zellrepertoire ermöglicht auf viele Antigene zu reagieren, führt aber zu einer sehr geringen Frequenz antigenspezifischer T-Zellen (Bacher/ Scheffold 2013a). Hinzu kommt, dass die Frequenz antigenspezifischer  $CD4^+$  T-Zellen um das zehnfache bis hundertfache geringer ist als die der  $CD8^+$  T-Zellen (Thiel/ Scheffold/ Radbruch 2004).

Trifft eine APZ im peripheren Gewebe auf ein Antigen, nimmt sie es auf, prozessiert es im MHC und wandert zurück ins lymphatische Gewebe, um es den naiven T-Zellen zu präsentieren. Die naive T-Zelle sucht nun jede der ihr begegnenden APZs nach ihrem spezifischen Peptid-MHC-Komplex ab und löst sich anschließend wieder, sollte der passende Peptid-MHC-Komplex nicht präsentiert worden sein. Da die Bindung zwischen dendritischer Zelle und naiver T-Zelle besonders stark ist, löst auch diese Untergruppe der APZs die meisten T-Zellantworten aus (Murphy/ Travers/ Walport 2014), weshalb sie im Folgenden anstelle der APZ genannt wird. Präsentiert eine dendritische Zelle den passenden Peptid-MHC Komplex, so wird das **Signal 1** des Primings eingeleitet. Die Bindung zwischen dem Peptid-MHC Komplex der dendritischen Zelle und dem TCR der T-Zelle verstärkt sich, wodurch die T-Zelle

aktiviert wird und innerhalb von fünf bis sieben Stunden CD40L (CD154), einen Marker für aktivierte antigenspezifische T-Zellen, exprimiert (Bacher et al 2013b; Murphy/ Travers/ Walport 2014).

Das **Signal 2** sichert das Überleben der T-Zelle und beinhaltet die Bindung des T-Zelloberflächenmoleküls CD28 an das dendritische-Oberflächenmolekül B7 (CD80/CD86). Diese Verbindung generiert eine verstärkte Produktion des Zytokins IL-2. IL-2 stellt einen Überlebensfaktor für die aktivierte T-Zellen dar, ohne den die T-Zelle anerg werden würde. So wie **Signal 2** die weitere T-Zellaktivierung sichert, trägt im Umkehrschluss das Fehlen von **Signal 2** - bei vorhandenem **Signal 1** - zur peripheren Toleranzentwicklung bei (ebd.).

Die eigentliche T-Zelldifferenzierung wird jedoch durch das **Signal 3** gesteuert und steht unter dem Einfluss vieler verschiedener Zytokine und Korezeptoren. Vier bis fünf Tage dauert es, bis aus einer aktivierten T-Zelle eine T-Effektorzelle wird, die ab diesem Stadium unabhängig von kostimulierenden Signalen wirken kann (ebd.).

Der T-Zellpool besteht aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Während sich CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen entwickeln, Virusfragmente über den Peptid-MHC-I-Komplex erkennen und ihre Zielzellen abtöten, können sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verschiedenen Effektorzellen differenzieren, die über Zytokine und membranständige Proteine ihre Wirkung an Peptid-MHC-II- Komplex tragenden Zellen entfalten. Zu welchen T-Effektorzellen sich naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren, bestimmen vor allem die Signale der dendritischen Zelle. Aber auch Korezeptoren, die Antigenpräsentation und die Affinität des TCR zum Peptid-MHC-Komplex haben Einfluss auf die Differenzierung einer T-Zelle. Während bei einer nur kurz andauernden Antigenstimulation ein starkes Stimulationssignal (hohe Antigenpräsentation und hohe Affinität des TCR zum Antigen) benötigt wird um eine T<sub>H</sub>2 Antwort zu generieren, wird eine T<sub>H</sub>1-Antwort bereits bei einem schwächeren Stimulationssignal hervorgerufen. Umgekehrt verhält es sich bei einer länger andauernden Antigenstimulation. Auf lange Sicht begünstigt ein moderat starkes Stimulationssignal die Differenzierung von T<sub>H</sub>2-Zellen, während die T<sub>H</sub>1 Differenzierung erst bei einem stärkeren Stimulationssignal (zum Beispiel durch Steigerung der Antigenpräsentation) generiert wird (Rogers/ Croft 1999).

Auch die bei **Signal 2** beteiligten Korezeptoren CD28, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) haben Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen. Während das auf der aktivierten T-Zelle lokalisierte Oberflächenmolekül CD28 die Differenzierung von T<sub>H</sub>2 Zellen induziert, verhalten sich die von den dendritischen Zellen exprimierten Oberflächenmoleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) antagonistisch zueinander. In der frühen Bindungsphase exprimiert die

dendritische Zelle das CD28-Bindungsmolekül B7.1 (CD80), welches die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1 Zellen einleitet. In der späten Bindungsphase exprimiert die dendritische Zelle dann B7.2 (CD86) und fördert damit die Differenzierung von T<sub>H</sub>2 Zellen (Farrar/Asnagli/Murphy 2002; Santana/Rosenstein 2003).

Zudem haben Faktoren wie das Alter oder Stress Einfluss auf den Phänotyp des Immunsystems. So wird zum Beispiel bei Kindern, Senioren oder in Stresssituationen die Entwicklung einer humoralen Immunantwort ungünstig beeinflusst, sodass virale Infekte vermehrt auftreten können (Marshall et al. 1998; Simon/Hollander/McMichael 2015). Auch die Entwicklung von Allergien wird durch ein Überwiegen der humoralen Immunantwort begünstigt. Eine zelluläre Immunantwort entwickelt sich hingegen bevorzugt in Anwesenheit entzündlicher Prozesse (Murphy/ Travers/ Walport 2014).

Die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1 Zellen wird vor allem durch die von dendritischen Zellen und Makrophagen produzierte Zytokine INF- $\gamma$  und IL-12 eingeleitet. Diese aktivieren über die Bindung von STAT1 und STAT4 den Transkriptionsfaktor T-bet und unterstützen so die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1 Zellen. Die T<sub>H</sub>1 Zellen wiederum sezernieren die Zytokine IL-2 und INF- $\gamma$  (Tabelle 3), aktivieren Makrophagen und unterstützen die IgG Produktion, wodurch sie die Funktion der zellulären Immunantwort einnehmen. Insbesondere bei Virusinfektionen, Befall von intrazellulären Parasiten oder aber auch bei der Elimination von Tumorzellen ist die T<sub>H</sub>1- Antwort die vorherrschende Immunantwort (ebd.; Santana/ Rosenstein 2003).

Die Differenzierung zu T<sub>H</sub>2 Zellen wird von den Zytokinen IL-4 eingeleitet. Über STAT 6 wird der Transkriptionsfaktor GATA3 aktiviert, der über die Aktivierung T<sub>H</sub>2-typischer Zytokingene die Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen bewirkt. Über die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 steuern T<sub>H</sub>2 Zellen die humorale Immunabwehr. Sie fördern die B-Zellreifung und damit die IgE-Produktion, aktivieren Eosinophile und stimulieren die Mastzelldegranulation. Gleichzeitig verhindern sie die Entwicklung von T<sub>H</sub>1 Zellen und unterbinden die Makrophagenaktivierung (Murphy/Travers/ Walport 2014; Santana/ Rosenstein 2003).

Eine weitere große Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (nachfolgend T<sub>reg</sub>), die über die Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  die Differenzierung von T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen verhindern (Bacher et al. 2014; Akdis/Akdis 2015; Bacher et al. 2016; Soyer et al. 2013), sodass Toleranz gegenüber Antigenen geschaffen und Entzündungsprozesse begrenzt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Herkunft und Wirkung der verwendeten Zytokine (Murphy/Travers/ Walport 2014)*

<b>Zytokin</b>	<b>Sezerniert von</b>	<b>Wirkung</b>
<b>IL-2</b>	Naive aktivierte T-Zellen	Proliferation von T-Zellen
<b>IL-4</b>	T <sub>H2</sub> Zellen	B-Zell-Aktivierung, Isotypwechsel zu IgE, Differenzierung zu T <sub>H2</sub> Zellen, Mastzellwachstum
<b>IL-5</b>	T <sub>H2</sub> Zellen	Wachstum und Differenzierung eosinophiler Zellen
<b>IL-9</b>	T <sub>H2</sub> Zellen	Stimulierung von T <sub>H2</sub> -Zellen und Mastzellenwachstum
<b>IL-10</b>	T <sub>H2</sub> Zellen, T <sub>reg</sub>	Hemmung der Makrophagenfunktion
<b>IL-13</b>	T <sub>H2</sub> Zellen	Wachstum und Differenzierung der B-Zellen, Hemmung der T <sub>H1</sub> Zellen
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	T <sub>H1</sub> Zellen	Hemmung der T <sub>H2</sub> -Zellen, Aktiviert Makrophagen, Erhöhung der Expression von MHC Klasse I Molekülen, Verstärkung der T <sub>H1</sub> -Aktivität

#### 1.4 Immunologische Mechanismen der SIT

Auch wenn sich die SIT mittlerweile als effiziente Therapie von Wespengiftallergien etabliert hat, sind die immunologischen Mechanismen dieser Therapie noch nicht vollständig verstanden. Dennoch weisen Beobachtungen während der SIT darauf hin, dass die immunologischen Effekte der SIT, wie zum Beispiel die Herabregulierung von Mastzellen und Basophilen, schon früh messbar sind (Rolland/ O'Hehir 1998; Akdis/Akdis 2015).

Auf der einen Seite wird die Aktivierung von blockierenden IgG-Antikörpern als Wirkmechanismus diskutiert, durch die eine IgE-vermittelte Degranulation von Mastzellen und Basophilen verhindert und die IgE-erleichterte Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen blockiert wird (Wachholz/Durham 2004; Reisinger et al. 2005; Eckl-Dorna et al. 2018). Andererseits wird vor allem – aufbauend auf dem Verständnis des Pathomechanismus von Allergien – das vorherrschende Zytokin-Milieu und die damit einhergehende Ausgangslage des T-Zellprofils als eine der wichtigsten Stellschrauben im Immunsystem thematisiert, die über die Entwicklung von Allergie oder Toleranz entscheiden. Insbesondere die wespengiftspezifische T<sub>H2</sub>-Antwort, über dessen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, das für die allergische Reaktion notwendige IgE generiert wird, stellt eine große Bedeutung für den



Pathomechanismus von Allergien dar. Deshalb werden Veränderungen des antigenspezifischen Zytokin-Milieus, auch als einer der wichtigsten Effekte der SIT betrachtet (Bacher/Scheffold 2018).

In den letzten Jahren konnten Untersuchungen der immunologischen Mechanismen der SIT zeigen, dass es als Folge der SIT zu einer Reduktion antigenspezifischer  $T_H2$ -Zellen kommt (Bellinghausen et al. 1997; Wambre/ James/ Kwok 2012a; Durham et al. 1996; Müller et al. 1998; Marcotte et al. 1998; Pène et al. 1998; Murphy 1993; Jutel et al. 1995; Chianget al. 2018; O'Brien et al. 1997; McHugh et al. 1995; Akdis et al. 1996). Der dahinterstehende immunologische Mechanismus ist jedoch noch unbekannt und daher aktuelles Thema der Forschung. Diskutiert wird unter anderem die Deletion oder Anergie von pathologischen  $T_H2$ -Zellen (Rolland/ O'Hehir 1998; Müller et al. 1998), sowie die immunologische Ignoranz (Bacher/Scheffold 2018) und die Toleranzinduktion durch IL-10 freisetzende regulatorische T-Zellen (Akdis/Akdis 2015; Akdis et al. 1998).

Während die meisten Studien eine abnehmenden  $T_H2$  Antwort im Verlauf der SIT beobachten konnten, wird das Verhalten der antigenspezifischen  $T_H1$ -Antwort noch kontrovers diskutiert. Einerseits existieren Studien, die einen Anstieg der antigenspezifischen  $T_H1$ -Antwort als Reaktion auf die SIT beobachten (Bellinghausen et al. 1997; Jutel et al. 1995; Varney et al. 1993; McHugh et al. 1995), wodurch der Erklärungsansatz entstand, die SIT würde einen Wechsel von einer  $T_H2$  zu einer  $T_H1$  dominierenden Antwort bewirken (Bellinghausen et al. 1997; Jutel et al. 1995; Secrist et al. 1993). Andererseits liegen aber auch Studien vor, die gar keine Änderungen (Marcotte et al. 1998; Murphy 1993; Chiang et al. 2018) oder sogar eine Abnahme der  $T_H1$  Antwort nachweisen konnten (Müller et al. 1998; O'Brien et al. 1997), sodass schlussfolgernd die Wirkung der SIT auf die antigenspezifische  $T_H1$  Antwort noch nicht abschließend geklärt ist.

Eine bereits seit mehreren Jahren verwendete Methode um antigenspezifische T-Zellen zu untersuchen ist die MHC-II-Peptid-Tetramer Technologie. Die biotechnologisch hergestellten Tetramere bestehen aus löslichen rekombinanten MHC-Molekülen und sind mit einem spezifischen Antigen-Peptid verbunden, über den sie ein T-Zell-Epitop mit hoher Affinität binden können (Macaubas et al. 2006; McMichael/ Kelleher 1999). Über die Kopplung des Tetramers mit einem Fluorochrom ist die Identifizierung und Charakterisierung der Epitop-spezifischen T-Zellantwort mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich (Bakker/ Schumacher 2005). Der tatsächliche Mechanismus der MHC-II-Peptid-Tetramer Methode beruht somit auf einem direkten Bindungsnachweis des T-Zell-Rezeptors an sein physiologisches Ziel, welches

von dem Fluorochrom-markierten Tetramer-Komplex simuliert wird und damit unabhängig vom funktionellen Zustand der T-Zelle ist. Neben dem Nachteil, dass mit dieser Untersuchungsmethode T-Zellen untersucht werden unabhängig davon, ob sie aktiviert sind oder nicht, besteht ein weiterer Nachteil darin, dass lediglich Epitop-spezifische T-Zellen untersucht werden, die gegen das MHC-II-Peptid-Tetramer gerichtet sind. Wespengiftspezifische T-Zellen, die gegen Epitope gerichtet sind, die von dem MHC-II-Peptid-Tetramer nicht abgebildet werden, werden somit nicht untersucht. Daher ist es von enormer Wichtigkeit, dass für die Erforschung der immunologischen Mechanismen einer SIT Untersuchungsmethoden angewendet werden, mit denen antigenspezifische T-Zellen sowohl mit hoher Sensitivität als auch mit hoher Spezifität ex-vivo untersucht und charakterisiert werden können.

## 2 Fragestellung

Welchen Einfluss hat eine Wespengift-Immuntherapie auf das wespengiftspezifische T-Zellprofil eines Wespengiftallergikers und sind im Verlauf der Wespengift-Immuntherapie Veränderungen des wespengiftspezifischen T-Zellprofils messbar?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde in dieser Forschungsuntersuchung das wespengiftspezifische T-Zellprofil von 25 Wespengiftallergikern im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie unter Verwendung des neuartigen antigenspezifischen T-Zell-Anreicherungsprotokolls (*ARTE: Antigen-reaktive T cell enrichment*) charakterisiert. Die **Nullhypothese** dieser Forschungsuntersuchung lautete: „Eine Wespengift-Immuntherapie hat keinen Einfluss auf das antigenspezifische T-Zellprofil eines Wespengiftallergiker“. Sie würde als bestätigt gelten, wenn im Verlauf der SIT keine Änderungen des wespengiftspezifischen T-Zellprofils gemessen werden konnten. Wären jedoch signifikante Änderungen messbar, so sollte die Nullhypothese unter Annahme des Signifikanzniveaus  $\alpha = 0,5$  verworfen werden und stattdessen die **Alternativhypothese** „eine Wespengift-Immuntherapie moduliert das wespengiftspezifische T-Zellprofil von Wespengiftallergikern“ angenommen werden.

Anknüpfend an die Ausgangsfrage und im Hinblick auf die bereits vorhandene Literatur zu dem Thema „Immunologische Mechanismen der SIT“ sollten mit dieser Forschungsuntersuchung noch folgende weiteren Fragen beantwortet werden:

- Kommt es im Verlauf der SIT zu einer Reduktion von antigenspezifischen T<sub>H</sub>2-Zellen?
- Induziert die SIT die Expansion von antigenspezifischen T<sub>H</sub>1-Zellen?
- Induziert die Immuntherapie die Expansion von IL-10 sekretierenden Zellen, die auf eine von regulatorischen T-Zellen ausgehende Toleranzinduktion hinweisen könnten?
- Welche immunologischen Mechanismen könnten für die Wirksamkeit der SIT verantwortlich sein?
- Wie unterscheidet sich das wespengiftspezifische T-Zellprofil der Wespengiftallergiker von dem der Nicht-Allergiker?
- Eignet sich das neuartige ARTE (Antigen-reactive T cell enrichment) Protokoll zur Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen im Verlauf einer SIT?

### 3 Material

#### 3.1 Klinikmaterialien

Tabelle 4. *Verwendete Klinikmaterialien*

<b>Klinikmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Adapter für Röhrchen mit 13mm und 16 mm Durchmesser	BD Vacutainer®
Blutentnahmekanüle Multifly®	Sarstedt
Einmalspritze- Omniflix® Luer	B. Braun
Flächendesinfektion	Bacillol® AF
Hautdesinfektionspray-Softasept® N	B. Braun
Heparin-Röhrchen 6 ml, Li-Heparin (17 IU/ml)	BD Vacutainer®
Kanülenfixierpflaster	Lohmann & Rauscher
Mullkompressen	B. Braun
Pflaster	Leukoflex®
Serumröhrchen (SST™II Advance Röhrchen)	BD Vacutainer®
6 ml, Trenngel und Gerinnungsaktivator	
Sodium Chlorid 0,9 % Solution 10 ml (NaCl)	B. Braun
Stauschlauch	BD Vacutainer®
Tupfer	B. Braun
Untersuchungshandschuhe, puderfrei	Vasco®

0,90 x 25 mm G 22 blau,

1,10 x 33 mm G 20 rosa

### 3.2 Antikörper

Tabelle 5. *Verwendete Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Titration</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-human CD4-APC-Vio770	M-T466	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human CD8-VioGreen	BW 135 / 80	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human CD14-VioGreen	TÜK4	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human CD20-VioGreen	LT20	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human CD45-RO-VioBlue	UCHL1	1:200	Biologend
Anti-human CD154-PE-Vio770	5C8	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human IL-2 - FITC	MQ1-17H12	1:100	Biologend
Anti-human IL-4- PE	7A3-3	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human IL-5-APC	JES1-39D10	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human IL-9-PerCP 5.5	MH9A4	1:20	Biologend
Anti-human IL-10-APC	JES3-9D7	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human IL-13-PE	JES10-5A2.2	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human IFN- $\gamma$ -PerCP 5.5	4S.B3	1:50	Biologend
Anti-human Ki-67 - FITC	REA183	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human CD40	HB14	1:100	Miltenyi Biotec
CD154-Biotin, human	5C8	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-Biotin MicroBeads UltraPure		1:10	Miltenyi Biotec

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6. *Verwendete Chemikalien und Reagenzien*

<b>Chemikalien/ Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
AB-Serum (human)	Sigma-Aldrich
Brefeldin A, 1:200	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	Serva

Fraktion V, pH 7,0	
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ficoll, steril, d = 1,077 g/mL	PAA
HSA-Lösungsmittel (Humanalbuminlösung, Natriumchlorid, Phenol, Wasser)	Bencard® Allergie
Lebend/Tot-Farbstoff- SYTO 9 grün fluoreszierender Nukleinsäure-Färbemittel	Thermo Fisher
PBS, ohne Mg <sup>2+</sup> / Ca <sup>2+</sup>	Gibco® Life Technologies
PepTivator Candida albicans MP65	Miltenyi Biotec
Venomil® Wespe	Bencard® Allergie
Wespengift (Vespula spp.), Mannitol	

---

### 3.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7. *Verwendete Puffer und Lösungen*

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Inhaltstoffe</b>	<b>Hersteller</b>
CASYton		OLS® OMNI Life Science
Inside Fix, 3,7 % Formaldehyd		Miltenyi Biotec
Inside Perm (Permeabilisierungspuffer)		Miltenyi Biotec
Lyse Puffer (Lysing Solution)		BD Pharmingen
MACS Quant® Running Buffer		Miltenyi Biotec
MACSQuant® Washing Solution		Miltenyi Biotec
MACS Quant® Storage Solution		Miltenyi Biotec
PBS/EDTA Puffer	500 ml PBS + 2 ml EDTA	
PEB Puffer	1x PBS, 2 mM EDTA, 0,5 % BSA	
RPMI 1640 Medium		Merck Millipore
RPMI + AB-Serum	RPMI 1640 Medium + 5 % human-AB-Serum	

---

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8. *Verwendete Verbrauchsmaterialien*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Falcon™ Platten (6- Loch, 12- Loch)	Corning® Falcon™
Magnetsäulen, MS Columns	Miltenyi Biotec
Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 50 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon®

### 3.6 Laborgeräte

Tabelle 9. *Verwendete Laborgeräte*

<b>Laborgerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CASY®-Zellzähler	Casy 1, Modell TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heracell 150	Thermo Electron Corporation
Durchflusszytometer	MACS Quant ® Analyser 10 Flow Cytometer	Miltenyi Biotec
MACS-Magnete	QuadroMACS™	Miltenyi Biotec
MACS-Magnetständer	MACS Stand Multi	Miltenyi Biotec
Pipetten	0,5 µl - 10 µl	Eppendorf
Pipetten	10 µl - 100 µl	Eppendorf
Pipetten	100 µl - 1000 µl	Eppendorf
Pipetten	2 µl - 20 µl	Brand
Pipetten	20 µl - 200 µl	Brand
Sicherheitswerkbank	HERAsafe	Heraeus
Stromversorgung	PowerPac™ HV	Bio-Rad

Stromversorgung	PowerPac 300	Bio-Rad
Vortexmischer	REAX 2000	Heidolph
Zentrifuge	centrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge	centrifuge 5427 R	Eppendorf

### 3.7 Software

Tabelle 10. *Verwendete Software*

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Excel	Microsoft
FlowJo® V10	Tree Star, Inc.
GraphPad Prism® V6.01	GraphPad Software
Power Point	Microsoft
Word	Microsoft

## 4 Methoden

Obwohl sich die SIT bereits als effektive Methode zur Behandlung von Wespengiftallergien etabliert hat, sind die immunologischen Mechanismen dieser Therapie noch nicht vollends verstanden und Studien durch geringe T-Zellfrequenzen in der Peripherie begrenzt. In der vorliegenden Forschungsuntersuchung wurde die antigenspezifische, periphere T-Zellantwort während der Einleitung einer Wespengift-Immuntherapie direkt und ex-vivo mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Mit dem Einsatz des neuartigen antigenspezifischen Protokolls zur T-Zell-Anreicherung ARTE gelang über die Expression des Aktivierungsmarkers CD154 der Nachweis antigenspezifischer T-Zellen.

### 4.1 Patientenkollektiv

Nach der Bewilligung des Ethikantrags für die Forschungsstudie mit dem Titel „Bestimmung des antigenspezifischen T-Zellprofils im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie durch Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen direkt und ex-vivo“, konnten die Probanden der

Studie rekrutiert werden. Alle 25 Probanden waren diagnostizierte Wespengiftallergiker, die in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité, Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin, eine spezifische Immuntherapie erhielten und nach einer ausführlichen Aufklärung über Hintergrund, Zweck und Aufbau der Forschungsarbeit ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gaben. Von der Studie ausgeschlossen wurden schwangere und stillende Frauen, Patienten, die eine immunsuppressive Therapie erhielten und alle Patienten, die nach den Leitlinien keine Immuntherapie erhalten sollten (Pfaar 2014). Die Probanden wurden hinsichtlich Alter, Anzahl und Schwere der Stichereignisse, sowie dem Vorliegen weiterer atopischer Erkrankungen befragt, um mögliche Korrelationen zwischen Anamnese und Ergebnissen der experimentellen Untersuchung zu eruieren.

Der Kohorte bestand aus 25 Wespengiftallergikern und es wurde eine Vergleichsgruppe aus zwanzig Probanden gebildet, bei denen eine Wespengiftallergie im Vorfeld anamnestisch ausgeschlossen werden konnte.

## 4.2 Etablierung der Messungen

Um das antigenspezifische T-Zellprofil im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie zu bestimmen, wurden zwei Messreihen etabliert, anhand derer Oberflächen- und Intrazellulärmarker der verschiedenen T-Effektorzellen durchflusszytometrisch detektiert wurden. Für die erste Messreihe (Tabelle 11, Tabelle 12) wurde bei 20 Probanden das antigenspezifische T-Zellprofil zu vier verschiedenen Zeitpunkten während der Wespengift-Immuntherapie bestimmt. Dafür wurden vier unterschiedlich terminierte Abnahmen von jeweils 24 ml Blut unter Verwendung von Heparin-Röhrchen in das Therapieschema der Immuntherapie eingebettet (Abbildung 1).

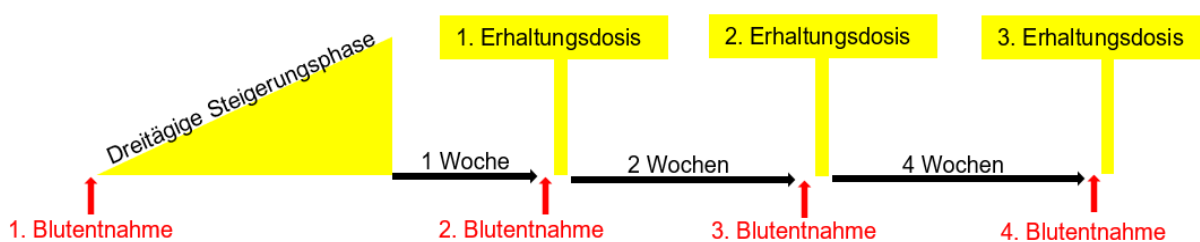


Abbildung 1. Chronologische Darstellung der Untersuchungsmesspunkte von Messreihe 1 zur Charakterisierung antigenspezifischer T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie.



Die 1. Blutentnahme erfolgte vor Beginn der SIT. Daran anknüpfend begann die dreitägige Steigerungsphase, in der den Probanden 340,54 µg Wespengift, aufgeteilt auf 15 Injektionen mit steigender Dosis Wespengift pro Injektion, gespritzt wurde. Eine Woche nach der dreitägigen Steigerungsphase wurden den Probanden ein zweites Mal Blut abgenommen und es folgte die erste Erhaltungsdosis mit 100 µg Wespengift. Die 3. Blutabnahme und die 2. Erhaltungsdosis folgten nach zwei Wochen und die 4. Blutentnahme sowie die 3. Erhaltungsdosis nach weiteren vier Wochen. Bei jeder Blutentnahme wurde präzise darauf geachtet, dass die Blutentnahme vor der Verabreichung der nächsten Erhaltungsdosis erfolgte. War dies nicht der Fall, hätte dies zum Ausschluss des Probanden aus der Studie geführt.

*Tabelle 11. Oberflächenfärbung der Messreihen 1 und 2*

<b>CD-Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zelluläre Expression</b>	<b>Funktion</b>
CD14	VioGreen	1:10	Monozyten, Makrophagen	Rezeptor für Lipopolysaccharide
CD20	VioGreen	1:10	B-Zellen	Regulation der B-Zell- Aktivierung
CD8	VioGreen	1:10	T <sub>H</sub> 1-Zellen	Korezeptor für MHC Klasse I Moleküle
CD4	APC-Vio	1:10	T <sub>H</sub> 2-Zellen	Korezeptor für Klasse II Molekül
CD45-R0	VioBlue	1:200	Gedächtnis- T-Zellen	Isoform von CD45, enthält kein A, B, C Exon

*Anmerkung.* Die Oberflächenfärbung dient der Charakterisierung des antigenspezifischen T-Zellprofils im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie (Murphy/ Travers/ Walport 2014).

Tabelle 12. Intrazellulärfärbung der Messreihe 1

<b>CD-Antigen/ Zytokin</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Zelluläre Expression</b>	<b>Funktion</b>
CD154	PE-Vio 770	1:10	Aktivierte CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Ligand für CD40, induziert Proliferation und Aktivierung von B-Zellen
IL-4	PE	1:10	T <sub>H</sub> 2-Zellen	B-Zellaktivierung, IgE-Wechsel, induziert die Differenzierung zu T <sub>H</sub> 2-Zellen
IL-10	APC	1:10	T <sub>H</sub> 2-Zellen, T <sub>reg</sub>	Antiinflammatorisch, inhibiert die Makrophagenfunktion
IL-2	FITC	1:100	T-Zellen	Aktivierung der T-Zellen, Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen
IFN- $\gamma$	PerCP5.5	1:50	T <sub>H</sub> 1-Zellen	Hemmt T <sub>H</sub> 2-Zellen, Makrophagenaktivierung, Erhöhung der Expression von MHC Klasse I Molekülen, verstärkt die T <sub>H</sub> 1-Aktivität

*Anmerkung.* Die Intrazellulärfärbung dient der Charakterisierung des antigenspezifischen T-Zellprofils im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie (Murphy/ Travers/ Walport 2014).

Aufbauend auf den Ergebnissen der 20 Wespengiftallergiker im Rahmen der ersten Messreihe, wurde eine zweite Messreihe etabliert, mittels derer weitere Parameter (IL-5, IL-9, IL-13, Ki-67) bei sechs Probanden untersucht wurden (Tabelle 13), wobei die Färbung der Oberflächenmarker jener der ersten Messreihe entsprach (Tabelle 11). Die zweite Messreihe bestand aus zwei Messpunkten, zum einen vor Beginn der SIT und zum anderen eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase (Abbildung 2).

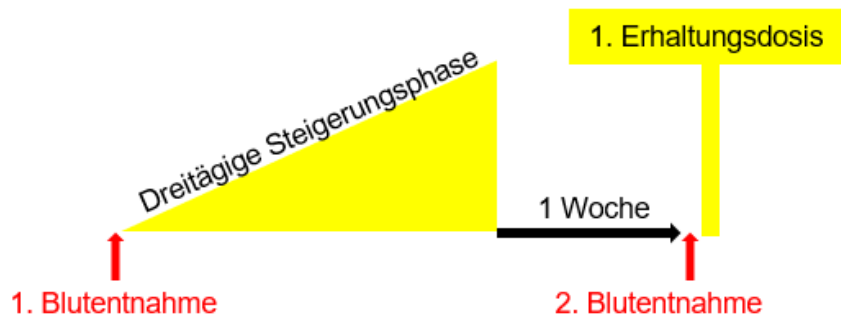


Abbildung 2. Schema der Blutentnahmen; Untersuchungsmesspunkte der Messreihe 2 zur Charakterisierung antigenspezifischer T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie.

Tabelle 13. Intrazellulärfärbung der Messreihe 2

CD-Antigen/ Zytokin	Fluorochrom	Verdünnung	Zelluläre Expression	Funktion
CD154	PE-Vio 770	1:10	Aktivierte CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Ligand für CD40, induziert Proliferation und aktiviert B-Zellen
IL-13	PE	1:10	T <sub>H</sub> 2-Zellen	Wachstum und Differenzierung der B-Zellen, hemmt T <sub>H</sub> 1-Zellen und Produktion inflammatorischer Zytokine,
IL-5	APC	1:10	T <sub>H</sub> 2-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung eosinophiler Zellen
Ki-67	FITC	1:10	Zellkern	Proliferationsmarker
IL-9	PerCP5.5	1:20	T <sub>H</sub> 2-Zellen	Wachstum und Differenzierung von Mastzellen, stimuliert T <sub>H</sub> 2-Zellen

Anmerkung. Vgl. Tabelle 12. Intrazellulärfärbung der Messreihe 1.

### 4.3 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Den Ausgangspunkt für die Charakterisierung des antigenspezifischen T-Zellprofils stellten mononukleäre Zellen dar, die aus dem peripheren Blut der Probanden isoliert wurden (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*). Die Isolierung erfolgte durch die Dichtegradientenzentrifugation einer Ficoll-Lösung aus heparinisiertem Vollblut. Dafür wurde das abgenommene Blut (ca. 24 ml) in ein 50 ml Reaktionsgefäß übertragen und auf 35 ml mit PBS/EDTA Puffer aufgefüllt. Das so verdünnte Blut wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß auf 12 ml Ficoll-Lösung ( $\rho = 1,007 \text{ g/ml}$ ) gegeben und anschließend bei 20 °C und 300 g ohne Bremse für 30 min zentrifugiert. Während der Zentrifugation sedimentierten die Zellfraktionen abhängig von ihrer Dichte in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Dadurch konnten die Zellbestandteile in vier Phasen von unterschiedlicher Dichte separiert werden. Am Boden des Reaktionsgefäß befanden sich die Zellen mit der höchsten Dichte: Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen. Darauf lag die Ficoll-Schicht und darüber eine schmale, trübe Interphase mit den zu untersuchenden mononukleären Zellen. Die oberste Schicht bestand aus einem Plasma-Phosphatpuffer-Gemisch, das von allen Phasen die geringste Dichte besaß.

Der schmale Ring aus mononukleären Zellen wurde nun vorsichtig abpipettiert, wobei die Aufnahme der darunter liegenden zytotoxischen Ficolls weitestgehend vermieden wurde. Um die mononukleären Zellen von mitaufgenommenen Thrombozyten und Resten der Ficoll-Lösung zu säubern, wurden die Zellen in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und dieses mit PBS/EDTA auf 45 ml aufgefüllt. Die Verdünnung wurde bei 4 °C und 400 g mit Bremse für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Reaktionsgefäß erneut mit PBS/EDTA auf 45 ml aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 400 g mit Bremse für 15 min wurden der Überstand abgegossen, das Zellpellet in 10 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

#### 4.4 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden 10 µl von den in 10 ml RPMI 1640 Medium gelösten Zellen in eine speziell für die Zellzahlbestimmung hergestellten Lösung (CASYton) gegeben und mit dem CASY-TT analysiert.

Das Prinzip der CASY-Messung beruht auf der Pulsflächenanalyse. Dabei werden die Zellen einzeln durch eine Messpore gesaugt, in der sich ein schwach pulsierendes Spannungsfeld von 1 MHz befindet, welches von zwei Platinelektroden erzeugt wird. Die Pore stellt für die hindurchfließenden Zellen einen elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtreten einer Zelle durch die Pore verdrängt diese eine zum Zellvolumen korrespondierende Anzahl von Elektronen. Zellen mit defekter Zellmembran wirken nicht mehr als elektrische Barriere und können durch das Volumen ihres Zellkerns erfasst werden. Auf diese Weise ist es möglich, zwischen vitalen und toten Zellen, sowie zwischen Zelltrümmern und Zellclustern (Zellaggregate von mehr als zwei Zellen) zu unterscheiden und die Zellen zu zählen (OLS-Omni Life Science GmbH 2016).

Das von CASY-TT gemessene Ergebnis der auf 10 ml verdünnten 10 µl Zellprobe ließ sich auf die gesamte Probenmenge hochrechnen. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass sich in einer Blutprobe von 24 ml zwischen  $0,8 - 6 \cdot 10^7$  PBMCs befanden.

#### 4.5 Zellkultur und Stimulation

Nach der Zellzählung wurden die in 10 ml RPMI Medium resuspendierten mononukleären Zellen bei 4 °C und 220 g mit Bremse für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Im Anschluss wurden die PBMCs erneut in RPMI 1640 Medium resuspendiert, welches 5 % AB Serum enthielt (RPMI 1640 Medium+5 % AB Serum), und auf drei Löcher (Vertiefung der Zellkulturplatte) einer Zellkulturplatte aufgeteilt und über Nacht in den Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt. Dabei galt folgende Richtlinie: Ergab die Zellzählung  $6 \cdot 10^7$  oder weniger Zellen, dann wurden die Zellen in 3 ml RPMI 1640 Medium+5 % AB Serum resuspendiert und auf drei Löcher einer 12-Loch-Platte aufgeteilt (jeweils 1ml/Loch), sodass sich max.  $2 \cdot 10^7$  Zellen in jedem Loch befanden.

Wurde die Zellzahl von  $6 \cdot 10^7$  überschritten, dann wurden die Zellen in 6 ml RPMI 1640 Medium+5 % AB Serum resuspendiert und auf drei Löcher einer 6-Loch-Platte aufgeteilt (jeweils 2 ml/Loch). Da bei den meisten Messungen die Zellzahl von  $6 \cdot 10^7$  nicht überschritten wurde, wird im Folgenden das Versuchsprotokoll unter Verwendung der 12-Loch-Platten

beschrieben. Das Versuchsprotokoll zum Verlauf unter Verwendung der 6-Loch-Platten ist dem Anhang beigelegt.

Die Charakterisierung des antigenspezifischen T-Zellprofils erfolgte mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD154 aus der TNF-Superfamilie, der 4 – 12 h nach einer T-Zell-Rezeptor-Stimulation von allen antigenspezifischen T-Zellen exprimiert wird (Bacher/Scheffold 2013a; Bacher et al. 2013b). Die Stimulation erfolgte mit dem Wespengiftprodukt Venomil® Wespe von Bencard® Allergie GmbH, das auch für die SIT bei den Probanden verwendet wurde. 550 µg trockenes Wespengift wurden in 550 µl HSA-Lösung (Humanserumalbumin-Lösung) und 20 µl dieser Wespengiftlösung in eine der drei 12-Loch-Platten gegeben. Da aber nur die wespengiftspezifischen T-Zellen untersucht werden sollten, musste überprüft werden, wie viele T-Zellen ohne Stimulation bzw. bereits vor der Stimulation den Aktivierungsmarker CD154 exprimieren. Dies erfolgte durch die Einführung einer Negativkontrolle, für die eine Probe der drei 12-Loch-Platten unstimuliert blieb und damit der mit Wespengift stimulierten Probe als Ausgangs- bzw. Vergleichsprobe diente. Um zu kontrollieren, ob die Stimulation mit dem Wespengift erfolgreich war, wurde schließlich noch eine Positivkontrolle eingeführt. MP65 ist ein immundominantes Candida-Antigen, das bei nahezu allen gesunden Menschen eine Stimulation der T-Zellantwort hervorruft (Nisini et al. 2001) und sich daher als Positivkontrolle sehr gut eignete. Für die Positivkontrolle wurden 10 µl des trockenen Antigens „PepTivator Candida albicans MP65“ in 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und die Antigenlösung anschließend zu den mononukleären Zellen der letzten von den drei Löchern auf der 12-Loch-Platte gegeben.

Unmittelbar vor der Stimulation wurden noch in jedes der drei Löcher 10 µl (1:100) des CD40 Antikörper gegeben. Die Interaktion von CD40 und seinem Liganden CD154 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-B-Zell-Interaktion. Der CD40 Antikörper bindet CD40 und verhindert dadurch die Bindung von CD154 an CD40 und die damit einhergehende Herunterregulierung der CD154-Expression (Miltenyi 2018). Auf diese Weise konnte CD154 auf der Oberfläche von antigenspezifischen T-Zellen detektiert werden (Bacher/Scheffold 2013a).

Die Zellen inkubierten nun bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 h im Kulturschrank. Nach der fünfständigen Stimulation wurden 2 µl Brefeldin A (1:500) in jedes Loch gegeben, wodurch die Oberflächenexpression von CD154 durch Störung des Golgiapparat-Signalwegs gehemmt und die CD154-Expression intrazellulär messbar wurde (Bacher/Scheffold 2013a; Chattopadhyay/Yu/Roederer 2005). Nach weiteren 2 h Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde mit der magnetischen Zellsortierung begonnen.

#### 4.6 Antigen-spezifische T-Zell-Anreicherung (ARTE: Antigen-reactive T cell enrichment)

Das humane T-Zellrepertoire erlaubt eine Reaktion auf viele verschiedene Antigene. Aufgrund der geringen Anzahl der auf ein spezifisches MHC-Peptid reagierenden T-Zellen (0,2 – 60/ 160 naive T-Zellen) (Bacher/ Scheffold 2013a), muss ein ausreichend großer Zellpool untersucht werden, um die geringen T-Zellfrequenzen in der Peripherie zu charakterisieren. Dies gelingt mit dem neuartigen ARTE Protokoll, mit dem Zellpopulationen von bis zu  $10^7$  –  $10^9$  Zellen auf antigen-spezifische T-Zellen untersucht werden können (Bacher et al. 2013b; Bacher et al. 2014), indem sie von den übrigen Zellen separiert werden.

Dafür werden die zu untersuchenden Zellen an superparamagnetische MicroBeads gebunden. Bei MicroBeads handelt es sich um 50 nm große Magnetpartikel, die mittels Bindung monoklonaler Antikörper (CD145 Biotin und Anti-Biotin-MicroBeads) CD154 exprimierende T-Zellen binden und magnetisieren. Anschließend wird die Zellsuspension auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule aufgetragen, die sich in einem starken Permanentmagnet des MACS Separators (OctoMACS) befindet. Beim Durchlauf der Zellsuspension durch die Säule bleiben die an MicroBeads gebunden, magnetisierten Zielzellen an der Magnetsäule haften, während die unmarkierten Zellen als Negativfraktion durch die Säule hindurchfließen. Die Säule kann anschließend aus der Dauermagnetvorrichtung entfernt und die Positivfraktion ( $CD154^+$  T-Zellen) aus der Säule eluiert werden (Miltenyi et al. 1990).

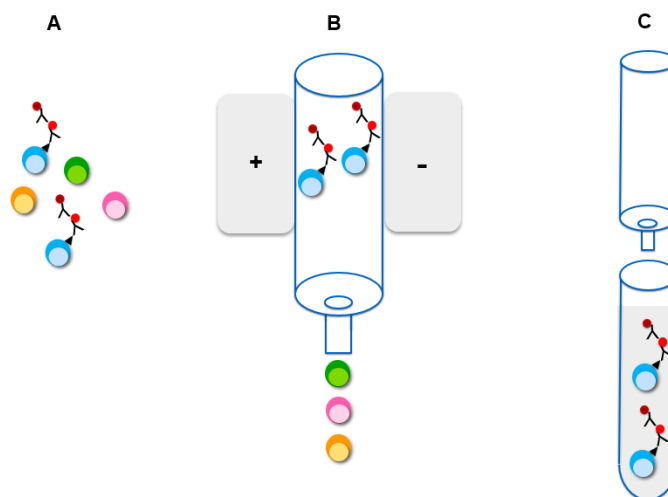


Abbildung 3. Magnetische Markierung und Separierung antigen-spezifischer ( $CD154^+$ ) T-Zellen unter Anwendung des ARTE Protokolls, inspiriert von (Miltenyi Biotec® 2019).

Anmerkung. A: Magnetische Markierung der  $CD154^+$  T-Zellen B: Magnetische Separierung der magnetisierten  $CD154^+$  T-Zellen. C: Elution der  $CD154^+$  T-Zellen.

#### 4.6.1 Magnetische Markierung antigenspezifischer T-Zellen

Zuerst wurden die Zellsuspensionen (Wespen Gift-stimulierte, Candida-stimulierte und unstimulierte Probe) aus den drei Löcher der Loch-Platte in jeweils 1,5 ml große Reaktionsgefäße überführt, die Löcher mit 500 µl PEB-Puffer gespült und die Spüllösungen ebenfalls in die Reaktionsgefäße gegeben.

Um die Ergebnisse der Forschungsstudie bewerten zu können, musste zunächst die Anzahl der nach dem ARTE-Protokoll angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt werden. Dafür wurden vor der magnetischen Markierung 25 µl Zellsuspension aus einem Reaktionsgefäß entnommen und eine Färbung für eine 50 µl Lösung (25 µl Probe und 25 µl Färbung) angesetzt (

Tabelle 14). Die Zellen inkubierten für 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur in dieser Färbelösung, bevor 200 µl PEB-Puffer dazugegeben und die CD4<sup>+</sup> Zellen anhand der Durchflusszytometrie gezählt und der Anteil CD4<sup>+</sup> Zellen bestimmt wurden.

*Tabelle 14. Herstellung der Färbelösung*

<b>CD-Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge in 50 µl Lösung</b>
CD4	APC-Vio	1:10	5 µl
CD45-RO	VioBlue	1:200	1 µl aus einer 1:4 Vorverdünnung
Probe			25 µl
PEB-Puffer			19 µl

*Anmerkung.* Die Färbelösung dient der Ermittlung des mit ARTE angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Anteils.

Die drei Reaktionsgefäße mit den verschiedenen Zellsuspensionen wurden nun bei 4 °C und 400 g mit Bremse für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Dann wurden die Zellpellets aufgeklopft und jeweils ein Gemisch aus 10 µl CD154-Biotin und 90 µl PEB-Puffer (1:10) vorbereitet, in dem die Zellen für 10 min bei 4 °C inkubierten. CD154-Biotin ist ein an Biotin konjugierter monoklonaler Antikörper, der über den CD154 Oberflächenmarker antigenspezifische T-Zellen bindet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml PEB-Puffer gewaschen und bei 4 °C und 400 g mit Bremse für 5 min zentrifugiert,



wodurch ungebundenes CD154-Biotin aus der Zellsuspension entfernt wurde. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und ein Gemisch aus 10 µl Anti-Biotin MicroBeads Ultra Pure und 90 µl PEB-Puffer (1:10) auf die aufgeklopften Zellpellets gegeben. Während der fünfzehnminütigen Inkubation bei einer Temperatur von 4 °C konnten die MicroBeads den monoklonalen Antikörper CD154-Biotin binden und dadurch die Zellen magnetisieren. Im Anschluss wurden die nicht gebundenen MicroBeads mittels eines Waschriffs, bestehend aus 1 ml PEB-Puffer und einer anschließenden fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 400 g mit Bremse, entfernt. Die Zellpellets wurden in 500 µl PEB-Puffer resuspendiert und es konnte mit der magnetischen Separation begonnen werden.

#### 4.6.2 Magnetische Separierung antigenspezifischer T-Zellen in Kombination mit Oberflächen- und Intrazellulärfärbung

Das für die magnetische Separierung erforderliche Magnetfeld wurde mit dem MACS Separator (OctoMACS™ Separator) erzeugt. Für alle drei Proben (Wespengift-stimulierte, Candida-stimulierte und unstimulierte Probe) wurde jeweils eine Trennsäule in die Armatur eingehängt. Die Trennsäulen wurden mit 500 µl PEB-Puffer befeuchtet und anschließend die resuspendierten Zelllösungen auf die Trennsäulen aufgetragen. Die durch den CD154-Biotin-anti-Biotin-MicroBead-Komplex gebundenen und dadurch magnetisierten antigenspezifischen CD154<sup>+</sup> T-Zellen blieben nun im Magnetfeld innerhalb der Trennsäule hängen, während die nicht magnetisierten Zellen durch die Trennsäule hindurch liefen. Durch zwei Waschriffs mit 500 µl PEB-Puffer und 500 µl PBS wurden zurückbleibende ungebundene Zellen aus der Trennsäule entfernt. Im Anschluss wurden jeweils 60 µl der Oberflächenfärbung (Tabelle 15) auf die Zellen innerhalb der Trennsäulen aufgetragen und bei Raumtemperatur für 15 min an einen abgedunkelten Ort gestellt.

*Tabelle 15. Herstellung der Oberflächenfärbung*

<b>CD-Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge in 200 µl Oberflächenfärbung</b>
CD14	VioGreen	1:10	20 µl
CD20	VioGreen	1:10	20 µl
CD8	VioGreen	1:10	20 µl
CD4	APC-Vio	1:10	20 µl
CD45-R0	VioBlue	1:200	1 µl
Lebend/Tot-Farbstoff	VioGreen	1:100	2 µl

*Anmerkung.* Vgl. Tabelle 11. Oberflächenfärbung der Messreihen 1 und 2.

Nach der Inkubation der Oberflächenfärbung wurden nichtgebundene nicht gebundene Antikörper mittels 500  $\mu$ l PBS aus den Trennsäulen gewaschen. Um die in den Trennsäulen gebundenen und markierten Zellen aus den Trennsäulen zu entfernen, wurden die Trennsäulen aus der Armatur genommen, wodurch das Magnetfeld zusammenfiel. Nun konnten die Zellen mithilfe von 500  $\mu$ l PBS und eines Stempels aus den Trennsäulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert werden. Diese als Positivfraktion bezeichneten Zellen wurden nun zur Vorbereitung auf die Intrazellulärfärbung in 200  $\mu$ l Inside Fix für 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden drei neue Trennsäulen in den MACS Separator eingehängt, jeweils mit 500  $\mu$ l PEB-Puffer befeuchtet und anschließend die drei Zellsuspensionen auf die Trennsäule aufgetragen. Nachdem die Zellsuspensionen die Trennsäulen durchlaufen hatten, wurden jeweils 200  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer (Permeabilization Buffer) auf die Trennsäulen aufgetragen. Darauf folgte die Intrazellulärfärbung (Tabelle 16, Tabelle 17). Jeweils 60  $\mu$ l der Färbelösung wurden auf die Zellen innerhalb der Trennsäule aufgetragen und für 10 Min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert.

*Tabelle 16. Herstellung der Intrazellulärfärbung für Messreihe 1*

<b>CD-Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge in 200 <math>\mu</math>l Intrazellulärfärbung</b>
CD154	PE-Vio 770	1:10	20 $\mu$ l
IL-4	PE	1:10	20 $\mu$ l
IL-10	APC	1:10	20 $\mu$ l
IL-2	FITC	1:100	2 $\mu$ l
IFN- $\gamma$	PerCP5.5	1:50	4 $\mu$ l
Permeabilization Buffer			134 $\mu$ l

*Anmerkung.* vgl. Tabelle 11. Oberflächenfärbung der Messreihen 1 und 2

Tabelle 17. Herstellung der Intrazellulärfärbung für Messreihe 2

<b>CD-Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge in 200 µl Intrazellulärfärbung</b>
CD154	PE-Vio 770	1:10	20 µl
IL-13	PE	1:10	20 µl
IL-5	APC	1:10	20 µl
Ki-67	FITC	1:10	20 µl
IL-9	PerCP5.5	1:20	10 µl
Permeabilization			110 µl
Buffer			

Anmerkung. vgl. Tabelle 12. Intrazellulärfärbung der Messreihe 1.

Nach der Inkubation der Intrazellulärfärbung wurden 200 µl Permeabilisierungspuffer auf die Trennsäulen gegeben und anschließend die sich innerhalb der Trennsäule befindenden oberflächlich und intrazellulär gefärbten Zellen mit 1 ml PEB-Puffer aus der Trennsäule in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert. Nachdem die drei Positivfraktionen bei 4° C und 400 g für 5 min zentrifugiert wurden, konnten die Überstände entfernt und die Zellpellets in 50 µl PEB-Puffer resuspendiert werden. Die Zellen waren nun so aufbereitet, dass sie mit der Durchflusszytometrie analysiert werden konnten.

## 4.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence-activated cell Scanning*) genannt, ist ein Verfahren, mittels dessen Zellen innerhalb einer Zellsuspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert und quantifiziert werden können. Ein komplexes optisches System aus Lasern, Linsen, Filtern, Spiegeln und Detektoren ermöglicht die Beantwortung von Fragen zu Zellgröße, Zellgranularität, intrazellularen Bestandteilen und Oberflächenstrukturen (BD Biosciences 2014; Fleisher/Oliveira 2019).

Die zu analysierende Zellsuspension wird in eine Kapillare gesaugt und von einer Trägerflüssigkeit umgeben, sodass ein laminarer Hüllstrom entsteht. Dieser Strom fließt in Richtung einer Messküvette, wobei deren Querschnitt sukzessive abnimmt und es zu einer hydrodynamischen Fokussierung der Probe kommt. Dabei beschleunigt sich der Hüllstrom und der Abstand zwischen den zu untersuchenden Zellen vergrößert sich, sodass jede Zelle einzeln an einem monochromatischen Laserstrahl vorbeifließt. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, wird das Licht gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (*FSC = Forward Scatter*) beschreibt dabei das Licht, das die Vorwärtsrichtung des Laserstrahls beibehält und nur geringfügig ( $0,5^{\circ}$ – $2^{\circ}$ ) abgelenkt wird. FSC ist vom Zellvolumen abhängig und repräsentiert somit die Größe einer Zelle. Licht, das um  $90^{\circ}$  abgelenkt wird, bildet das Seitwärtsstreulicht (*SSC = Side Scatter*) und stellt ein Maß für die Granularität einer Zelle da. Anhand dieser zwei Daten kann bereits zwischen Zelltrümmern, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden werden (ebd.).

Zudem können anhand der Durchflusszytometrie - durch Markierung von Zellstrukturen mit Fluorochrom tragenden Antikörpern - Zellpopulationen unterschieden und detektiert werden. Trifft der Laserstrahl auf eine derart markierte Zelle, wird das Fluorochrom angeregt und ein Elektron wird auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach Passieren des Laserstrahls fällt das Elektron unter Abgabe von Photonenenergie auf das Ursprungsniveau zurück, was als Fluoreszenz registriert wird. Unterschiedliche Fluorochrome emittieren dabei Fluoreszenzen distinkter Wellenlänge, wodurch zwischen verschiedenen Zellpopulationen unterschieden werden kann (ebd.).

## 4.8 Gating Strategie

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde der MACS Quant® Analyser 10 Flow Cytometer der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die anschließende Bearbeitung und Analyse der Messungen, zu denen die Kompensationen und die Erstellung von Gating-Strategie gehörten, erfolgte mit dem Programm FlowJo® 10. Die verwendete Gating-Strategie ist der folgenden Abbildung zu entnehmen (Abbildung 4).

Zur besseren Darstellung der CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde Zellaggregate, tote Zellen (FSC-Area vs. FSC-High) und Zellen, die nicht Teil dieser Forschungsuntersuchung waren, (CD8<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup>) ausgeschlossen und das Gate um CD4<sup>+</sup> Lymphozyten gesetzt. Im Anschluss wurden diese Zellen auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD154 und weiterer Oberflächen- bzw. Interzellulärmarker untersucht (CD45-RO, IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , Ki-67).

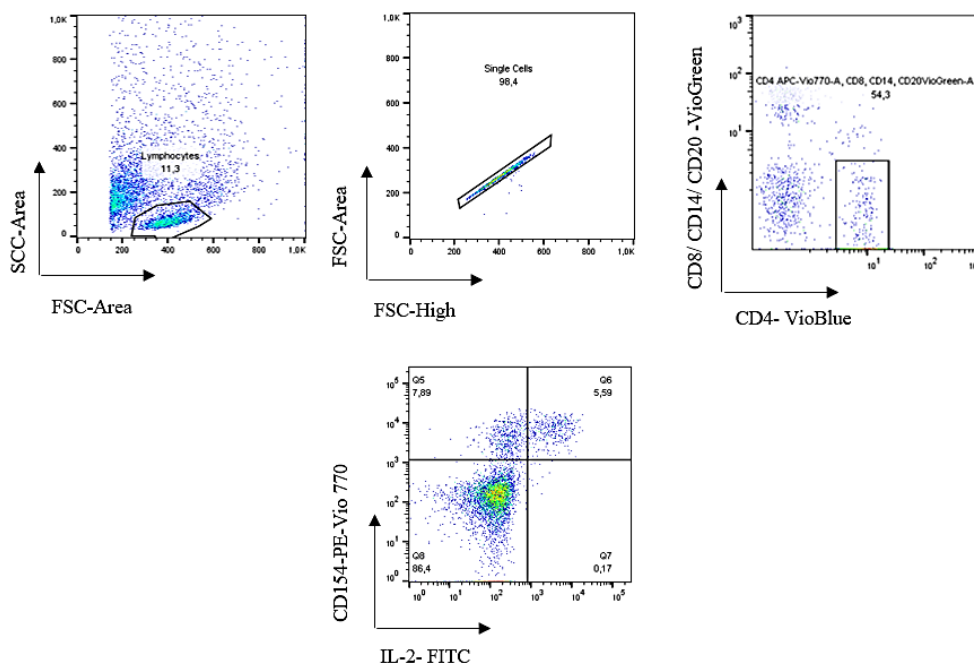


Abbildung 4. Darstellung der Gating-Strategie zur Bestimmung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach magnetischer Anreicherung CD154<sup>+</sup> T-Zellen.

*Anmerkung.* PBMC von Wespengiftallergikern während der Einleitungsphase einer Wespengift-Immuntherapie und PBMC von Nicht-Allergikern wurden für 7h mit Wespengift stimuliert.

**(FSC-Area vs. SSC-Area):** Gate wird um die Lymphozyten gesetzt; **(FSC-High vs. FSC-Area)** im Lymphozyten-Gate: Gate wird um die Single Cells gesetzt; **(CD4-VioBlue vs. CD8, CD14, CD20-VioGreen)** im Single Cells-Gate: Gate wird um die CD4<sup>+</sup> Lymphozyten gesetzt; **(IL-2-FITC vs. CD154-PE-Vio770)** im CD4<sup>+</sup> T-Zell-Gate: Gate wird um CD154<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup> T-Zellen sowie um CD154<sup>+</sup> IL-2<sup>-</sup> T-Zellen gesetzt. Im CD4<sup>+</sup> T-Zell Gate wurden noch weitere Gates gesetzt: (IL-4-PE vs. CD154-PE-

Vio770), (IL-10-APC vs. CD154-PE-Vio770), (IFN- $\gamma$ -PerCP5.5 vs. CD154-PE-Vio770), (IL-13-PE vs. CD154-PE-Vio770), (IL-5-APC vs. CD154-PE-Vio770), (Ki-67-FITC vs. CD154-PE-Vio770), (IL-9-PerCP5.5 vs. CD154-PE-Vio770).

#### 4.9 Auswertung

Mit Hilfe der Messergebnisse der Durchflusszytometrie und weiteren Berechnungen konnte das antigenspezifische T- Zellprofil charakterisiert werden. Die Berechnungen, die anhand der durchflusszytometrischen Messungen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 18 beispielhaft dargestellt.

Zuerst wurde die Anzahl der stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**C**) berechnet, indem die Anzahl der stimulierten PBMCs einer Zellreihe (**A**: Anzahl der PBMCs in 24 ml Blut geteilt durch 3) mit dem Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**B**: stimulierte, aber nicht angereicherte CD4<sup>+</sup> T-Zellen) multipliziert und anschließend durch 100 geteilt wurde.

Anschließend wurde die Anzahl der antigenspezifischen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt (**F**). Dafür wurden die Differenz aus den Quantitäten der mit Wespengift stimulierten Probe (**D**) und der CD154<sup>+</sup> Event der unstimulierten Probe (**E**) gebildet. Um das weitere Zytokinprofil dieser antigenspezifischen CD154<sup>+</sup> T-Zellen zu bestimmen, wurde ähnlich vorgegangen. Dafür wurde beispielweise zur Bestimmung der Anzahl der antigenspezifischen IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen die IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Events der unstimulierten Probe von den IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Events der mit Wespengift stimulierten Probe abgezogen. So, wie bei dem Zytokin IL-4 beschrieben, wurde mit allen anderen untersuchten Oberflächen – und Interzellulärmarker fortgeföhren (CD45-RO, IL-2, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IFN-  $\gamma$ , Ki-67). Zusätzlich wurde für jedes Zytokin/ Marker der prozentuale Anteil unter allen antigenspezifischen T-Zellen bestimmt (z. B.: Anzahl der IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen : (Anzahl der CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen : 100)).

Bestimmt wurde auch die Frequenz der antigenspezifischen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Anzahl der antigenspezifischer CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wenn lediglich eine T-Zellen stimuliert wird) (**G**). Hierfür wurde der Quotient aus den antigenspezifischen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**F**) und der Anzahl der stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**C**) berechnet. Ebenso wurde bei der Frequenzberechnung der unterschiedlichen Zytokine verfahren.

Tabelle 18: Auswertung der durchflusszytometrischen Messergebnisse

<b>A</b>	Anzahl der stimulierten PBMC (Gesamtzahl der PBMCs in 24 ml Blut dividiert durch 3)	$1 \cdot 10^7$
<b>B</b>	Prozentualer Anteil der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in der stimulierten, aber nicht angereicherten Probe	20 %
<b>C</b>	Anzahl der stimulierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (A · B) : 100	$2 \cdot 10^6$
<b>D</b>	CD154 positive Events in der antigenstimulierten, angereicherten Probe	200
<b>E</b>	CD154 positive Events in der unstimulierten, angereicherten Probe	50
<b>F</b>	Anzahl der antigenspezifischen CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (D - E)	150
<b>G</b>	Frequenz der antigenspezifischen CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen (F : C)	$7,5 \cdot 10^{-5}$

Anmerkung. Es handelt sich um eine Beispielrechnung.

#### 4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Forschungsergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® Version 6.01. Um die Nullhypothese „Im Laufe der Wespengift-Immuntherapie kommt es zu keinen Veränderungen des antigenspezifischen T-Zellprofils“ prüfen zu können, wurden die aus den durchflusszytometrischen Messungen und anschließenden Berechnungen hervorgegangenen Forschungsergebnisse mit verschiedenen statistischen Tests ausgewertet. Dabei entschied das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,5$  über Annahme oder Verwerfen der Nullhypothese. Bei einem Verwerfen der Nullhypothese wurde die Alternativhypothese „Die Wespengift-Immuntherapie moduliert das antigenspezifischen T-Zellprofil von Wespengiftallergikern“ angenommen.

Bevor diese Hypothesen geprüft werden konnten, wurden die Forschungsergebnisse für jedes zu untersuchende Zytokin und Marker (z. B.: antigenspezifische CD154<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> T-Zellen) in

Gruppen eingeteilt und mit dem D'Agostino-Pearson Test auf Normalverteilung getestet. Dadurch entstanden folgende Gruppen:

- Wespengiftallergiker, deren PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wespengift-Immuntherapie (BE1/ BE2/ BE3/ BE4) mit Wespengift stimuliert wurden,
- Wespengiftallergiker, deren PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wespengift-Immuntherapie (BE1/ BE2/ BE3/ BE4) mit Candida stimuliert wurden,
- Nicht-Allergiker, deren PBMCs mit Wespengift stimuliert wurden und
- Nicht-Allergiker, deren PBMCs mit Candida stimuliert wurden.

Anschließend wurde für die Ergebnisse jede Gruppe der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Um herauszufinden, ob die Wespengift-Immuntherapie Modulationen am antigenspezifischen T-Zellprofil von Wespengiftallergikern vornimmt, wurden die Ergebnisse der verschiedenen Zeitpunkte der SIT (BE1/ BE2/ BE3/ BE4) mit dem Friedman-Test (non parametric repeated measures comparison) verglichen.

Da die Messreihe 2 (IL-5, IL-9, IL-13, Ki-67) nur aus zwei Messpunkten bestand (vor SIT und eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase), konnten die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit dem nicht-parametrischen „Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test“ zur Prüfung abhängiger Stichproben getestet werden.

Des Weiteren sollte mit dieser Forschungsuntersuchung eruiert werden, ob und wenn ja, inwiefern sich das antigenspezifische T-Zellprofil der Wespengiftallergiker von dem der Nicht-Allergiker unterscheidet. Diese Frage wurde mit dem „Mann-Whitney-U-Test“ beantwortet, einem nicht-parametrischen Test, mit dem zwei voneinander unabhängige Stichproben miteinander verglichen werden können. Das antigenspezifische T-Zellprofil der Nicht-Allergiker stand dabei dem der Wespengiftallergiker vor Beginn der SIT gegenüber.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Antigen-spezifische T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

Um die antigen-spezifische T-Zellantwort bei 20 Wespengiftallergikern im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie untersuchen und bewerten zu können, wurde die Frequenz der wespengiftspezifischen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wie oben beschrieben berechnet und in einem Kurvendiagramm abgebildet (Abbildung 5). Die Frequenzen wurden an der Y-Achse und die verschiedenen Messpunkte an der X-Achse abgebildet. Für jeden Messpunkt wurde der Mittelwert der antigen-spezifischen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenzen bestimmt und mit dem Friedman Test verglichen. Dem Kurvendiagramm kann sehr gut entnommen werden, dass die Frequenz wespengiftspezifischer T-Zellen im Verlauf der ersten Woche der SIT (BE1 zu BE2) höchst signifikant anstieg ( $p < 0,0001$ ) und im weiteren Verlauf der SIT wieder signifikant auf den Ausgangswert fiel (BE2 zu BE3:  $p = 0,0011$ ; BE2 zu BE4:  $p < 0,0001$ ).

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Abnahme antigen-spezifischer T-Zellen von BE2 zu BE4 als Teil des SIT – Wirkmechanismus gewertet werden kann, oder ob dies tatsächlich nur durch die größer werdenden Intervalle zwischen Wespengiftinjektion und Blutentnahmen zu erklären ist, wurde bei drei Probanden weitere drei Messungen durchgeführt (Abbildung 5):

Die erste zusätzliche Messung (BE5) wurde eine Woche nach der 3. Erhaltungsdosis durchgeführt, wodurch der Abstand zwischen der Messung BE2 und der vorausgegangenen Wespengiftinjektion nachgestellt wurde. Eine mit BE2 vergleichbar hohe Frequenz CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell an BE5 hätte darauf hingedeutet, dass ein größer werdender Abstand zwischen Wespengiftinjektion und Messung eine niedrigere Frequenz CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell generiert und primär nicht als Wirkmechanismus der SIT gedeutet werden kann. Mit dem Friedmann-Test wurden die Mittelwert - Werte von BE2 und BE5 verglichen. Obwohl der p-Wert dieser kleinen Stichprobe mit  $p = 0,5578$  nicht signifikant war, ist aus dem Diagramm (Abbildung 6) deutlich ersichtlich, dass die an BE5 gemessenen Frequenzen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell deutlich unter denen von BE2 lagen.

Ein Jahr nach Beginn der Wespengift-Immuntherapie wurde eine erneute Blutentnahme durchgeführt (BE6). Das Intervall zwischen der Blutentnahme BE6 und der letzten vorausgegangenen Wespengiftinjektion entsprach vier Wochen und war damit so groß wie das Intervall zwischen der 2. Erhaltungsdosis und der Messung BE4. Mit dem Friedmann-Test wurde geprüft, ob sich die Frequenz antigen-spezifischer T-Zellen innerhalb des ersten Jahres noch einmal signifikant ändert. Dafür wurden der Mittelwert -Wert von ein Jahr nach Beginn

der SIT (BE6) mit dem von knapp zwei Monate nach Beginn der SIT (BE4) verglichen. Der Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Messpunkten ( $p > 0,9999$ ).

Die Messung BE7 wurde ebenfalls ein Jahr nach Beginn der SIT durchgeführt. Allerdings lag der Abstand zwischen der Blutentnahme BE7 und der vorausgegangen Wespengiftinjektion bei einer Woche und entsprach damit dem Intervall zwischen der letzten Wespengift dosis der Steigerungsphase und der Messung BE2. Mit dem Friedman-Test wurden die Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen von Messung BE2 mit denen von BE7 verglichen. Damit wurde kontrolliert, ob die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen eine Woche nach Wespengiftkontakt erneut ansteigt, wenn die SIT bereits seit einem Jahr durchgeführt wird. Obwohl der p-Wert von  $p = 0,5578$  nicht signifikant war, wird in Abbildung 5 deutlich, dass die gemessenen Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen an BE7 deutlich unter denen an BE2 gemessenen lagen.

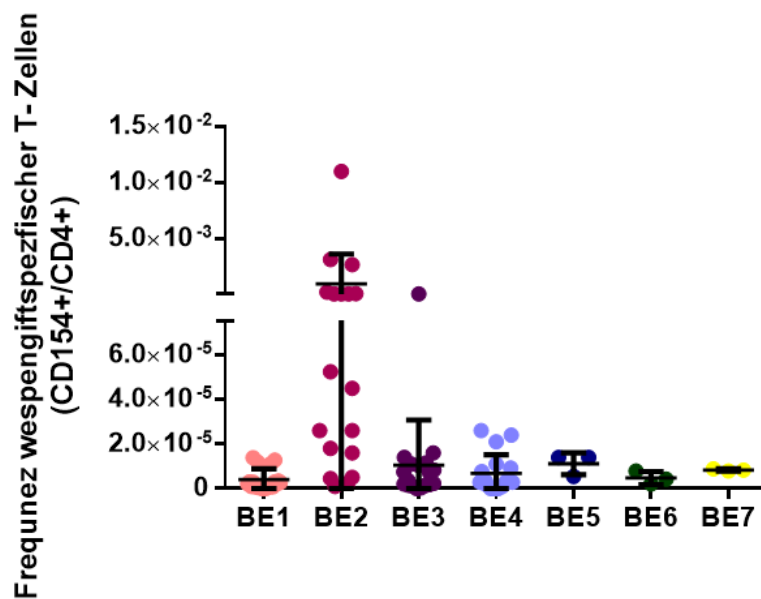


Abbildung 5. Kurvendiagramm der Frequenz von wespengiftspezifischen  $CD4^+$  T-Zellen im Verlauf der Einleitungsphase einer Wespengift-Immuntherapie.

Anmerkung. Das Kurvendiagramm stellt die Frequenz der an 20 Wespengiftallergikern mit Kontrolle nach 1 Jahr SIT bei drei Probanden gemessenen  $CD4^+$  T-Zellen dar.

**BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE5:** 1 Woche nach Erhaltungsphase; **BE6:** 1 Jahr SIT und 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE7:** 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsphase.

Zusätzlich zu den Ergebnissen aus Abbildung 5 (Wespengiftallergiker, deren PBMCs mit Wespengift stimuliert wurden) wurden in dem Streudiagramm (grafische Darstellung von Mittelwert und Streuung) aus Abbildung 6 die Ergebnisse der Positivkontrolle

(Wespengiftallergiker, deren PBMCs mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert wurden) und die der Nicht-Allergiker, deren PBMCs zum Vergleich ebenfalls mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert wurden, dargestellt. Die Daten zeigen, dass sich die Frequenz candidaspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der SIT und auch im Vergleich zu der von Nicht-Allergikern nicht nennenswert änderte.

Des Weiteren wurde mit dem Mann-Whitney-Test die Frequenz CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell von Wespengiftallergikern vor SIT mit der von Nicht-Allergikern verglichen. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,2734$ ).

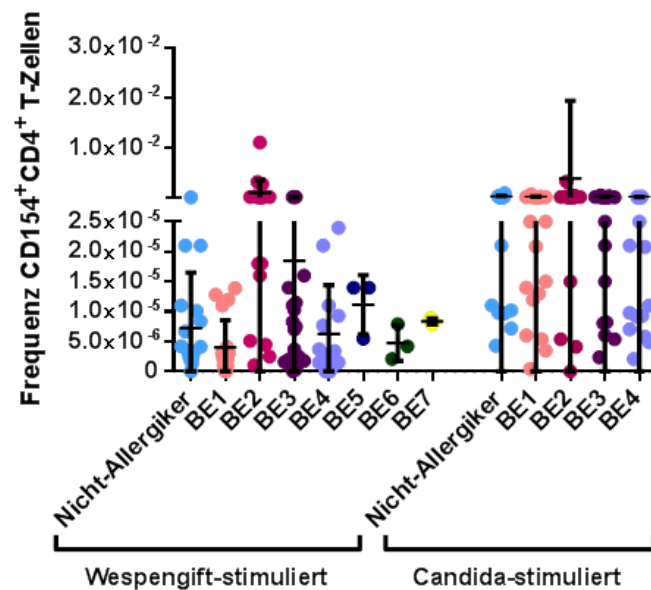


Abbildung 6. Streudiagramm der Frequenz von CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

*Anmerkung.* Das Streudiagramm stellt die Frequenz der an 20 Wespengiftallergikern mit Kontrolle nach 1 Jahr SIT bei drei Probanden gemessenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar. Vergleichend wurden PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert ( $n = 20$ ). **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 1 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 1 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE5:** 1 Woche nach Erhaltungsphase; **BE6:** 1 Jahr SIT und 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE7:** 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsphase.

## 5.2 Antigen-spezifische Gedächtniszellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

Um das antigen-spezifische T-Zellprofil im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie bestimmen zu können, wurden die Frequenzen der verschiedenen Zytokine und Marker wie unter Gliederungspunkt 4.9 beschreiben berechnet und in Streudiagrammen dargestellt. Zusätzlich wurden die durchflusszytometrischen Messungen in Form von FACS Bilder visualisiert, wobei die Bilder einem einzelnen Probanden zugeordnet werden können, um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu ermöglichen (Abbildung 7).

Bei der Auswertung der antigen-spezifischen Gedächtniszellen wurde bereits in den FACS-Bildern ersichtlich, dass die Expression antigen-spezifischer CD45-RO<sup>+</sup> T-Zellen eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase (**BE2**) ihren Maximalwert einnahm und im weiteren Verlauf der SIT wieder abnahm.

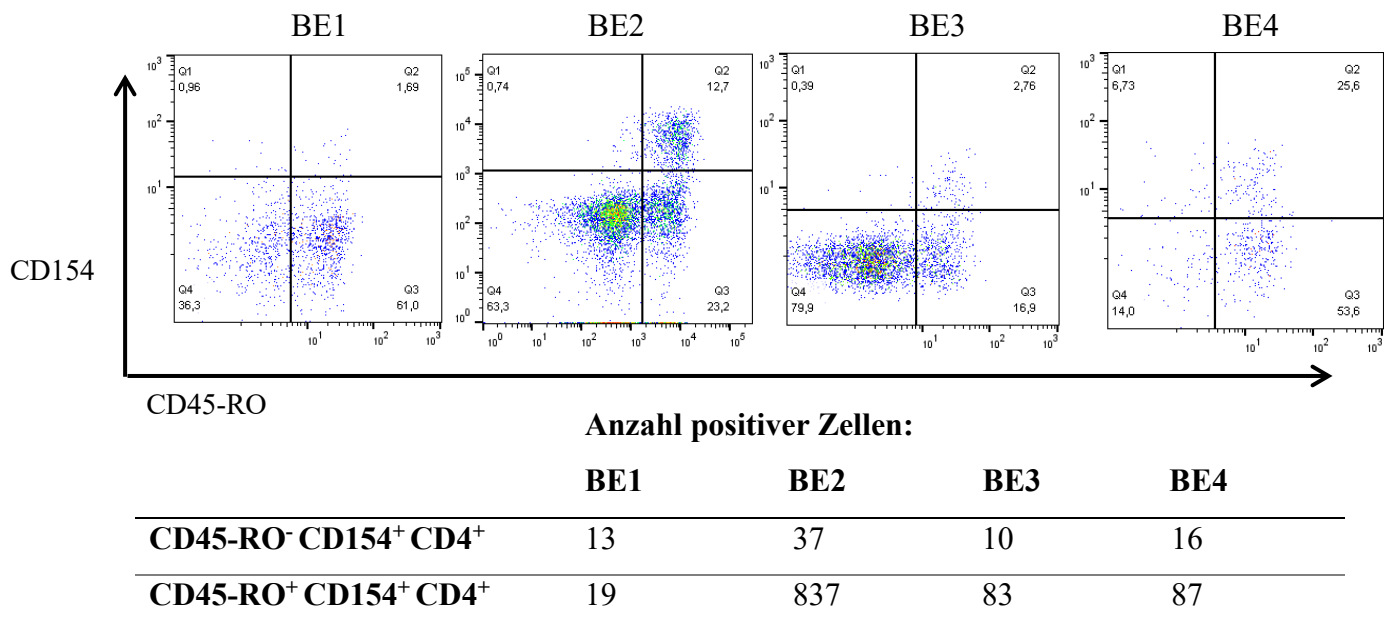


Abbildung 7. FACS Bilder der wespengiftspezifischen Gedächtniszellen.

*Anmerkung.* **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4:** 1 Woche nach Erhaltungsdosis; **Q1:** CD45-RO<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q2:** CD45-RO<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q3:** CD45-RO<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q4:** CD45-RO<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Diese Beobachtung wurde mittels der statistischen Auswertung bestätigt. Mit dem Friedman Test konnte bestätigt werden, dass die Frequenz CD154<sup>+</sup> CD45-RO<sup>+</sup> T-Zellen von **BE1** zu **BE2** mit einem p-Wert von  $p < 0,0001$  signifikant anstieg, um im Anschluss wieder signifikant zu

sinken (**BE2** zu **BE3**:  $p = 0,0057$ ; **BE2** zu **BE4**:  $p < 0,0001$ ; Abbildung 8). Auch die Messwerte ein Jahr nach Beginn der SIT (**BE5**, **BE6**, **BE7**) ergaben, dass die Frequenz der  $CD45\text{-RO}^+ CD154^+ CD4^+$  T-Zellen nicht mehr erneut anstieg, auch wenn eine Woche zuvor ein Wespengiftkontakt stattgefunden hatte (**BE5**, **BE7**).

Der prozentuale Anteil der Gedächtniszellen unter allen antigenspezifischen T-Zellen nahm jedoch innerhalb der ersten Woche der SIT von **BE1** zu **BE2** nicht signifikant zu ( $p = 0,5188$ ; Abbildung 9). Im Vergleich zu den Nicht-Allergikern konnte bei Wespengiftallergikern vor SIT (**BE1**) sowohl bei der Frequenz als auch dem prozentualen Anteil antigenspezifischer Gedächtniszellen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abbildung 8/9).

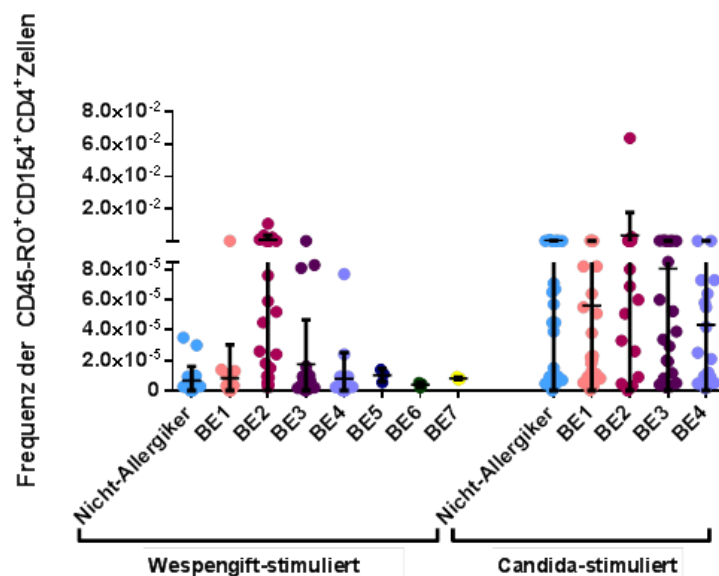


Abbildung 8. Streudiagramm der Frequenz der  $CD45\text{-RO}^+ CD154^+ CD4^+$  T-Zellen.

*Anmerkung:* Das Streudiagramm stellt die Frequenz der  $CD45\text{-RO}^+ CD154^+ CD4^+$  T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie dar. Vergleichend wurden PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (Nicht-Allergiker/ **BE1** – **BE4**:  $n=20$ ; **BE5** – **BE7**:  $n=3$ ). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE5**: 1 Woche nach Erhaltungsphase; **BE6**: 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsphase; **BE7**: 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsphase.

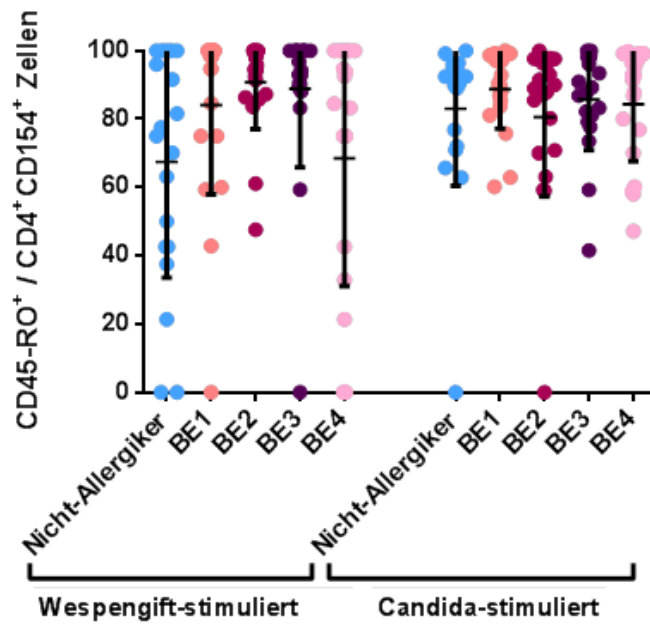


Abbildung 9. Streudiagramm des prozentualen Anteils an CD45-RO<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

*Anmerkung.* Darstellung im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie; vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n = 20). **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsphase.

Im weiteren Verlauf wurden die antigenspezifischen Gedächtniszellen auf die Expression der Zytokine IL-10, IL-4 und IFN- $\gamma$  untersucht. Sowohl die Gedächtniszellen der Nicht-Allergiker als auch die der Wespengiftallergiker produzierten IL-10, wobei die Nicht-Allergiker nicht signifikant mehr antigenspezifische IL-10<sup>+</sup> Gedächtniszellen besaßen als die Wespengiftallergiker vor SIT (p = 0,9826; Abbildung 10). Obwohl bei den Wespengiftallergikern eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase (**BE2**) ein leichter Anstieg der IL-10 sekretierenden Gedächtniszellen beobachtet wurde (Abbildung 10 A/B), war dieser nicht signifikant (p = 0,6236). Lediglich bei den CD45-RO<sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup> IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte ein signifikanter Anstieg innerhalb der ersten Woche der SIT beobachtet werden (p = 0,0180) (Abbildung 10 C).

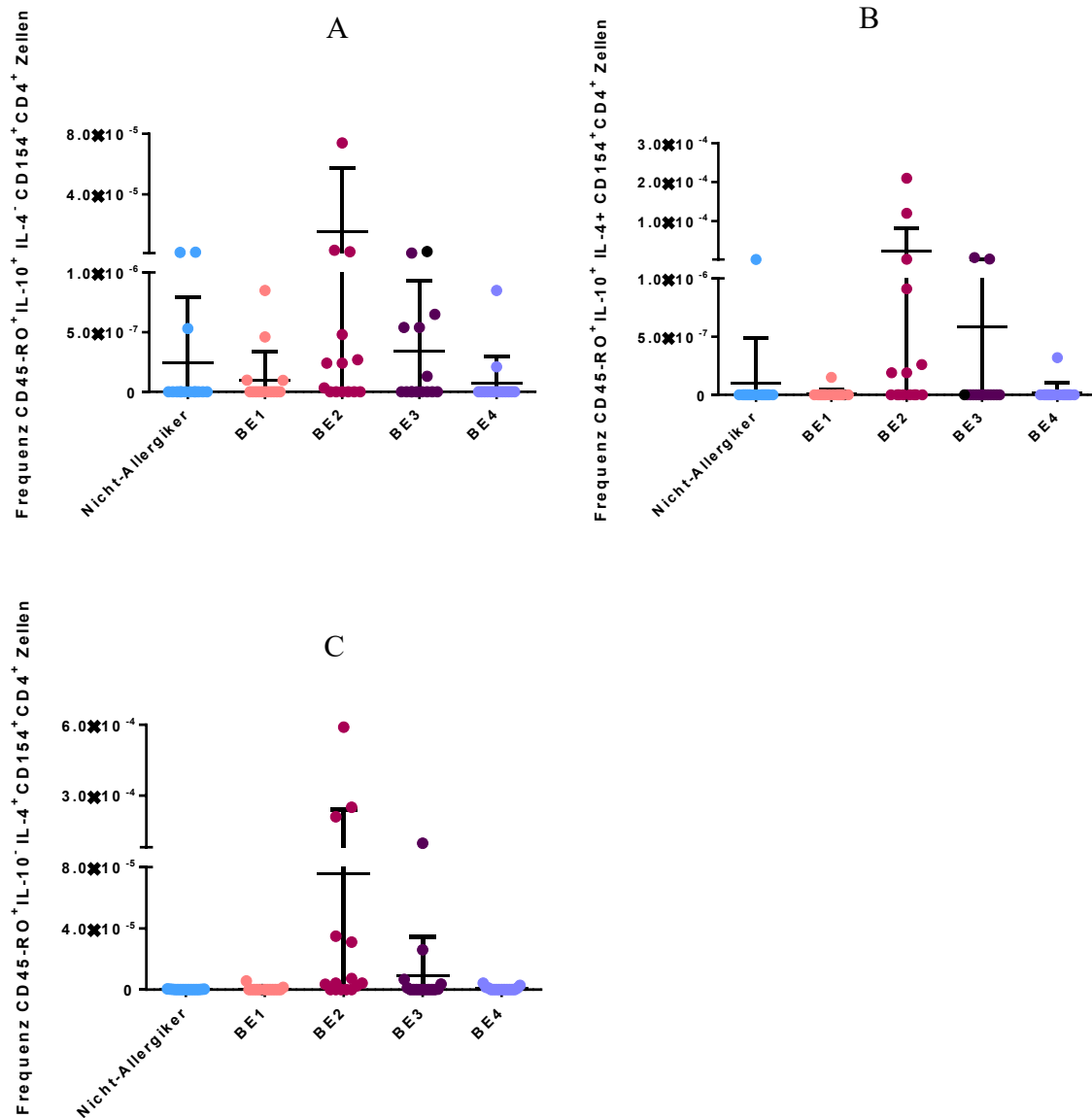


Abbildung 10: Streudiagramm der IL-4 und IL-10 Sekretion von antigenspezifischen Gedächtniszellen.

Anmerkung: Darstellung im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie im Vergleich zu Nicht-Allergikern (n=20). **A**: Frequenz  $CD45-RO^+ IL-10^+ IL-4^-$  T-Zellen; **B**:  $CD45-RO^+ IL-10^+ IL-4^+$ ; **C**:  $CD45-RO^+ IL-10^- IL-4^+$ ; **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsdosis .

Bei der Untersuchung antigenspezifischer  $IFN-\gamma^+$  Gedächtniszellen fiel auf, dass bis auf eine Person die Nicht-Allergiker keine antigenspezifischer  $IFN-\gamma^+$  Gedächtniszellen bildeten und damit nicht von den Wespengiftallergikern vor SIT zu unterscheiden waren. Im Verlauf der SIT produzierten zwar einige Wespengiftallergiker antigenspezifische  $IFN-\gamma^+$  Gedächtniszellen, jedoch war dies nicht signifikant ( $p = 0,0656$ , Abbildung 11).

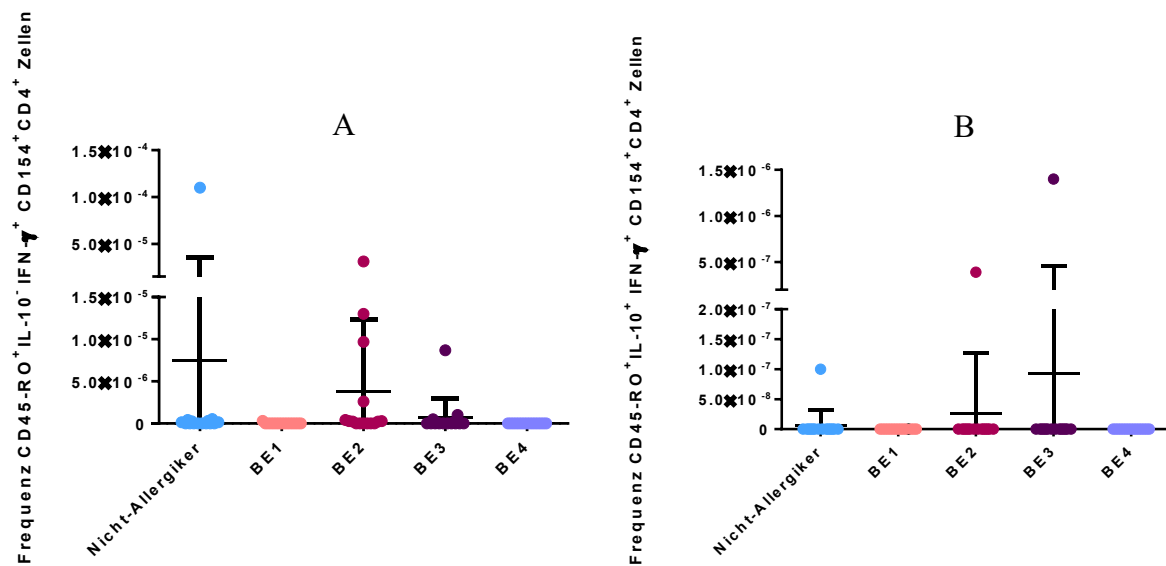


Abbildung 11. Streudiagramm der IFN- $\gamma$  und IL-10 Sekretion von antigenspezifischen Gedächtniszellen.

Anmerkung. Darstellung der IFN- $\gamma$  und IL-10 Sekretion von antigenspezifischen Gedächtniszellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie im Vergleich zu Nicht-Allergikern. **A:** Frequenz CD45-RO<sup>+</sup> IL-10<sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen; **B:** CD45-RO<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>; **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsdosis.

### 5.3 Antigenspezifische IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

Die Auswertungen der IL-2 produzierenden antigenspezifischen Zellen mit der Durchflusszytometrie und dem Friedmann-Test zeigen einen signifikanten Anstieg der Frequenz antigenspezifischer IL-2<sup>+</sup> T-Zellen eine Woche nach Beginn der SIT (**BE1** zu **BE2**:  $p=0,0003$ ), dem im Anschluss ein höchste signifikanten Abfall der Frequenz antigenspezifischer IL-2<sup>+</sup> T-Zellen von **BE2** zu **BE3** ( $p=0,0424$ ) und **BE2** zu **BE4** ( $p=0,0003$ ) folgte (Abbildung 12/13). Kontrollmessungen ein Jahr nach Beginn der SIT (**BE6/BE7**) zeigten ähnliche Ergebnisse, wie sie bereits nach einem (**BE3**) bzw. zwei Monaten (**BE4**) SIT gemessen wurden (Abbildung 13). Bei der Auswertung des prozentualen Anteils IL-2<sup>+</sup> T-Zellen unter allen CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten jedoch keine signifikanten Änderungen beobachtet werden (Abbildung 14). Ebenso ergab der Vergleich von Nicht-Allergikern und Wespengiftallergikern vor SIT (**BE1**) mit dem Mann-Whitney-Test keine signifikanten



Unterschiede in der Frequenz der antigenspezifischen IL-2<sup>+</sup> T-Zellen (p = 0,3782) (Abbildung 13).

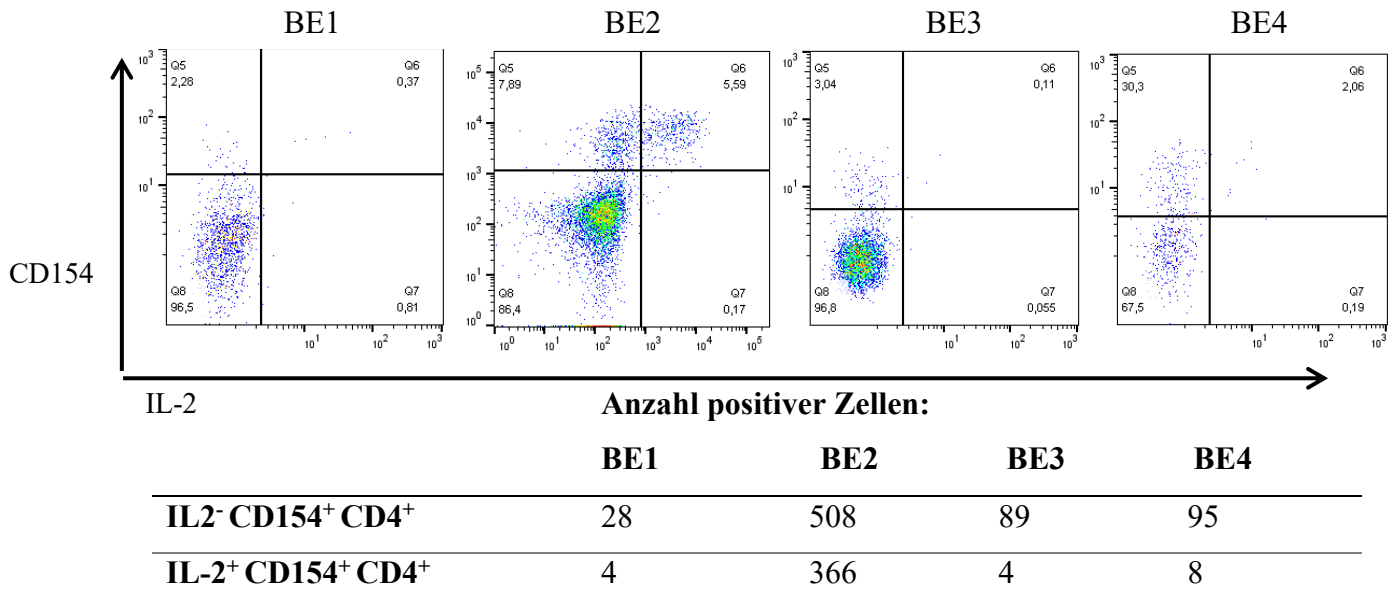


Abbildung 12. FACS Bilder der IL-2<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung: Darstellung in Form eines Streudiagramms. **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **Q5**: IL-2<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q6**: IL-2<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q7**: IL-2<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q8**: IL-2<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

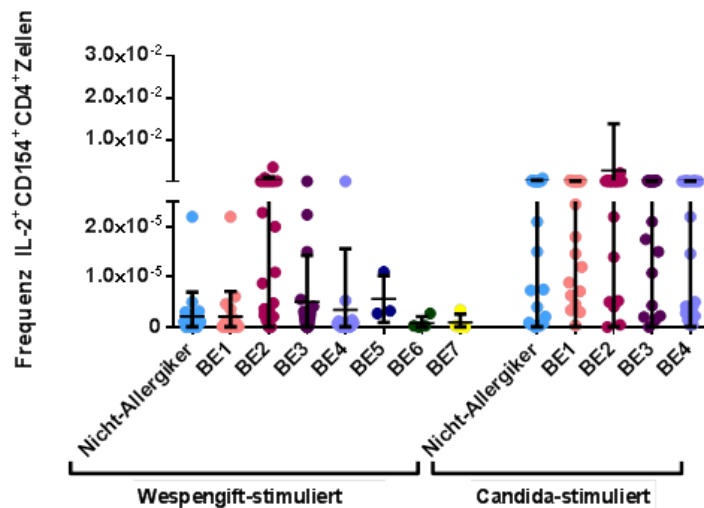


Abbildung 13. Streudiagramm der Frequenz der IL-2<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (Nicht-Allergiker/BE1 - BE4: p = 20; BE5 - BE7: p = 3). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE5**: 1 Woche nach Erhaltungsphase; **BE6**: 1 Jahr SIT und 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE7**: 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsphase.

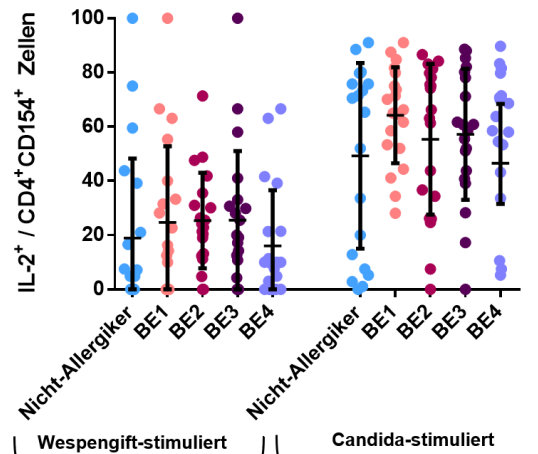


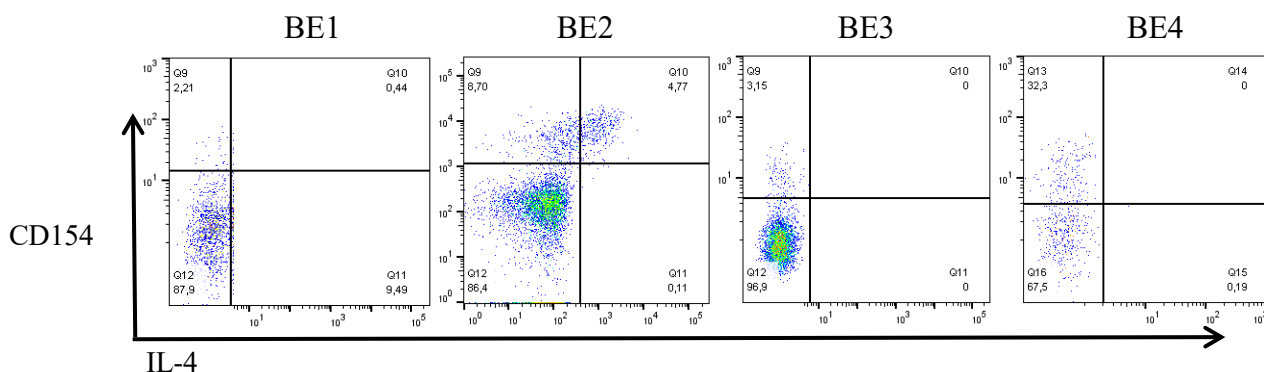
Abbildung 14. Streudiagramm des prozentualen Anteils an IL-2<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurden PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. **BE1**: vor SIT (n=20); **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase.

## 5.4 Antigenspezifische T<sub>H</sub>2-Antwort im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

### 5.4.1 IL-4 produzierende T<sub>H</sub>2-Zellen

Für die Beurteilung der antigenspezifischen T<sub>H</sub>2 Antwort, welche über die Kaskade aus B-Zellaktivierung und IgE Produktion die Sensibilisierung wesentlich mitbeeinflusst, wurde die Expressionsfrequenz der IL-4 produzierenden antigenspezifischen T-Zellen bestimmt. Wie den FACS Bildern zu entnehmen, war die Anzahl der IL-4 produzierenden antigenspezifischen T-Zellen eine Woche nach SIT-Beginn (BE2) am höchsten. Im weiteren Verlauf der SIT sank die Expression wieder, sogar unterhalb des Ausgangswertes (Abbildung 15). Diese Beobachtung wurde durch die statistische Auswertung mit dem Friedman-Test bestätigt (Abbildung 16/17).



	Anzahl positiver Zellen:			
	BE1	BE2	BE3	BE4
IL-4 <sup>-</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	26	558	93	103
IL-4 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	6	316	0	0

Abbildung 15. FACS Bilder der IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Darstellung in Form eines Streudiagramms; **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 3 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **Q9**: IL-4<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q10**: IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q11**: IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q12**: IL-4<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die statistische Auswertung zeigte einen Anstieg der CD154<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz innerhalb der ersten Woche der SIT, welcher mit einem p-Wert von  $p < 0,0001$  signifikant war (Abbildung 16). Ebenso wie die Frequenz stieg auch der prozentuale Anteil der IL-4 produzierenden Zellen unter den CD154<sup>+</sup> T-Zellen signifikant an ( $p = 0,0001$ ; Abbildung 17). Während der Mittelwert vor SIT (**BE1**) noch bei 7,562% lag, stieg er innerhalb einer Woche (**BE2**) auf 35,59% an. Innerhalb der nächsten zwei bzw. sechs Wochen der SIT sank sowohl die Frequenz als auch die Anzahl der IL-4 Produzenten unter den antigenspezifischen T-Zellen wieder und erreichten ähnliche Werte wie vor der SIT (Frequenz **BE2** zu **BE3**:  $p = 0,0018$ ; **BE2** zu **BE4**:  $p < 0,999$ ; Anteil der IL-4 Produzenten unter den antigenspezifischen T-Zellen **BE2** zu **BE4**  $p = 0,0007$ ). Die Kontrolluntersuchungen ein Jahr nach SIT-Beginn bestätigten diese Ergebnisse. Es zeigten sich vergleichbar niedrige Frequenzen CD154<sup>+</sup> IL4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zell, wie sie nach drei Wochen Wespengift-Immuntherapie gemessen wurden. Zudem konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Messung ein Jahr nach SIT-Beginn und eine Woche nach Erhaltungsdosis (**BE7**) und ein Jahr nach SIT-Beginn und vier Wochen nach Erhaltungsdosis (**BE6**) festgestellt werden (Abbildung 16).

Der Vergleich mit den Nicht-Allergikern zeigt, dass auch Nicht-Allergiker wespengiftspezifische IL4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen, wobei mit dem Mann-Whitney-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Wespengiftallergikern vor SIT und den Nicht-Allergikern festgestellt werden ( $p = 0,8603$ , Abbildung 16/17).

Im Hinblick auf die Positivkontrolle, für die PBMCs von Wespengiftallergiker mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert wurden, fiel zwar auf, dass es im Verlauf der SIT zu einem Anstieg der Frequenz candidaspezifischer IL4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen kam (Abbildung 15), jedoch lag der Anteil der IL-4 Produzenten unter diesen candidaspezifischer T-Zellen bei ca. 0% (Abbildung 17).

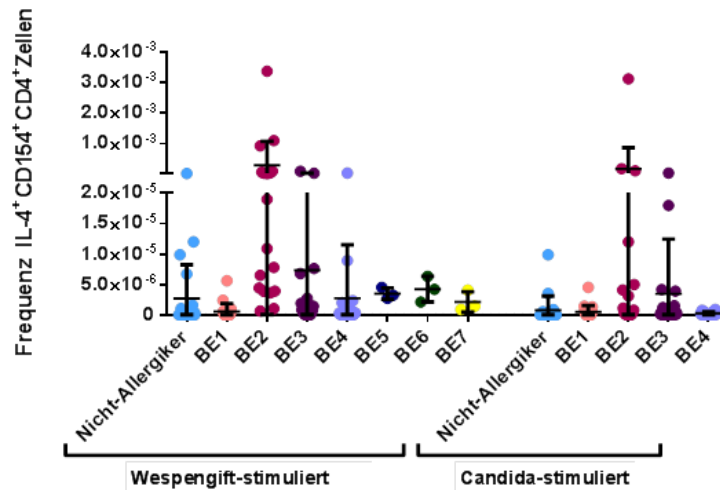


Abbildung 16. Streudiagramm der Frequenz der IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurden PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. (Nicht-Allergiker/ **BE1** – **BE4**: n = 20; **BE5** – **BE7**: n = 3). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE5**: 1 Woche nach Erhaltungsphase; **BE6**: 1 Jahr SIT und 4 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE7**: 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsphase.

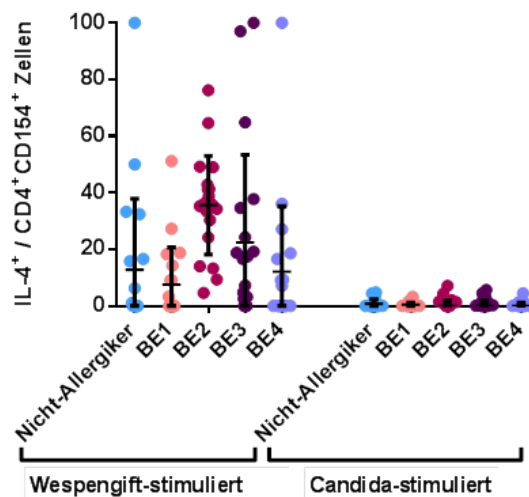
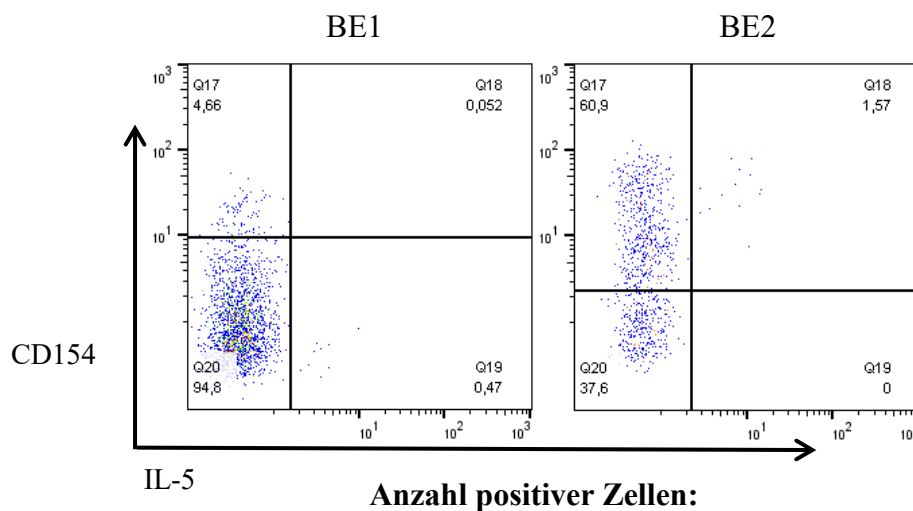


Abbildung 17. Streudiagramm des prozentualen Anteils an IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n = 2). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase

### 5.4.2 IL-5 produzierende TH2-Zellen

Zur Differenzierung der wespengiftspezifischen TH2-Antwort im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie, wurden bei sechs weiteren Probanden die Expression von IL-5, IL-9, IL-13 und Ki-67 produzierenden antigenspezifischen T-Zellen vor SIT und eine Woche nach Beginn der SIT untersucht. Anhand der FACS-Bilder wurde bereits erkennbar, dass vergleichbar mit den Ergebnissen für IL-4 auch die Frequenz der IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der ersten Woche der SIT anstieg (Abbildung 18). Dies wurde auch in der statistischen Auswertung mit dem Wilcoxon-Test ersichtlich (Abbildung 19/20)



	<b>BE1</b>	<b>BE2</b>
<b>IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	21	151
<b>IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup></b>	0	12

Abbildung 18. FACS Bilder von IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T-Zellen.

*Anmerkung:* Streudiagramm im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie. **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT- Steigerungsphase; **Q17:** IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q18:** IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q19:** IL-5<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q20:** IL-5<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz IL5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der ersten Woche der Wespengift-Immuntherapie signifikant mit einem p-Wert von p = 0,0313 anstieg (Abbildung 19). Der prozentuale Anteil der IL-5 Produzenten unter den antigenspezifischen Zellen stieg zwar auch an (Abbildung 20), jedoch war dies nicht signifikant (p = 0,0938). Wie auch schon bei der Auswertung von IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet, zeigten auch hier die Candida stimulierte Zellen nur eine sehr geringe bis keine IL-5 Expression.

Im Vergleich zu den Nicht-Allergikern konnte bei den Wespengiftallergikern vor SIT keine erhöhte IL-5-Expression unter den antigenspezifischen T-Zellen gemessen werden ( $p = 0,4502$ ).

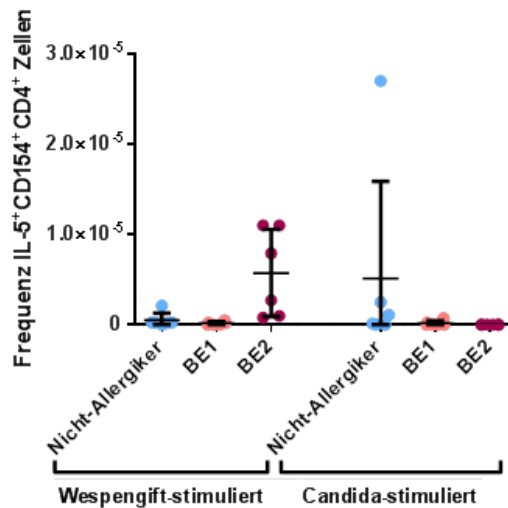


Abbildung 19. Streudiagramm der Frequenz der IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n=6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

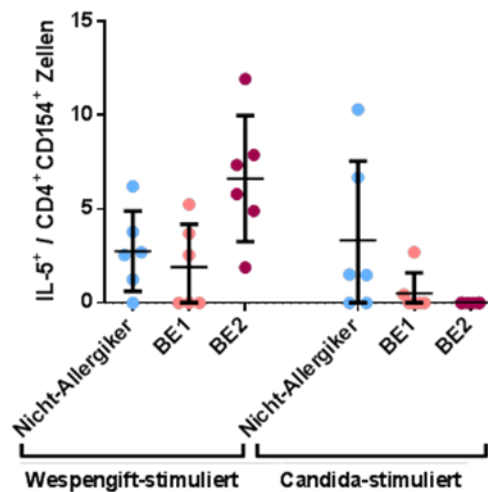


Abbildung 20. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n=6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

### 5.4.3 IL-9 produzierende TH2-Zellen

Die Auswertung der IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen ergab, dass weder die Frequenz noch der Anteil IL-9<sup>+</sup> Zellen unter den CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der ersten Woche der SIT anstieg (p = 0,25). Auch im Vergleich zu den Nicht-Allergikern konnten bei den Wespengiftallergikern vor SIT kein signifikanter Unterschied in der Frequenz IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden (p = 0,25) (Abbildung 21-23).

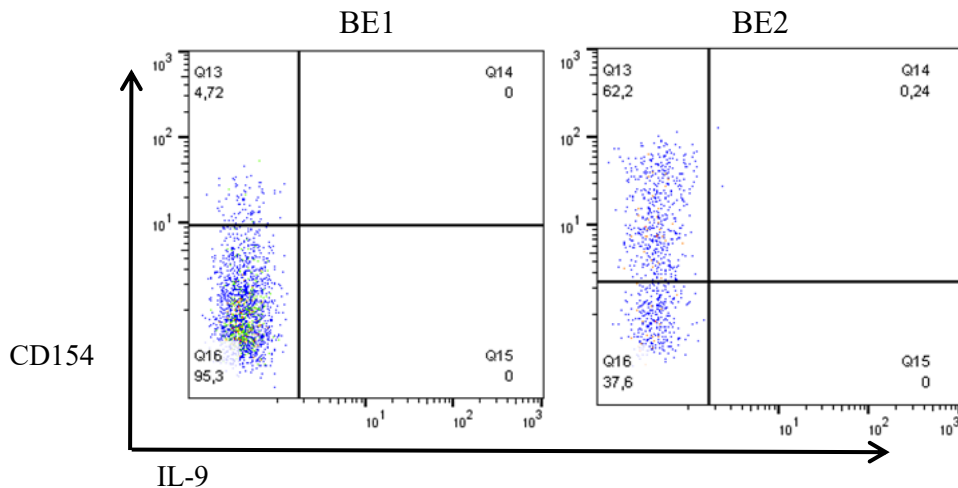


Abbildung 21. FACS Bilder der IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

#### Anzahl positiver Zellen:

	BE1	BE2
IL-9 <sup>-</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	21	161
IL-9 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0	2

*Anmerkung.* Darstellung in Form eines Streudiagramms. **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **Q13:** IL-9<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q14:** IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q15:** IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q16:** IL-9<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

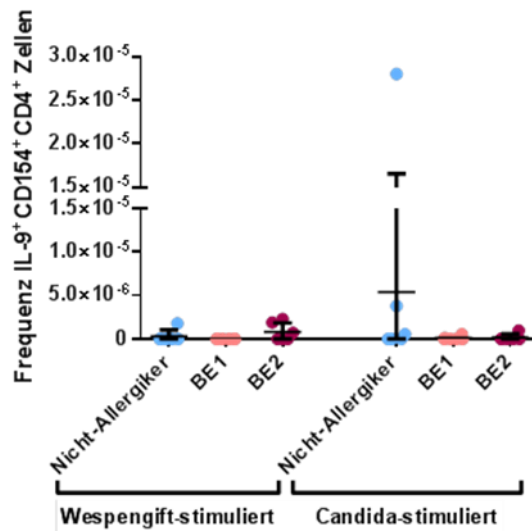


Abbildung 22. Streudiagramm der Frequenz IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n = 6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

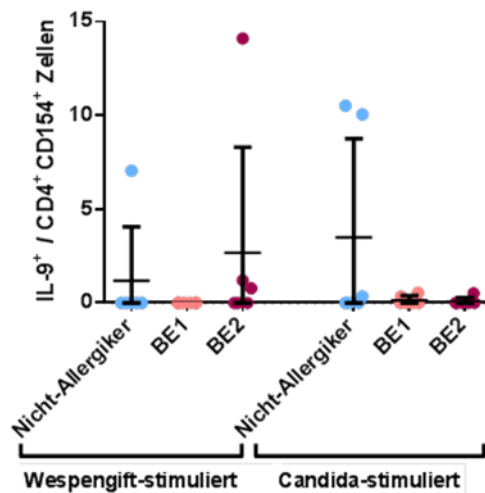


Abbildung 23. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-9<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung: Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n = 6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase



#### 5.4.4 IL-13 produzierende TH2-Zellen

Das Wachstum und die Differenzierung der B-Zellen wird unter anderem durch die Expression von IL-13 angeregt. Im Verlauf der SIT konnte eine zunehmende IL-13 Produktion antigenspezifischer T-Zellen eine Woche nach SIT-Beginn (**BE2**) gemessen werden (Abbildung 24/26), die jedoch auf Grund der geringen Stichprobe von 6 Probanden nicht signifikant war ( $p = 0,3125$ ) (Abbildung 26). Bei der Auswertung der Frequenz der IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen war hingegen ein signifikanter Anstieg eine Woche nach SIT-Beginn messbar ( $p = 0,313$ ) (Abbildung 25). Im Vergleich zu den Nicht-Allergikern konnte jedoch bei den Wespengiftallergikern vor SIT kein Unterschied in der Frequenz IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden.

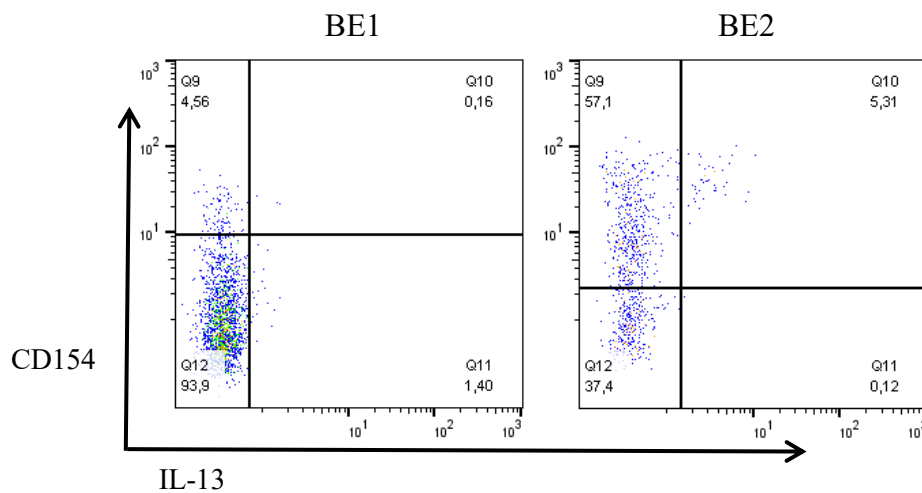


Abbildung 24. FACS Bilder der IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

#### Anzahl positiver Zellen:

	BE1	BE2
IL-13 <sup>-</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	21	122
IL-13 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0	41

Anmerkung. **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **Q9**: IL-13<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q10**: IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q11**: IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q12**: IL-13<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

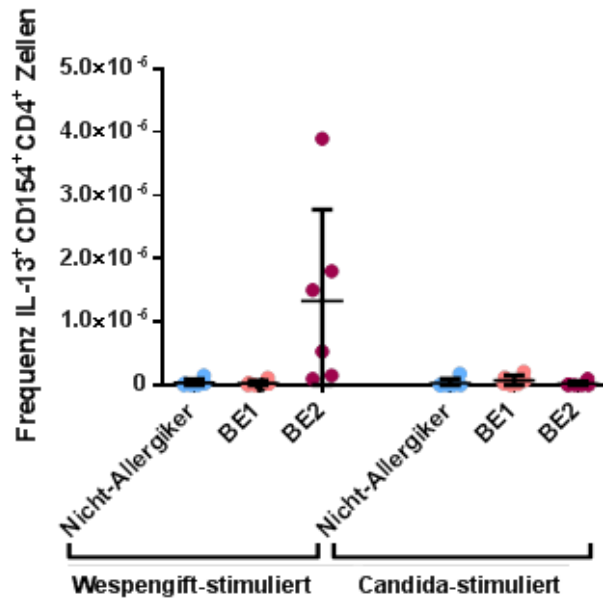


Abbildung 25. Streudiagramm der Frequenz IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n=6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

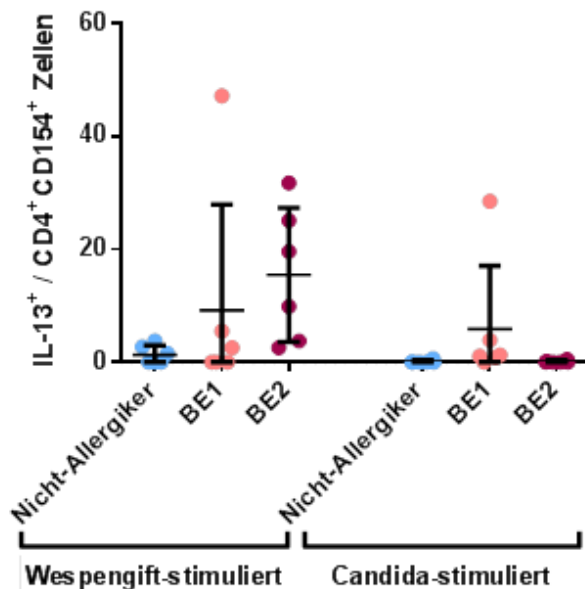


Abbildung 26. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n = 6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

## 5.5 Antigen-spezifische IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

Auch wenn in den hier dargestellten FACS-Bildern eines Probanden kein Anstieg der antigen-spezifischen IL-10 Sekretion im Verlauf der SIT beobachtet wurde (Abbildung 27), so ergab die statistische Auswertung aller 20 Probanden dennoch einen Anstieg der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz innerhalb der ersten Woche der SIT (**BE1**) der mit einem p-Wert von  $p=0,0292$  signifikant war. Die nachfolgende Frequenzabnahme in den folgenden sechs Wochen (**BE4**) war ebenfalls signifikant ( $p=0,0133$ ) (Abbildung 28). Untersuchungen nach einem Jahr SIT ergaben, dass sich die Frequenz IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb des Jahres SIT nicht mehr signifikant im Vergleich zu den Werten, die einen Monat nach SIT-Beginn gemessen wurden, veränderten. Stattdessen lagen die Frequenzen der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach einem Jahr SIT noch unter den Werten, die nach einem Monat SIT gemessen wurde (**BE6**, **BE7**, Abbildung 28).

Bei Betrachtung des prozentualen Anteils der IL-10 produzierenden Zellen unter den CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte beobachtet werden, dass über den Zeitraum aller Messungen dieser Forschungsstudie (**BE1 – BE4**) der Mittelwert bei ungefähr 3 % lagen und damit keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der SIT abgeleitet werden konnte (Abbildung 29).

Des Weiteren wurde die Frequenz der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Wespengiftallergiker vor SIT mit der von Nicht-Allergikern verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der Nicht-Allergiker mit einem Mittelwert von  $7,0 \cdot 10^{-7}$  über dem von Wespengiftallergikern vor SIT lag ( $9,8 \cdot 10^{-8}$ ), was allerdings nicht signifikant war ( $p = 0,325$ ).

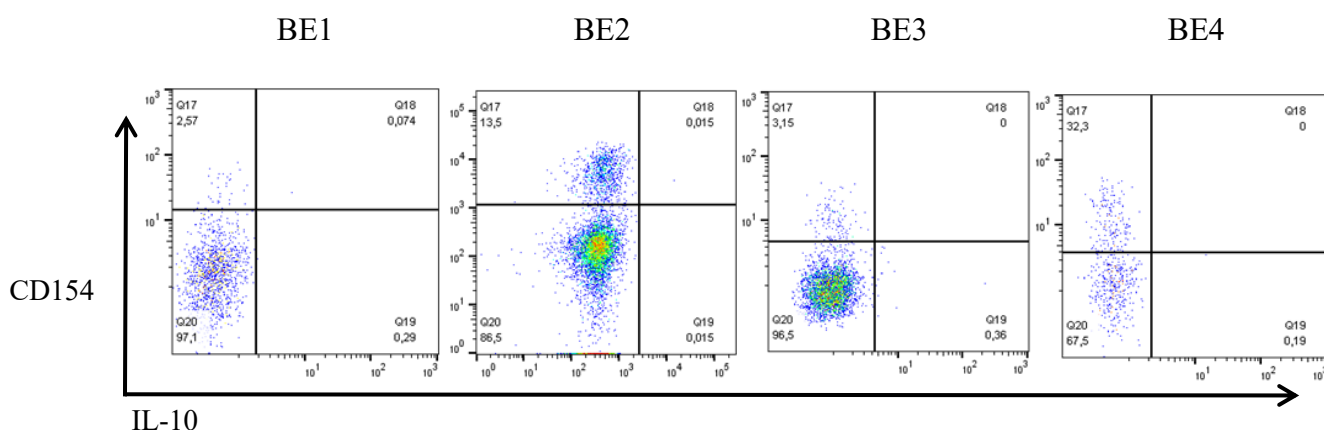


Abbildung 27. FACS Bilder der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

	Anzahl positiver Zellen:			
	BE1	BE2	BE3	BE4
IL-10 <sup>-</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	26	558	93	103
IL-10 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	6	316	0	0

*Anmerkung.* **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **Q17:** IL-10<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q18:** IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q19:** IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q20:** IL-10<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **Q17:** IL-10<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q18:** IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q19:** IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q20:** IL-10<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

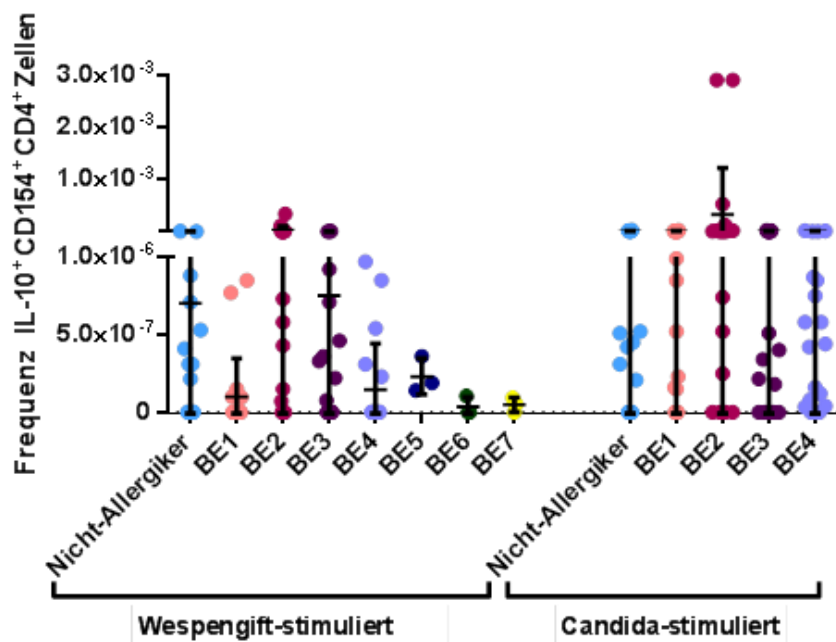


Abbildung 28. Streudiagramm der Frequenz IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T-Zellen.

*Anmerkung.* Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. (Nicht-Allergiker/ **BE1** – **BE4:** n = 20; **BE5** – **BE7:** n = 3). **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE5:** 1 Woche nach Erhaltungsdosis; **BE6:** 1 Jahr SIT und 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE7:** 1 Jahr SIT und 1 Wochen nach Erhaltungsdosis.

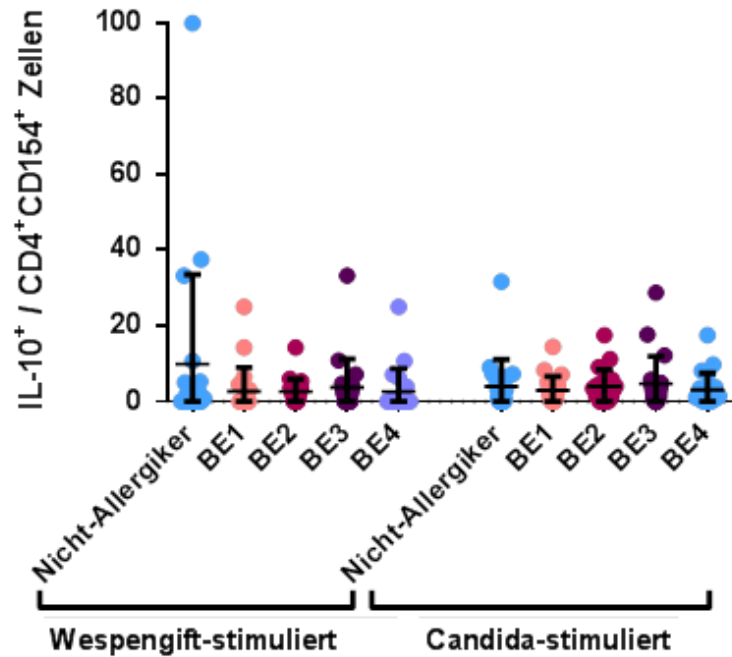


Abbildung 29. Streudiagramm des prozentualen Anteils IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n=20). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase

Das Zytokin IL-10 kann von regulatorischen T-Zellen, T<sub>H</sub>2-Zellen und vielen weiteren Zellen sekretiert werden. Um zu überprüfen, ob die IL-10-Expression, die bei einigen Probanden eine Woche nach SIT-Beginn beobachtet wurde (Abbildung 29) von T<sub>H</sub>2- Zellen oder regulatorischen T- Zellen ausging, wurden die IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen der drei Probanden mit der stärksten IL-10 Aktivität weiter untersucht. Während die gleichzeitige Expression von IL-4 und IL-10 für eine T<sub>H</sub>2 Herkunft spräche, könnte die alleinige IL-10 Sekretion dieser Zellen eher ein Indiz für regulatorische T-Zellen sein. Die Auswertung ergab, dass 50 der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusätzlich IL-4 exprimierten, während ausschließlich vier der 54 gezählten CD154<sup>+</sup> Zellen keine IL-4 sekretierten. Damit exprimierten 76,19 % der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusätzlich IL-4 (Abbildung 30).

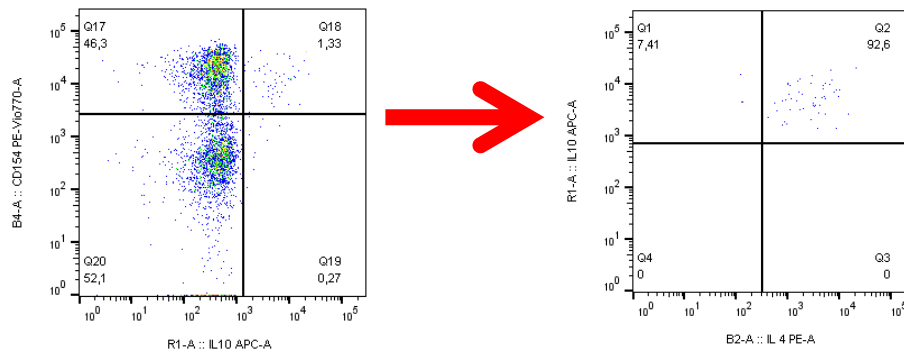


Abbildung 30. FACS-Bilder eines Wespengiftallergikers mit hoher IL-10 Aktivität.

Anmerkung: Bildaufnahme eine Woche nach Beginn der SIT (BE2) zur Untersuchung der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Gate Q18) auf eine gleichzeitige IL-4 Expression. Von 54 IL-10<sup>+</sup> antigenspezifische T-Zellen waren 50 zusätzlich IL-4<sup>+</sup>.

## 5.6 Antigen-spezifische IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Antwort im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

INF- $\gamma$  ist ein Marker für die T<sub>H</sub>1-Zellantwort, der bei der Allergieentstehung eher eine untergeordnete Rolle spielt. Um zu untersuchen, wie sich die antigen-spezifische T<sub>H</sub>1-Antwort im Verlaufe einer Wespengift-Immuntherapie verhält, wurden IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der SIT untersucht.

Obwohl bei drei Wespengiftallergikern ein Anstieg der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz eine Woche nach SIT- Beginn gemessen werden konnte, auf den ein signifikante Abnahme folgte (BE2 zu BE4: p = 0,2243), waren bei den restlichen 17 Wespengiftallergikern keine signifikanten Änderungen der antigen-spezifischen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf der SIT-Einleitungsphase zu verzeichnen (Abbildung 31/32). Diese Beobachtung konnte durch die Auswertung des prozentualen Anteils IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen unter den antigen-spezifischen T-Zellen im Verlauf der SIT bestätigt werden. Der Anteil IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen unter den wespengift-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen war mit einem Mittelwert unter 10% über die ersten zwei Monate der SIT konstant (Abbildung 33). Die Kontrolluntersuchung nach einem Jahr SIT (BE6, BE7) ergab ebenfalls eine geringe IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellfrequenz ohne, dass signifikante Unterschiede zu den Ergebnissen, die nach zwei Monaten SIT erhoben wurden, festgestellt werden konnten.

Zudem konnte beobachtet werden, dass sich Nicht-Allergiker von Wespengiftallergikern vor SIT nicht signifikant in der antigen-spezifischen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellantwort unterschieden (Abbildung 32/33).

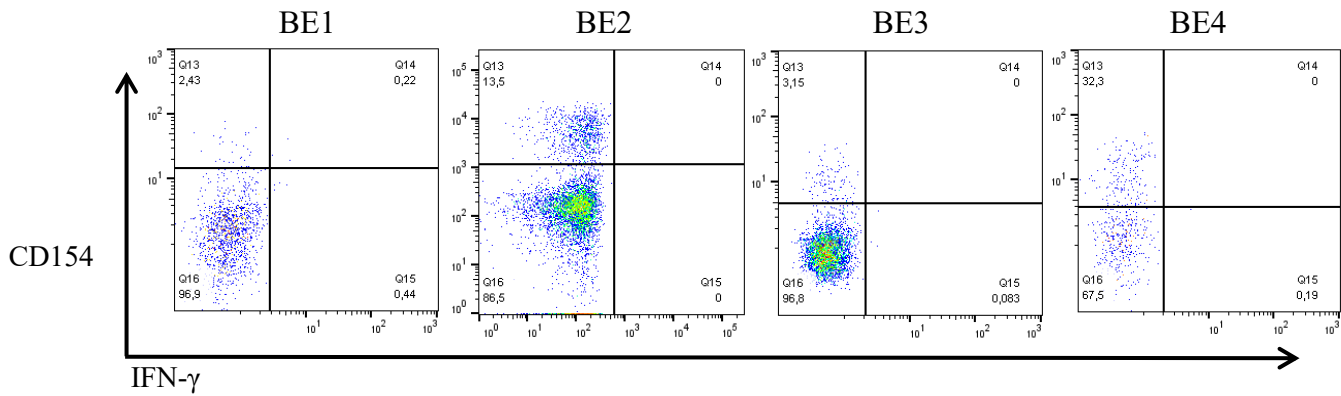


Abbildung 31. FACS Bilder der IFN- $\gamma^+$  CD154 $^+$  CD4 $^+$  T-Zellen.

Anzahl positiver Zellen:				
	BE1	BE2	BE3	BE4
Q13: IFN- $\gamma^-$ CD154 $^+$ CD4 $^+$	29	874	93	103
Q14: IFN- $\gamma^+$ CD154 $^+$ CD4 $^+$	3	0	0	0

Anmerkung. **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **Q13**: IFN- $\gamma^-$  CD154 $^+$  CD4 $^+$  T-Zellen; **Q14**: IFN- $\gamma^+$  CD154 $^+$  CD4 $^+$  T-Zellen; **Q15**: IFN- $\gamma^-$  CD154 $^-$  CD4 $^+$  T-Zellen; **Q16**: IFN- $\gamma^-$  CD154 $^-$  CD4 $^+$  T-Zellen.

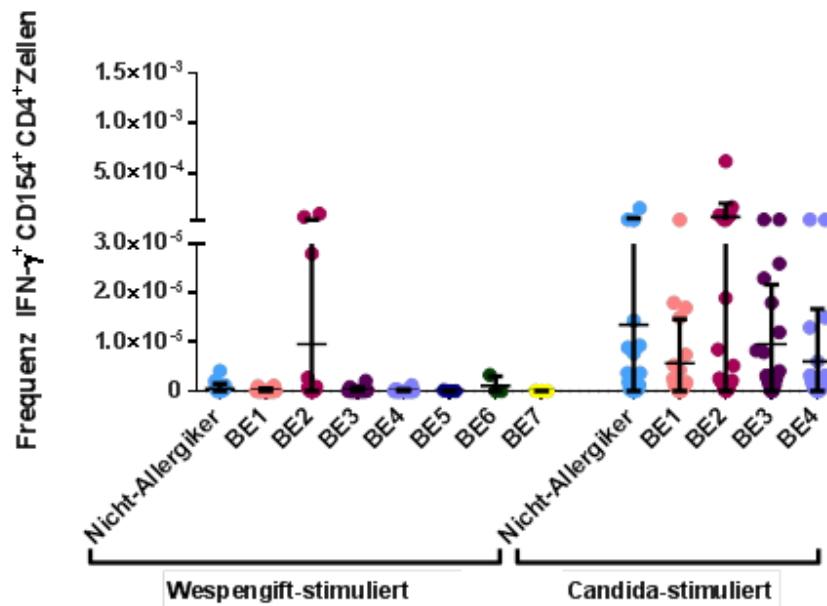


Abbildung 32. Streudiagramm der Frequenz IFN- $\gamma^+$  CD154 $^+$  CD4 $^+$  T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert, (Nicht-Allergiker/ **BE1** – **BE4**: n = 20; **BE5** – **BE7**: n = 3). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE5**: 1 Woche nach Erhaltungsdosis; **BE6**: 1 Jahr SIT und 4 Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE7**: 1 Jahr SIT und 1 Woche nach Erhaltungsdosis.

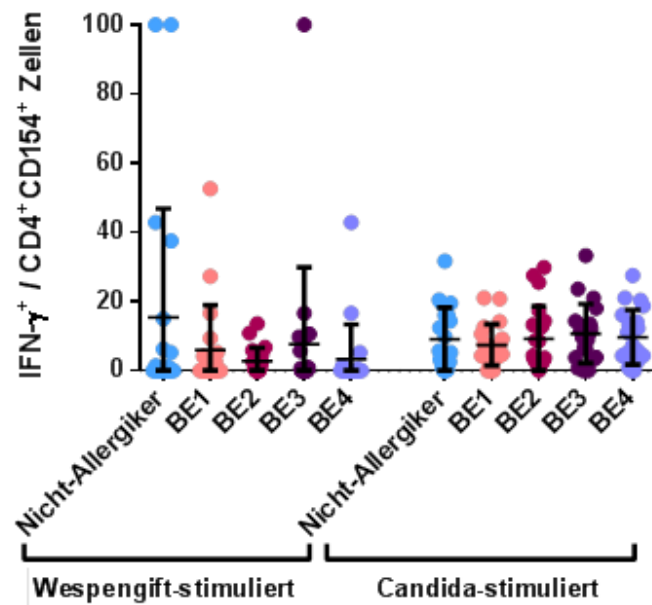


Abbildung 33. Streudiagramm des prozentualen Anteils IFN- $\gamma^+$  CD154 $^+$  CD4 $^+$  T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n=20). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase.

## 5.7 Antigen-spezifische Ki-67 $^+$ CD4 $^+$ T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

Um zu überprüfen, ob der kurzzeitig gemessene Anstieg wespengiftspezifischer T-Zellen eine Woche nach der SIT-Einleitung Folge eines Differenzierungsprozesses war oder ob die wespengiftspezifischen T-Zellen proliferierten, wurden wespengiftspezifische T-Zellen auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht. Die Ergebnisse dieser Messung ergab zwar einen leichten Anstieg der Ki-67 $^+$ CD154 $^+$  T-Zellenfrequenz und des Ki-67 $^+$  T-Zellen Anteils, jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant ( $p = 0,0625$ ) (Abbildung 34-36).

Zudem war aus den Auswertungen zu entnehmen, dass auch Nicht-Allergiker den Proliferationsmarker Ki-67 exprimierten. Jedoch war der Unterschied zu den Wespengiftallergikern vor SIT nicht signifikant ( $p = 0,6$ ).



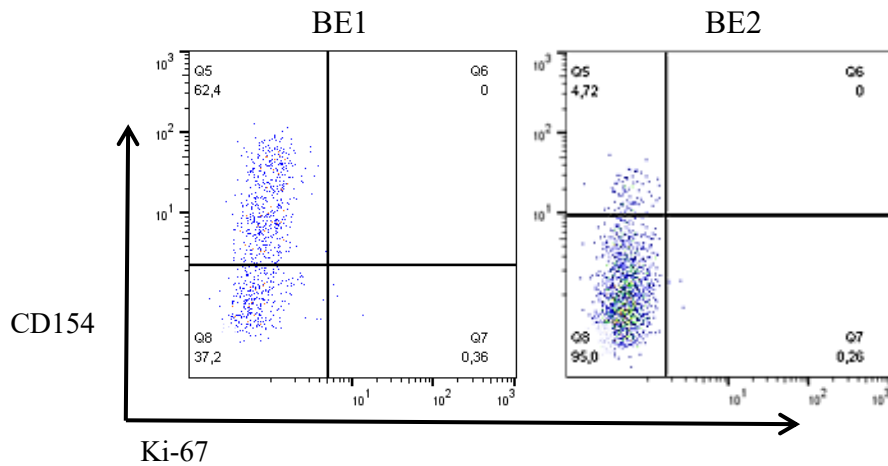


Abbildung 34. FACS Bilder der Ki-67<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **Q5**: Ki-67<sup>-</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q6**: Ki-67<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q7**: Ki-67<sup>+</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen; **Q8**: Ki-67<sup>-</sup> CD154<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

	Anzahl positiver Zellen:	
	BE1	BE2
Ki-67 <sup>-</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	21	163
Ki-67 <sup>+</sup> CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0	0

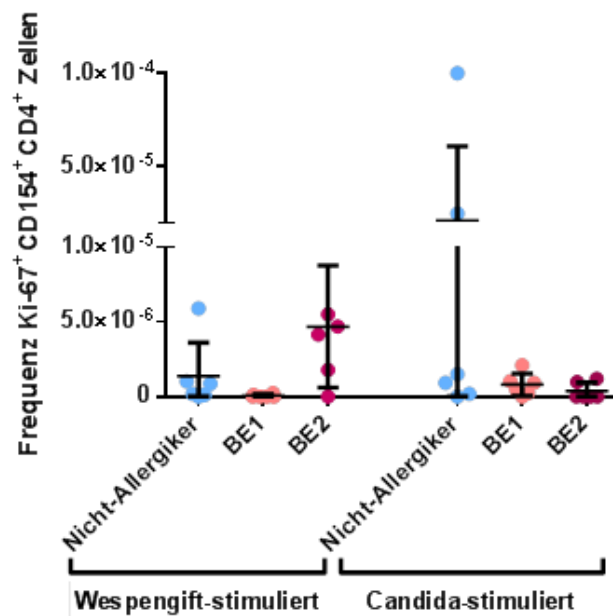


Abbildung 35. Streudiagramm Frequenz Ki-67<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n=6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

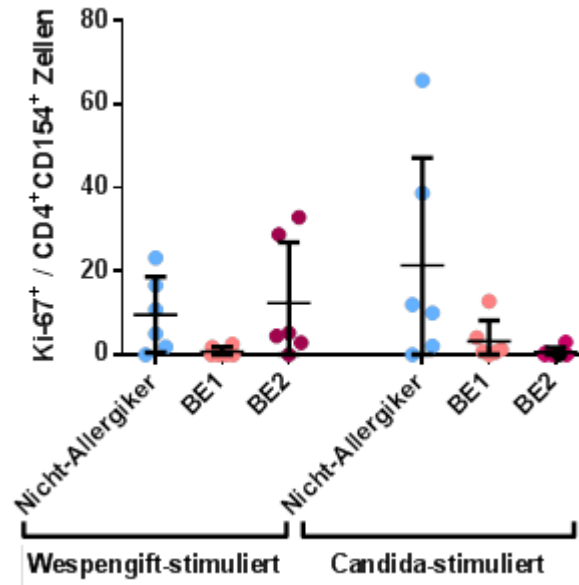


Abbildung 36. Streudiagramm des prozentualen Anteils Ki-67<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den antigenspezifischen T-Zellen.

Anmerkung. Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert (n = 6). **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase.

## 5.8 Korrelation zwischen Klinik und Messergebnissen

Von allen Probanden, die an der Untersuchung teilnahmen, wurden klinische Daten erhoben, um diese mit den Ergebnissen der Datenanalyse zu vergleichen. Dabei fiel auf, dass weder das Alter, noch das Geschlecht der Probanden wesentlichen Einfluss auf die antigenspezifische T-Zellantwort zu nehmen schienen. So kam es sowohl bei den unter 50-Jährigen als auch bei den über 60-Jährigen (Abbildung 37), genauso wie bei Männern und Frauen (Abbildung 38) zu einem Anstieg der IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Woche nach Beginn der SIT, dem eine signifikante Abnahme zu den Ausgangswerten folgte.

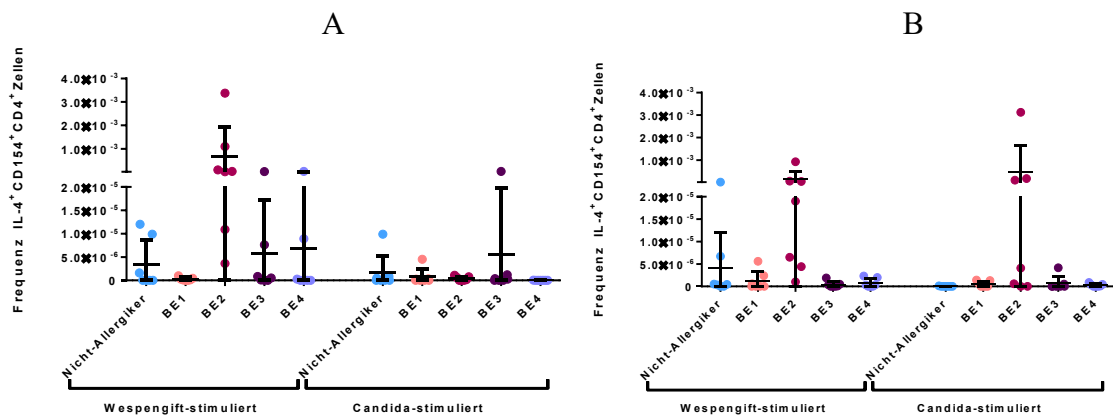


Abbildung 37. Streudiagramm der Frequenz IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Wespengiftallergiker.

Anmerkung. **A:** unter 50 Jahre alte Wespengiftallergiker (n=7); **B:** über 60 Jahre alte Wespengiftallergiker (n = 6); vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsdosis.

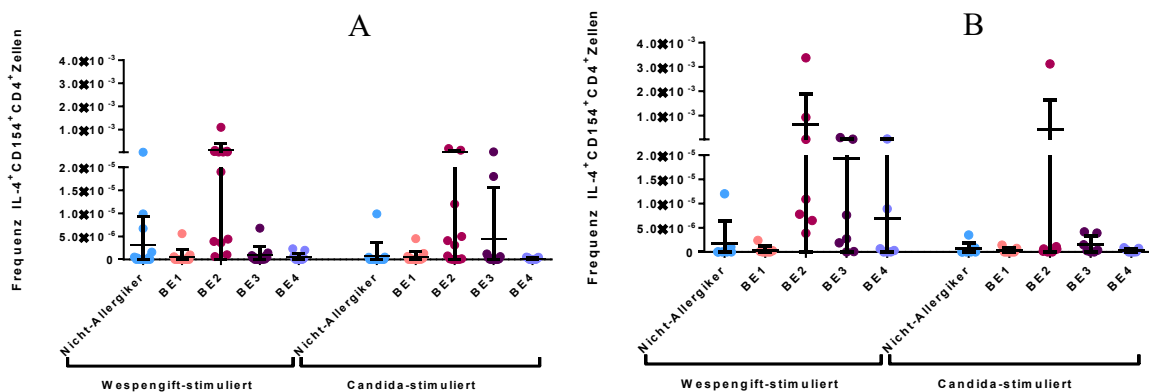


Abbildung 38. Streudiagramm der Frequenz IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit vom Geschlecht der Wespengiftallergiker.

Anmerkung. **A:** Männer (n = 13), **B:** Frauen (n = 7). Vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsdosis.

Bei einem Blick auf die Begleitdiagnosen der Probanden fiel auf, dass Probanden die neben der Wespengiftallergie auch an Asthma oder allergischer Rhinitis litten, einen besonders hohen Anstieg der Frequenz IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Woche nach der Einleitungsphase (BE2) aufwiesen. Im weiteren Verlauf der SIT sank aber auch bei diesen Probanden die Frequenz IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wieder (Abbildung 39).

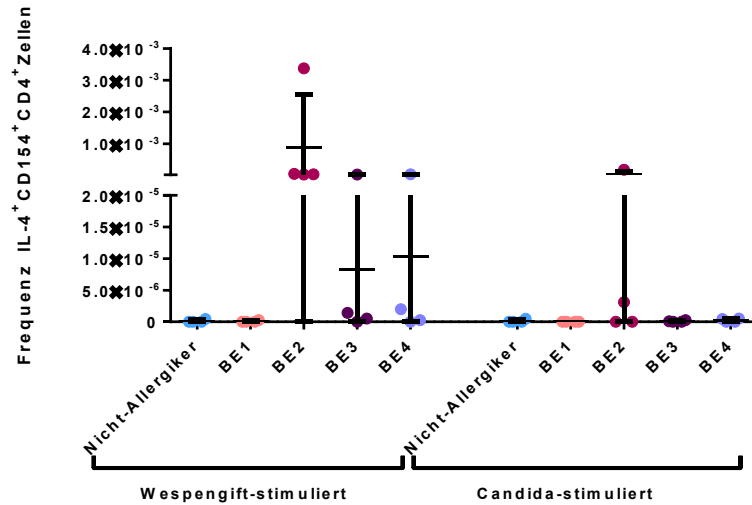


Abbildung 39. Streudiagramm der Frequenz IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Wespengiftallergikern, die gleichzeitig an Asthma oder allergische Rhinitis litten.

Anmerkung. n=4; vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. **BE1**: vor SIT; **BE2**: 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3**: 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4**: 4 Wochen nach Erhaltungsphase.

Auf der anderen Seite zeigte jedoch die Schwere einer Wespenstichreaktion keine Korrelation mit den gemessenen Frequenzen IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Denn sowohl Probanden mit einer Müller Grad-II Reaktion, als auch Probanden mit einer Müller Grad IV Reaktion wiesen hohe, aber auch niedrige Frequenzen IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 40) auf.

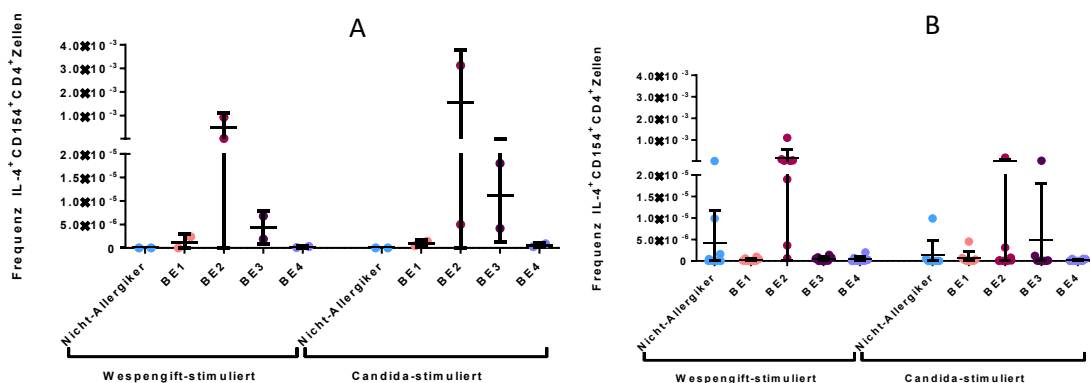


Abbildung 40. Streudiagramm der Frequenz IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie (BE1/BE2/BE3/BE4) in Abhängigkeit vom anamnestisch erhobenen Müller-Grad.

*Anmerkung.* **A:** Müller Grad II (n = 2); **B:** Müller Grad IV (n=8); vergleichend wurde PBMCs von Wespengiftallergikern mit dem Candida-Antigen MP65 stimuliert und PBMCs von Nicht-Allergikern mit Wespengift bzw. Candida-Antigen MP65 stimuliert. **BE1:** vor SIT; **BE2:** 1 Woche nach der SIT-Steigerungsphase; **BE3:** 2 Wochen nach Erhaltungsphase; **BE4:** 4 Wochen nach Erhaltungsphase.

## 6 Diskussion

Seit 30 Jahren wird die SIT als derzeit einzige kausale Therapiemöglichkeit zur Behandlung einer Wespengiftallergien eingesetzt. Obwohl die Wirksamkeit der SIT in vielen Studien bestätigt wurde (Müller et al. 1979; Hunt et al. 1978), ist der immunologische Wirkmechanismus dieser Therapie insbesondere der Einfluss antigenspezifischer T-Zellen noch nicht vollständig verstanden und Studien sind durch geringe T-Zellfrequenzen in der Peripherie begrenzt. In dieser Untersuchung wurde das antigenspezifische T-Zellprofil während der Einleitungsphase der Wespengift-Immuntherapie bei 25 Wespengiftallergikern mittels der Durchflusszytometrie unter Anwendung des ARTE-Protokolls ex-vivo charakterisiert.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde beobachtet, dass innerhalb der ersten Woche der SIT die Anzahl wespengiftspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen und wespengiftspezifischer IL-4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant zunahm, um im weiteren Verlauf der SIT schnell wieder auf Ausgangswerte zu sinken. Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse von IL-5<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> und CD45-RO<sup>+</sup> T-Zellen. Ein Anstieg von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-10<sup>+</sup> T-Zellen war hingegen zu keinem Zeitpunkt der Studie messbar.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit der bisherigen Literatur verglichen und diskutiert. Zentral sind etwaige neue Erkenntnisse und deren möglicher Beitrag zum besseren Verständnis der immunologischen Mechanismen einer Wespengift-Immuntherapie. Auch soll diskutiert werden, welchen Vorteil das ARTE Verfahren gegenüber den bisherigen Untersuchungsmethoden liefert, um antigenspezifischer T-Zellen im Verlauf einer SIT zu untersuchen und zu charakterisieren

## 6.1 Diskussion des ARTE-Protokolls zur Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen

Das humane T-Zellrepertoire erlaubt eine Reaktion auf viele verschiedene Antigene; impliziert jedoch, dass die Anzahl antigenspezifischer T-Zellen sehr gering ist (vorliegend kam auf  $10^5$ - $10^6$   $CD4^+$  T-Zellen ca. eine antigenspezifische T-Zelle). Daher musste eine große Zellpopulation untersucht werden, um eine qualitative Aussage über das Verhalten wespengiftspezifischer T-Zellen im Verlauf einer SIT treffen und das wespengiftspezifische T-Zellprofil zu charakterisieren. Mit dem neuartigen ARTE Verfahren ist es möglich, Zellpopulationen von bis zu  $10^7$  –  $10^9$  Zellen auf antigenspezifischer T-Zellen zu untersuchen (Bacher et al. 2013b; Bacher et al. 2014). Dafür wurden PBMCs von Wespengiftallergikern im Verlauf der SIT für sieben Stunden mit Wespengift und zwei Stunden mit Brefeldin A stimuliert und anschließend über CD154 (CD40L) magnetisch angereichert und mit der Durchflusszytometrie charakterisiert. Dadurch war es möglich nach nur kurzer Stimulation wespengiftspezifische T-Zellen direkt und ex-vivo nachzuweisen, unabhängig davon, gegen welches Epitop des Wespengifts die wespengiftspezifischen T-Zellen gerichtet sind. Dies ist ein enormer Vorteil gegenüber der MHC-II- Peptid-Tetramer Technologie, bei der das Tetramer – ein Komplex aus einem löslichen rekombinanten MHC-Molekül und einem spezifischen Antigen-Peptid - bekannt sein muss, um diese biotechnologisch herzustellen und damit antigenspezifische T-Zellen nachzuweisen. Auf Grund der extrem hohen Anzahl unterschiedlicher T-Zell-Antigene als Folge des starken Polymorphismus von MHC-Genen ist die Anzahl der genau definierten MHC-II-Peptid-Kombinationen im Vergleich zu den tatsächlichen Kombinationsmöglichkeiten sehr gering. Folglich können mit der Tetramer-Methode nur wenige  $CD4^+$  T-Zellspezifitäten nachgewiesen werden, sodass bedacht werden muss, dass die T-Zellspezifität sowohl zwischen den Probanden als auch im Verlauf der verschiedenen Erkrankungsstadien variieren kann (Bacher/ Scheffold 2015; Dillon et al. 2015; Schulten et al. 2018). So ist es zum Beispiel möglich, dass antigenspezifische T-Zellen mit der Tetramer-Methode übersehen werden, wenn der T-Zell-Rezeptor gegen ein anderes als das vom MHC-II-Peptid-Tetramer-Komplex präsentierte Epitop gerichtet ist. Denn bei der Tetramer-Methode werden meistens Epitop-spezifische T-Zellen identifiziert, die gegen das Hauptallergen gerichtet sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich T-Zellen gegen unterschiedliche Epitope eines Allergens richten können, die zudem nicht im Hauptallergen enthalten sein müssen (Dillon et al. 2015; Schulten et al. 2018; Schulten/Peters/Sette 2014; Bacher et al. 2016). Diese T-Zellen könnten tatsächlich nicht von der Tetramer-Methode erkannt werden, obwohl sie für das Untersuchungsergebnis eventuell relevant wären. Mit der

ARTE-Technik kann dieses Problem umgangen werden, da antigenspezifische T-Zellen unabhängig ihrer T-Zellspezifität über die Expression des Aktivierungsmarker CD154 (CD40L) nachgewiesen werden, der 5 – 7 h nach Antigenstimulation auf naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird (Bacher/ Scheffold 2015). Es wurde das gleiche Allergenextrakt zur Stimulation verwendet werden, wie er für die SIT verwendet wurde. Bei dem verwendeten Wespengift handelte es sich um das Produkt Venomil® Wespe des Herstellers Bencard®, das aus einem Wespengiftgemisch fünf verschiedener Wespenspezies Nordeuropas und Nordamerikas zusammengestellt wird (Banghard 2019), wodurch Wespengiftallergiker trotz unterschiedlicher T-Zellspezifitäten mit dem gleichen Produkt therapiert werden. Dadurch war es möglich mit dem ARTE-Protokoll das wespengiftspezifische T-Zellprofil im Verlauf der Wespengift-Immuntherapie unabhängig von der T-Zellspezifität zu identifizieren und zu charakterisieren.

Auch im Hinblick auf die Stimulationsdauer ist die ARTE Methode sehr gut geeignet, da bereits nach 7 h Antigenstimulation der Aktivierungsmarker CD154 exprimiert wird. Stimulationen von längerer Dauer haben einen Einfluss auf die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der antigenspezifischen T-Zellen (Bacher/ Scheffold 2015; Schulten et al. 2018; Dillon et al. 2015), weshalb die Stimulation möglichst kurz gehalten werden sollte. Diese Feinheit könnte bereits erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben und erklären, warum Studien unterschiedliche Ergebnisse hervorbringen, obwohl sie vermeintlich das Gleiche untersucht haben.

## 6.2 Veränderungen der wespengiftspezifischen T-Zellfrequenz im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie

Um den Einfluss der SIT auf die Frequenz wespengiftspezifischer T-Zellen bei Wespengiftallergikern zu untersuchen, wurden wespengiftspezifische T-Zellen an 4 verschiedenen Zeitpunkten während der Einleitungsphase einer Wespengift-Immuntherapie untersucht: **BE1**: vor Beginn der Wespengift-Immuntherapie; **BE2**: eine Woche nach SIT-Steigerungsphase; **BE3**: zwei Wochen nach Erhaltungsdosis; **BE4**: vier Wochen nach Erhaltungsdosis.

Die Daten zeigen, dass die Frequenz wespengiftspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach einer Woche SIT (**BE2**) um mehr als das Tausendfache anstieg, wodurch sie deutlich über der von vor der SIT (**BE1**) lag ( $p < 0,0001$ ). Dies deutet darauf hin, dass schon die ersten drei Tage der

Einleitungsphase, in denen die Patienten in gesteigerter Dosis eine Gesamtmenge von 340,54 µg Wespengift erhielten, einen nachhaltigen Anstieg der wespengiftspezifischen T-Zellfrequenz aufweisen, der eine Woche später bei **BE2** noch gemessen werden konnte. Im weiteren Verlauf der SIT wurde eine signifikante Abnahme der wespengiftspezifischen T-Zellfrequenz (**BE2** zu **BE3**:  $p = 0.0011$ ) gemessen, bei der ähnliche Werte wie vor der SIT erreicht wurden. Dies deutet darauf hin, dass schon die ersten drei Wochen der Wespengift-Immuntherapie eine therapeutische Wirkung auf das Immunsystem der Wespengiftallergiker haben, wo es trotz fortlaufender Wespengiftinjektion zu einer Reduktion der wespengiftspezifischen T-Zellfrequenz kommt. Auch bei der folgenden Untersuchung vier Wochen nach Erhaltungsdosis (**BE4**), sowie ein Jahr nach SIT-Beginn (**BE6**: vier Wochen nach Erhaltungsdosis, **BE7**: eine Woche nach Erhaltungsdosis) konnten antigenspezifische T-Zellfrequenzen nachgewiesen werden, die vergleichbar niedrig waren, wie sie bereits nach drei Wochen Immuntherapie (**BE3**) gemessen wurden.

Um zu überprüfen, ob der zeitliche Abstand zwischen einer Messung und der vorausgegangenen Wespengiftinjektionen Einfluss auf die Höhe der T-Zellfrequenz hat, wurde die Messung **BE5** durchgeführt. Die Messung **BE5** wurde eine Woche nach der 3. Erhaltungsdosis durchgeführt und simulierte damit den Abstand zwischen der Messung **BE2** und der vorausgegangenen letzten Wespengiftidosis aus der Steigerungsphase. Da die gemessene antigenspezifische T-Zellfrequenz an **BE5** vergleichbar niedrig war als jene zwei (**BE3**) bzw. vier (**BE4**) Wochen nach Erhaltungsdosis und damit signifikant viel niedriger als jene eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase (**BE2**), kann angenommen werden, dass die im Verlauf der SIT sinkende wespengiftspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz nicht Folge des zunehmenden zeitlichen Abstands zwischen Wespengiftinjektion und Messung ist, sondern vielmehr als immunologischen Wirkmechanismus der SIT gewertet werden kann.

Die Auswertung mit Candida-Antigen MP56 stimulierten PBMCs zeigt, dass die candidaspezifische T-Zellfrequenz im Verlauf der SIT annähernd unverändert blieb, was darauf hindeutet, dass die SIT tatsächlich nur zu wespengiftspezifische Modulationen der Immunsystem führt.

Bei der Auswertung der Nicht-Allergiker fiel auf, dass die wespengiftspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz ähnlich niedrig war als die der Wespengiftallergikern sieben Wochen nach Beginn der SIT (**BE4**). Im Vergleich zu vor SIT (**BE1**), lag die wespengiftspezifische T-Zellfrequenz der Nicht-Allergiker sogar über der von Wespengiftallergikern. Folglich kann die Höhe der



antigenspezifischen T-Zellfrequenz nicht als immunologisches Unterscheidungsmerkmal zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern verwendet werden.

Eine Studie von Li et al. (Li/Boussiotis 2006) zeigte, dass sich die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen bei Atopikern nach Immuntherapie der Frequenz von Nicht-Atopikern annäherte. Dies konnte auch in der vorliegenden Untersuchung beobachtet werden. Bereits 7 Wochen nach SIT-Beginn nahm die wespengiftspezifische T-Zellfrequenz der Wespengiftallergiker Werte an, die mit den Nicht-Allergikern vergleichbar waren.

### **6.3 Die Entwicklung des wespengiftspezifischen T-Zellprofils im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie**

#### **6.3.1 Die Entwicklung der wespengiftspezifischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Antwort**

Obwohl die immunologischen Mechanismen von Allergien und der SIT speziell noch nicht vollständig verstanden sind, scheint eine pathologische T<sub>H</sub>2-Antwort sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Therapie von Allergien eine entscheidende Rolle zu spielen. In dieser Untersuchung wurde die wespengiftspezifische T-Zelleantwort während der Einleitungsphase einer Wespengift-Immuntherapie untersucht, wobei anhand der Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 die Entwicklung der antigenspezifischen T<sub>H</sub>2- Antwort analysiert wurde. So konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, vor allem die der Wespengiftallergiker, die gleichzeitig unter Asthma oder allergischer Rhinitis litten, während der ersten Woche der SIT (**BE2**) signifikant anstieg, um dann nach weiteren zwei (**BE3**) bzw. vier Wochen (**BE4**) der SIT wieder auf Ausgangswerten abzusinken. Die Kontrollmessungen, die ein Jahr nach Beginn der SIT erhoben wurden (**BE6, BE7**) bestätigten dieses Ergebnis, da sich die wespengiftspezifische IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellantworten nicht nennenswert von den sechs Wochen nach SIT-Beginn (**BE4**) erhobenen Ergebnissen unterschieden. Es konnte jedoch nicht nur gezeigt werden, dass die Frequenz der CD154<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> T-Zellen nach einem kurzzeitigen Anstieg im Verlauf der SIT sank, sondern auch der prozentuale Anteil der IL-4<sup>+</sup> T-Zellen unter den wespengiftspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen abnahm. Während der Anteil IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter den wespengiftspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor SIT (**BE1**) noch bei 7,6% lag, stieg er innerhalb der ersten Woche der SIT (**BE2**) auf 35,5%, um dann innerhalb der folgenden 6 Wochen (**BE4**) wieder auf 12,1% zu sinken.

Ein ähnlicher Frequenzanstieg konnte bei den IL-5<sup>+</sup> und IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Zusammengefasst verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Einleitungsphase der SIT nach einem kurzzeitigen Anstieg zu einer Abnahme der wespengiftspezifischen T<sub>H</sub>2-Antwort führt.

Entgegen dem Anschein die candidaspezifische IL-4<sup>+</sup> T-Zellantwort steige ebenfalls kurzzeitig während der SIT an, lag der tatsächliche prozentuale Anteil der candidaspezifischen IL-4<sup>+</sup> T-Zellantwort unter den CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei um 0%. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da das Candida-Antigen MP-65 sowohl bei Allergikern als auch bei Nicht-Allergikern keine T<sub>H</sub>2 Antwort hervorruft (La Sala et al. 1996; Nisini et al. 2001; Torosantucci et al. 1993). Gleichzeitig verdeutlicht dieses Ergebnis, dass die Wespengift-Immuntherapie ausschließlich zu wespengiftspezifischen Modulationen der T-Zellantwort führt.

Bei Betrachtung der wespengiftspezifischen T<sub>H</sub>2- Antwort unter den Nicht-Allergikern wurde deutlich, dass Nicht-Allergiker durchaus mit einer IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort auf das Wespengift reagierten. Bemerkenswert ist, dass die IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz der Wespengiftallergiker vor SIT und sieben Wochen nach Beginn der SIT (**BE4**) ähnlich niedrige Werte einnahmen, wie sie bei den Nicht-Allergikern zu messen waren. Daraus lässt sich ableiten, dass der immunologische Unterschied zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern nicht primär durch das Vorhandensein antigenspezifischer T<sub>H</sub>2-Zellen definiert ist, sondern dass weitere immunologische Mechanismen existieren müssen, die eine Toleranzentwicklung gegenüber einem Allergen induzieren können. Dennoch scheint die Reduktion der antigenspezifischen T<sub>H</sub>2-Antwort unter fortlaufender Allergenexposition eine wesentliche Rolle für die Wirksamkeit der SIT zu spielen. Auch wenn der genaue Mechanismus für die verminderte T<sub>H</sub>2-Antwort noch nicht abschließend identifiziert wurde, lässt sich die reduzierte IL-4 Sekretion auch durch eine vermindert CD40/CD40L Expression erklären, die bei Immuntherapien mit vor allem hohen Allergendosen beobachtet wurde (Aversa et al. 1994; Bellinghausen et al.1997) und die eine Reduktion der IL-4 Produktion bewirkt (Blotta et al. 1996), was wiederum durch eine geringer Identifizierungsrate IL-4<sup>+</sup> T-Zellen erklärt werden könnte.

Während die Reduktion der T<sub>H</sub>2-Antwort im Verlauf der SIT in vielen Studien nachgewiesen wurde (Bellinghausen et al. 1997; Wambre/James/ Kwok 2012a; Durham et al. 1996; Müller et al. 1998; Marcotte et al. 1998; Pène et al. 1998; Murphy1993; Jutelet al. 1995; Chiang et al. 2018; O'Brien et al. 1997; McHugh et al. 1995; Akdis et al 1996), wird der Verlauf der T<sub>H</sub>1-Antwort unterschiedlich beschrieben (Durham et al.1996). So liegen Studien vor, die über einen

Anstieg der T<sub>H</sub>1-Antwort durch die SIT berichten (Bellinghausen et al. 1997; Jutel et al. 1995; Varney et al. 1993; McHugh et al. 1995) und solche, die keine Änderungen (Marcotte et al. 1998; Murphy 1993; Chiang et al. 2018) oder sogar eine Abnahme der T<sub>H</sub>1-Antwort nachweisen konnten (Müller et al. 1998; O'Brien et al. 1997). Die letztgenannten Studien stützen die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse einer unveränderten T<sub>H</sub>1 Antwort. Denn sowohl die Frequenz der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> T-Zellen, als auch der prozentuale Anteil der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen unter den wespengiftspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen blieb im Verlauf der SIT kontinuierlich niedrig (**BE1 – BE4**: Mittelwert unter 8 %). Selbst nach einem Jahr fortlaufender SIT konnte kein Anstieg der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort nachgewiesen werden. Stattdessen war die wespengiftspezifische T<sub>H</sub>1-Antwort vergleichbar niedrig wie die Werte zu Beginn der SIT. Interessanterweise produzierten die Nicht-Allergiker ähnlich wenig IFN- $\gamma$  wie die Wespengiftallergiker, sodass diese Ergebnisse die Vermutung, eine SIT induziere eine T<sub>H</sub>1 Antwort, durch welche Toleranz gegenüber einem Allergen erlangt wird, nicht stützen.

In welche Richtung sich eine naive T-Zelle entwickelt, ob eher eine T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt wird, scheint von vielen Faktoren abhängig zu sein. So erkannten Rogers et al., dass bei der Stimulation mit einem ganzen Protein - wie in casu verwendet - eher die Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt werden würde, während lösliche Peptide eher die Entwicklung von T<sub>H</sub>1-Zellen unterstützen würden (Rogers/ Croft 1999). Da die SIT mit einem aus mehreren Proteinen bestehenden Wespengiftextrakt durchgeführt wurde, war es sinnvoll, für die durchgeführte Restimulation ebenfalls diesen Wespengiftextrakt zu verwenden, da nur so der gesamte Pool wespengiftspezifischer T-Zellen untersucht werden konnte. Zudem konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden, dass die verabreichte Antigen dosis einen erheblichen Einfluss auf den T-Zelldifferenzierungsprozess hat. So konnten unter anderem Caballido et al. zeigen, dass sich bei steigender Antigenkonzentrationen das antigenspezifische T-Zellprofil von einem IL-4 dominanten zu einem IFN- $\gamma$  geprägten T-Zellprofil verschiebt (Caballido et al. 1992; ebd. 1997). Aber auch andere Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass die IL-4 Produktion vor allem durch eine geringe Antigenkonzentration hervorgerufen wird, während die Produktion von IFN- $\gamma$  höhere Antigenkonzentrationen erfordert (Bellinghausen et al. 1997; Secrist/ DeKruyff / Umetsu 1995). Zudem erkannten Caballido et al., dass Allergiker und Patienten, die sich einer Desensibilisierung unterziehen, höhere Antigen dosen benötigten, um eine IFN- $\gamma$  Antwort zu generieren, als sie von Nicht-Allergikern benötigt wurden (Caballido et al. 1992; ebd. 1997). Diese Erkenntnisse würden nicht nur erklären, warum trotz gleichbleibend hoher Antigen dosis in einigen Studien bei Nicht-Allergikern eine höhere IFN- $\gamma$  Antwort als bei Allergikern nachgewiesen wurde (Leonard et al. 1997; Renzi et al. 1999).

Darüber hinaus würden sie einen Erklärungsansatz dafür liefern, warum einige Studien bei Allergikern nach einer Desensibilisierung einen Anstieg der antigenspezifischen IFN- $\gamma^+$  T-Zellantwort nachweisen konnten (Bellinghausen et al. 1997; Jutel et al. 1995; Varney et al. 1993), während andere dies nicht konnten und stattdessen von einer unveränderten (Marcotte et al. 1998; Murphy 1993; Chiang et al. 2018) oder sogar reduzierten T<sub>H</sub>1-Antwort berichteten (Müller et al. 1998; O'Brien et al. 1997). Offensichtlich hat die bei der Stimulation verwendete Antigenkonzentration einen großen Einfluss auf den Differenzierungsprozess naiver T-Zellen, sodass die Verwendung unterschiedlich hoher Antigendosen die Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Forschungsergebnissen erklären könnte. Weiterhin könnte dies bedeuten, dass - unabhängig davon, ob es sich um einen Allergiker oder einen Nicht-Allergiker handelt - auf ein Allergen/Antigen mit einer IFN- $\gamma^+$  T<sub>H</sub>1-Antwort reagiert werden könnte, wenn nur die individuelle Schwellendosis überschritten wird, ab der anstatt der IL-4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Antwort die Entwicklung einer IFN- $\gamma^+$  T<sub>H</sub>1 Antwort unterstützt wird.

Rogers et al. gingen dieser Erkenntnis weiter nach und untersuchten die Wirkung der Signalstärke des T-Zell-Rezeptors (T cell receptor, TCR) auf das T-Zellprofil. Sie fanden heraus, dass über eine kurze Dauer ein starkes TCR-Stimulationssignal in Form einer hohen Antigendosis und einer hohen TCR-Affinität die Differenzierung einer T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt, während die T<sub>H</sub>1-Antwort bereits bei einer geringeren TCR-Signalstärke generiert wird. Auf lange Sicht betrachtet kehrt sich dieses Phänomen um. Dann erzeugt die Kombination aus einer hohen Antigendosis und einer starken TCR-Affinität bei langandauernder Antigenstimulation eine T<sub>H</sub>1-Antwort, während eine geringere TCR-Signalstärke eine T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt (Rogers/ Croft 1999).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stärke der T-Zellbindung die Ausbildung einer T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>2-Zytokinantwort beeinflusst. Dies könnte erklären, warum zu Beginn der SIT sowohl die Frequenz als auch der prozentuale Anteil der IL-4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sowie die Frequenz von IL-5<sup>+</sup>/IL-13<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen stark anstieg. Nach der dreitägigen SIT-Einleitung lag die verabreichte Gesamtdosis mit 340,56  $\mu$ g Wespengift um das Hundertfache über der natürlichen Wespengiftosis von 1,7 – 3,1  $\mu$ g/ Wespenstich (Hoffman/ Jacobson 1984), was die Induktion einer T<sub>H</sub>2-Antwort generiert haben könnte. Doch auch im weiteren Verlauf der SIT blieb die verabreichte Antigendosis mit 100  $\mu$ g Wespengift in Form der Erhaltungsdosen sehr hoch und hätte nach Rogers zu einer Verschiebung von einer T<sub>H</sub>2 dominierenden zu einer T<sub>H</sub>1 geprägten T-Zellantwort führen müssen (Rogers/ Croft 1999). Doch stattdessen wurde in der vorliegenden Untersuchung lediglich der Rückgang der antigenspezifischen IL-4<sup>+</sup> T-

Zellenantwort beobachtet. Der Anstieg einer antigenspezifischen  $\text{IFN-}\gamma^+$  T-Zellantwort wurde nicht beobachtet, auch nicht in den Messungen, die nach einem Jahr laufender SIT erhoben wurden.

Neben der bereits beschriebenen Erkenntnis, dass hohe Antigenkonzentrationen eher die Sekretion von  $\text{IFN-}\gamma$  anstatt  $\text{IL-4}$  begünstigen, erkannten Secrist et al., dass  $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokine unabhängig vom T-Zellproliferationsstatus sezerniert werden können, wohingegen eine  $\text{T}_\text{H}1$ -Antwort erst durch eine aktive T-Zellproliferation - als Folge hoher Antigendosen - induziert werden würde (Secrist/ DeKruyff/ Umetsu 1995). Da in casu die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 nur leicht, aber nicht signifikant im Vergleich zum Beginn der SIT anstieg, kann geschlussfolgert werden, dass die SIT keine Proliferation der wespengiftspezifischen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen bewirkt, durch die eine  $\text{T}_\text{H}1$ -Antwort generiert werden könnte. Diese Beobachtung spricht erneut gegen die These der Entwicklung einer protektiven  $\text{T}_\text{H}1$ -Antwort im Verlauf der SIT.

Zusammengefasst bedeutete dies, dass die Wespengift-Immuntherapie die Reduktion der wespengiftspezifischen  $\text{T}_\text{H}2$ -Antwort im peripheren Blut bewirkt, ohne dabei eine verstärkte wespengiftspezifische  $\text{T}_\text{H}1$ -Antwort zu generieren. Die gesteigerte  $\text{T}_\text{H}1$ -Antwort, die einige Forschungsgruppen beobachten konnten, könnte unter anderem durch die Verwendung sehr hoher Antigendosen und langen in-vitro-Stimulationen erklärt werden. Ob sich die Anzahl wespengiftspezifischer  $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen tatsächlich vermindert, oder ob diese Zellen aus dem peripheren Blut in Lymphknoten wandern, um dort B-Zellen zu aktivieren und damit die humorale Immunantwort zu fördern, ist derzeit noch nicht geklärt.

### 6.3.2 Die Entwicklung wespengiftspezifischer Gedächtniszellen

Bei der Auswertung des Profils antigenspezifischer Gedächtniszellen fiel auf, dass sowohl bei den Allergikern als auch bei den Nicht-Allergikern der Großteil der wespengiftspezifischen T-Zellen  $\text{CD45-RO}^+$  war und damit den Gedächtniszellen zugeordnet werden konnte. Diese Beobachtung machten auch Kwok et al. bei der Untersuchung Feld 1 (Hauptallergen der Katzenallergie) spezifischer T-Zellen (Kwok et al. 2010). Die genauere Betrachtung der antigenspezifischen Gedächtniszellen zeigt, dass die SIT zwar auch einen kurzzeitigen Anstieg der  $\text{IL-10}^+ \text{IL-4}^+$  und der  $\text{IL-10}^+ \text{IL-4}^-$  antigenspezifischen Gedächtniszellen bewirkte, jedoch ausschließlich der Anstieg der  $\text{CD45-RO}^+ \text{IL-10}^- \text{IL-4}^+ \text{CD154}^+ \text{CD4}^+$  T-Zellfrequenz signifikant war. Der Rückgang der antigenspezifischen  $\text{IL-4}^+ \text{CD45-RO}^+$  T-Zellfrequenz, die

im weiteren Verlauf der SIT beobachtet werden konnte, wurde auch von Secrist et al. nachgewiesen und er konnte zudem festgestellt, dass die Abnahme der IL-4<sup>+</sup> CD45-RO<sup>+</sup> T-Zellfrequenz mit der Dauer der Immuntherapie korrelierte (Secrist et al. 1993). Da unter den antigenspezifischen IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Gedächtniszellen im Verlauf der SIT keine signifikanten Veränderungen messbar waren, kann geschlussfolgert werden, dass eine SIT zwar zu Veränderungen des antigenspezifischen Gedächtniszellprofil führt, sich die Modulation aber auf die IL-4 Sekretion durch antigenspezifische Gedächtniszellen beschränkt.

### 6.3.3 Die Entwicklung wespengiftspezifischer IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Frage, welcher immunologische Mechanismus der SIT - Anergie, Deletion, Ignoranz oder regulatorische T-Zellen - für die Toleranzentwicklung verantwortlich ist, wird immer noch unter Experten diskutiert.

Die Toleranzinduktion durch regulatorische T-Zellen ist derzeit immer noch eine weit verbreitete Theorie, die durch die Beobachtung einer im Verlauf der SIT ansteigender Frequenz antigenspezifischer IL-10<sup>+</sup> T-Zellen erklärt wird (Akdis et al. 1998; Akdis et al. 2004; Chiang et al. 2018; Taylor et al. 2006). Die Theorie einer IL-10 vermittelten Toleranzinduktion unterstützen die Theoriebefürworter zusätzlich damit, dass Nicht-Allergiker mehr IL-10 sezernierende Typ-I regulatorische T-Zellen (Tr1) produzieren würden als Allergiker. Da Letztere durch den fehlenden Einfluss regulatorischer T-Zellen ein größeres antigenspezifisches IL-4<sup>+</sup> T-Zellrepertoire bilden könnten (Taylor et al. 2006), würde demnach die Ausbildung von Allergien begünstigt werden.

Als antiinflammatorisches Zytokin wirkt IL-10 vielfältig auf die verschiedenen Zellen des Immunsystems. So kann IL-10 über die Hemmung der B7.1 (CD80) /CD28 Interaktion die IL5-Sekretion unterdrücken (Schandené et al. 1994), die Differenzierung von Tr1 Zellen induzieren (Groux et al. 1997), CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Anergie versetzen (Groux et al. 1996; Steinbrink et al. 1999) und als starker Suppressor des Gesamt-IgEs und allergenspezifischen IgEs, sowie als Induktor der IgG4-Produktion wirken (Akdis et al. 1998). Theoretisch betrachtet, würde eine IL-10 Induktion somit einen guten Erklärungsansatz für die Toleranzentwicklung im Verlauf der SIT liefern. IL-10 wird aber nicht nur von regulatorischen T-Zellen exprimiert. Vor allem Monozyten und B-Zellen sezernieren IL-10, daneben auch T<sub>H</sub>2-Zellen, T<sub>H</sub>1-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Eosinophile, Keratinozyten und verschiedene Tumorzellen (Moore et al. 1993; Del Prete 1993).

Veränderungen der IL-10-Konzentration lassen somit keine unmittelbaren Rückschlüsse auf bestimmte Zelltypveränderungen zu.

In casu wurde der Einfluss der SIT auf das antigenspezifische IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellprofil untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Frequenz IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Woche nach Beginn der SIT-Einleitungsphase (**BE2**) signifikant ansteigt, um dann im weiteren Verlauf der SIT wieder signifikant zu Ausgangswerten abzusinken (**BE3, BE4**). Da der Verlauf der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort dem von IL-4 stark ähnelte, wurden die drei Proben mit der stärksten IL-10 Aktivität auf eine gleichzeitige IL-4 Sekretion untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass 76,19% der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen gleichzeitig IL-4<sup>+</sup> waren, woraus geschlossen werden kann, dass der Großteil des IL-10 am ehesten von T<sub>H</sub>2-Zellen produziert wurde, anstatt von regulatorischen T-Zellen. Die Beobachtung, dass der prozentuale Anteil von IL-10 unter den wespengiftspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen während der Einleitungsphase der SIT mit einem gleichbleibenden Mittelwert um die 3 % sehr gering war, deutet zusätzlich darauf hin, dass die SIT lediglich einen kurzfristigen Anstieg der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz induziert. Auch in den Messungen nach einem Jahr konnten IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenzen mit ähnlichen Werten wie vor Beginn der SIT (**BE1**) bzw. drei und sieben Wochen nach Beginn der SIT gemessen werden, was ebenfalls gegen die Theorie einer SIT vermittelten IL-10 Induktion spricht.

Ein vorübergehender Frequenzanstieg der IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte auch in anderen Studien bei Allergikern nach SCIT (subkutane Immuntherapie) oder SLIT (sublinguale Immuntherapie) nachgewiesen werden (Möbs et al. 2012; Bohle et al. 2007; Schulten et al. 2016). Diese IL-10 Produktion war entweder ebenfalls ad interim oder erforderte einen fortlaufend hohen Allergendosis (Meiler et al. 2008; Akdis et al. 1998; Francis/ Till/ Durham 2003; Bohle et al. 2007; Möbs et al. 2012; Schulten et al. 2016). Bacher et al. nahmen an, dass die IL-10 Sekretion am wahrscheinlichsten von bereits vorhandenen T-Effektorzellen ausging als von de novo differenzierten naiven T-Zellen und beschrieben die IL-10 Sekretion als einen dynamischen und selbstlimitierenden Mechanismus, der durch externe Stimuli moduliert werden könne (Bacher/Scheffold 2018). Dass eine IL-10-Produktion keinen entscheidenden Wirkmechanismus der SIT darstellt, machte zusätzlich der Vergleich von Nicht-Allergikern und Allergikern deutlich. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass bei den Nicht-Allergikern sowohl die Frequenz IL-10<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, als auch der prozentuale Anteil der IL-10<sup>+</sup> T-Zellen nicht signifikant höher war als bei den Wespengiftallergikern. Studien mit Untersuchungen der Nasenhaut von Nicht-Allergikern mit

pMHC-Multimeren, Kurzzeitaktivierungsassays und IL-10-mRNA Analysen konnten ebenfalls keine signifikante allergenspezifische IL-10<sup>+</sup> T-Zellantwort nachweisen (Bacher et al. 2016; Parviainen et al. 2010; Nouri-Aria et al. 2004; Wambre et al. 2014), sodass all diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die SIT nicht primär über eine verstärkte IL-10 Produktion die Toleranzentwicklung induziert (Bacher/Scheffold 2018), sondern andere Mechanismen existieren müssen, die für eine peripheren Toleranzentwicklung verantwortlich sind.

#### 6.4 Diskussion des immunologischen Mechanismus einer Wespengift-Immuntherapie

Es konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der SIT zu keinem Anstieg wespengiftspezifischer IL-10<sup>+</sup> T-Zellen kommt, die eine Toleranzinduktion via **regulatorischer T-Zellen** erklären könnten. Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Bacher et al. die zeigten, dass sich birkenpollen- und aspergilluspezifische T<sub>reg</sub> bei Nicht-Allergikern und Allergikern weder qualitativ noch quantitativ unterscheiden (Bacher et al. 2014; ebd. 2016), was kürzlich bei der Untersuchung von Kindern mit bzw. ohne Erdnuss-Allergie bestätigt werden konnte (Weissler et al. 2018). Da bei der Mehrheit der Nicht-Allergiker T<sub>reg</sub>-Zellen gegen viele bekannte Allergene fehlen (Bacher/Scheffold 2018), müssen T<sub>reg</sub>-unabhängige Toleranzmechanismen existieren (ebd.). Auf der anderen Seite sind selbst hochallergische Menschen gegen den Großteil der Aeroallergene resistent (ebd.), sodass Toleranzmechanismen durchaus auch bei Allergikern erfolgreich greifen, sodass die Entwicklung von Allergien als ein seltenes Ereignis des Toleranzkontrollverlusts gewertet werden kann (Traidl-Hoffmann/Jakob/ Behrendt 2009).

Eine andere Möglichkeit, über die Toleranz erlangt werden kann, ist die **Anergie**. Anerge Zellen sind lebende aber unempfindliche Zellen, die ihre Fähigkeit verloren haben, auf ihr Antigen zu reagieren (Akdis/Blaser/Akdis 2005) und daher weder proliferieren noch Zytokine produzieren können (Valdor/ Macian 2013; Li/Boussiotis 2006). Die Aktivierung einer T-Zelle benötigt zwei Signale: die Erkennung des Antigens über den TCR (**Signal 1**) und kostimulierende Signale (**Signal 2**), wobei sich das auf den T-Zellen lokalisierte Molekül CD28 als das dominierende kostimulierende Signal durchgesetzt hat (ebd.). Fehlt das kostimulierende Signal (**Signal 2**), auch wenn das **Signal 1** vorhanden ist, so kommt es nicht zur Bindung von CD28 an CD80/CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle und damit nicht zur Transkription von IL-2 (ebd.; Valdor/ Macian 2013). Das Zytokin IL-2 stellt jedoch einen Überlebensfaktor für die aktivierte T-Zelle dar, indem es die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu



T-Effektorzellen steuert (Murphy/ Travers/ Walport/ 2014) und damit eine Schlüsselposition für die Entscheidung von Aktivierung und Anergie einer T-Zelle einnimmt (ebd.). Dabei ist es irrelevant, ob die Transkription von IL-2 durch die Bindung von CD28 an CD80/CD86 generiert wird oder der IL-2-Rezeptor unabhängig vom kostimulierenden Signal aktiviert wurde (Valdor/ Macian 2013).

Aus der Untersuchung der IL-2 Sekretion von wespengiftspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in casu ging hervor, dass sich die IL-2 Sekretion von Wespengiftallergikern vor SIT und Nicht-Allergikern fast identisch verhalten. Nach einer Woche SIT konnte ein stark signifikanter Anstieg der IL-2 sekretierenden wespengiftspezifischen T-Zellen beobachtet werden, was als eine starke Aktivierung der wespengiftspezifischen T-Zellen interpretiert werden kann. Im weiteren Verlauf der SIT sank die IL-2<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz jedoch wieder. Da anerge Zellen kein IL-2 sezernieren, kann diskutiert werden, ob die Abnahme der IL-2 Frequenz als Indikator für eine Anergieinduktion gewertet werden kann. Da der prozentuale Anteil der IL-2 Sekretion unter den CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen jedoch relativ konstant blieb, spräche dies gegen die Theorie der Anergieinduktion.

Als Alternative zur Anergie stellt die **Ignoranz** einen Mechanismus der Toleranzentwicklung dar, durch den sich Allergien auch dann entwickeln könnten, wenn zwar zuvor jahrelanger Kontakt zu dem Allergen bestand, eine allergische Reaktion aber ausblieb (Bacher/Scheffold 2018). Wären allergenspezifische T-Zellen bei Nicht-Allergikern inaktiviert, könnten sie sich zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr zu pathologische T-Zellen entwickeln (ebd.). Bei einem toleranten Immunsystem, das Antigene stattdessen nur ignoriert, wäre eine Sensibilisierung durch Ignoranz-Verlust immer noch möglich (ebd.), sodass im Umkehrschluss die Möglichkeit bestünde, die Ignoranz gegenüber einem Allergen durch eine stetige Allergenkonfrontation im Rahmen einer Immuntherapie wiederherzustellen.

Einen neuen Erklärungsansatz für die klinische Wirksamkeit einer SIT liefert die kürzlich bei Atopikern entdeckte Subpopulation von T<sub>H</sub>2-Zellen, die alle antigenspezifischen T<sub>H</sub>2-Zellen einschließt und laut Wambre et al. durch eine SIT eliminiert wird (Wambre et al. 2012; ebd. 2017). Diese spezifische T<sub>H</sub>2-Subpopulation, die sich durch CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> CD45RBlow CRTH2<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> CD49d<sup>+</sup> T-Zellen definiert, scheint mit globalen atopischen Entzündungsstörungen assoziiert zu sein, weshalb diese Zellen als **T<sub>H</sub>2A-Zellen** („A“ für Atopie) bezeichnet werden (ebd.). Es ist möglich, dass die in dieser Untersuchung beobachtete Abnahme der wespengiftspezifischen T<sub>H</sub>2-Antwort im Verlauf der SIT die Deletion von antigenspezifischen T<sub>H</sub>2A-Zellen widerspiegelt. Da T<sub>H</sub>2A -Zellen kaum bei Nicht-Atopikern

zu finden sind, scheinen sie einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen zu haben, weshalb Wambre et al. diese Zellen als therapeutisches Ziel und Marker für die klinische Wirksamkeit von SITs vorschlagen (ebd.).

Insgesamt ist die Verminderung bzw. die Modulation pathogener  $T_H2$ -Zellen der derzeit am besten dokumentierte Effekt der SIT auf allergenspezifische T-Zellen, dem ein vorübergehender Anstieg  $IL-4^+$ ,  $IL-5^+$  und  $IL-13^+$   $T_H2$ -Zellen vorausgeht. Bis heute gibt es keine Belege dafür, dass eine SIT tatsächlich stabile allergenspezifische  $T_{reg}$ -Zellen induziert (Bacher/Scheffold 2018). Auch wenn die Deletion einer pathogenen  $T_H2$ -Antwort sehr gut die klinische Wirksamkeit der SIT erklären könnte, ist ein Zusammenspiel aus Deletion, Anergie, immunologischer Ignoranz und regulatorischen T-Zellen durchaus denkbar.

Summa summarum ermöglicht das neuartige ARTE-Verfahren die Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen direkt und ex-vivo, wodurch Artefakte durch zeitaufwändige ex-vivo Methoden vermieden werden und daher auch in Zukunft bei der Erforschung der immunologischen Mechanismen der SIT eingesetzt werden sollte.

## 6.5 Ausblick

Übereinstimmend mit vielen anderen Studien, hat sich die Verminderung einer pathologischen  $T_H2$  Antwort als der am beste dokumentierte immunologische Effekt einer SIT erwiesen. Ob diese Beobachtung durch die Deletion von Atopie-assoziierten  $T_H2A$  zu erklären ist (Wambre et al. 2017), müsste nun in weiteren Studien untersucht werden. Dabei könnte eine im SIT-Verlauf abnehmende antigenspezifische  $T_H2A$ -Antwort, ähnlich wie sie bei  $IL-4^+$  antigenspezifischen  $T_H2$ -Zellen beobachtet wurde, vermuten lassen, dass vor allem  $T_H2A$ -Zellen die abnehmende  $T_H2$ -Antwort im Verlauf der SIT bedingt haben. Vergleichsuntersuchungen von erfolgreich und erfolglos therapierten Patienten könnten zudem prüfen, in wieweit antigenspezifische  $T_H2A$ -Zellen als prädiktiver Marker für die therapeutische Wirksamkeit von SITs eingesetzt werden könnten (ebd.). Wäre bei den erfolgreich therapierten Patienten – Patienten, bei denen nach Abschluss der SIT und erneuten Wespenstichen allergische Reaktionen ausbleiben – tatsächlich keine antigenspezifische  $T_H2A$ -Antwort nachweisbar, bei den erfolglos therapierten Patienten jedoch schon, wäre die Funktion von antigenspezifischen  $T_H2A$ -Zellen als Erfolgsmarker für die SIT bestätigt und das Therapieschema der SIT müsste neu überdacht werden. Denn würden antigenspezifischer  $T_H2A$ -Zellen die Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Allergie bzw. der

Toleranzentwicklung einnehmen, so könnte daraus geschlossen werden, dass eine SIT nur solange durchgeführt werden müsste, wie antigenspezifische  $T_H2A$  Zellen nachweisbar sind. Die individuelle Anpassung der Therapiedauer an das antigenspezifische  $T_H2A$ -Zellprofil könnte verhindern, dass spezifische Immuntherapien auf der einen Seite unnötig lange durchgeführt und auf der anderen Seite verfrüht abgebrochen werden, wodurch die Effektivität der Therapie erheblich gesteigert und die Kosten der Therapie gesenkt werden könnten.

Um die Bedeutung von  $T_H2A$ -Zellen in der SIT qualitativ zu bewerten, können die  $T_H2A$ -Zellen jedoch nicht alleine betrachtet werden. Es müssen alle Parameter berücksichtigt werden, bei denen im Verlauf einer SIT Veränderungen beobachtet werden. Daher sollte auch untersucht werden, wie sich die wespengiftspezifische humorale Antwort im Verlauf der SIT verändert. Kommt es tatsächlich zu einer Abnahme des wespengiftspezifischen IgE-Spiegels zu Gunsten einer wespengiftspezifischen IgG- bzw. IgG4-Produktion (Strait/ Morris/ Finkelman 2006; Wachholz/ Durham 2004; Gleich et al. 1982; Van Neerven et al. 2004) und korreliert dieser Effekt mit den beobachteten Veränderungen der  $T_H2$  bzw. der  $T_H2A$ -Antwort? Denn obwohl Studien zeigen können, dass der therapeutische Effekt einer SIT häufig schon in den frühen Phasen der SIT einsetzt (Akdis/Akdis 2011), werden Immuntherapien für eine Dauer von 3-5 Jahren durchgeführt. Den frühen Effekt der SIT konnte die hier vorliegende Untersuchung in Form einer abnehmenden  $T_H2$ -Antwort zeigen. Doch auch wenn sich herausstellt, dass die beobachtete Veränderung der  $T_H2$ -Antwort durch die Deletion von antigenspezifischen  $T_H2A$ -Zellen hervorgerufen wurde, stellt sich immer noch die Frage, warum die SIT nicht bereits nach den ersten Wochen der SIT, in der eine abnehmende  $T_H2$ -Antwort beobachtet wurde, beendet werden kann. Liegt es daran, dass die komplette Deletion der pathologischen  $T_H2$ -/ $T_H2A$ -Zellen tatsächlich 3-5 Jahren dauert und ein früherer Abbruch der Therapie eine erneute Vermehrung der pathologischen  $T_H2$ -Zellen bewirken würde, oder existieren weitere immunologische Mechanismen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt der SIT aktiviert werden. Dies müsste weiter untersucht werden, weshalb auch der wespengiftspezifische IgE- und IgG-Spiegel im Verlauf der SIT bestimmt und eine Korrelation zur antigenspezifischen  $T_H2$ -Antwort geprüft werden sollte.

Wie die meisten der Studien, die immunologischen Mechanismen von Wespengift-Immuntherapien erforschten, stellte auch in dieser Untersuchung peripheres Blut das Untersuchungsmedium der Wahl dar. Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Therapiedauer und die Allergendosis gesenkt werden kann, wenn das Allergen anstatt subkutan in den Lymphknoten gespritzt wird, dem Ort an dem antigenspezifische B- und T-Zellen

aufeinander treffen, um die humorale Immunantwort einzuleiten (Senti et al. 2008; ebd. 2012; Hylander et al. 2013) und die Tatsache, dass der natürliche Wespenstich intrakutan anstatt subkutan erfolgt, lassen die Überlegung aufkommen, ob nicht nur im peripherem Blut, sondern auch in Biopsien aus den Lymphknoten und der Haut, in die das Wespengift bei der SIT regelmäßig gespritzt wird, antigenspezifische T-Zellen charakterisiert und anschließend mit den Ergebnissen des peripheren Bluts verglichen werden sollten. Dies könnte zusätzliche Erkenntnisse zu dem immunologischen Wirkungssystem von Immuntherapien liefern und könnte gleichzeitig prüfen, ob die subkutane Injektion des Allergens tatsächlich die Methode der Wahl einer Immuntherapie darstellt, oder ob eine intrakutane oder sogar intralymphatische Applikation des Allergens die Effektivität der Immuntherapie weiter steigern könnte.

## 7 Zusammenfassung

Wespengiftallergien gehören zu den Hauptverursachern von schweren Anaphylaxien in Deutschland. Obwohl sich die spezifische Immuntherapie (SIT) als effektive Therapie etabliert hat, sind die immunologischen Mechanismen dieser Therapie, insbesondere der Einfluss von antigenspezifischer T-Zellen nicht vollständig verstanden und Studien durch geringe T-Zellfrequenzen in der Peripherie begrenzt. Um ein besseres Verständnis für den Wirkmechanismus von SITs zu erlangen, wurden in der vorliegenden Untersuchung die antigenspezifischen, peripheren T-Zellantworten während der Einleitung einer Wespengift-Immuntherapie direkt und ex-vivo mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Hierfür wurde das neuartige antigenspezifische T-Zellen-Anreicherungs-Protokoll (*ARTE: antigen-reactive T cell enrichment*) eingesetzt, das es ermöglicht geringe Mengen antigenspezifischer T-Zellen durchflusszytometrisch zu untersuchen.

Es wurde die antigenspezifische T-Zellantwort von 20 Wespengiftallergikern vor SIT und in einem Zeitraum von ein, drei und sieben Wochen nach der Einleitungsphase mit ARTE charakterisiert werde. Nach 7h in vitro Stimulation mit Wespengift wurden wespengiftspezifische T-Zellen via CD40L (CD154) magnetisch angereichert und analysiert (CD4<sup>+</sup>, CD45-RO<sup>+</sup>, CD154<sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>). Weitere 6 Probanden wurden auf IL-5<sup>+</sup>, IL-9<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup> und Ki-67<sup>+</sup> T-Zellen vor SIT und eine Woche nach der SIT-Steigerungsphase untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass die Frequenz der CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD154<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> T-Zellen zu Beginn der SIT signifikant anstieg, worauf ein schneller Rückgang zu

Ausgangswerten folgte. Ähnliche Ergebnisse ergab die Analyse von IL-5<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> und CD45-RO<sup>+</sup> T-Zellen. Ein Anstieg von IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-10<sup>+</sup> T-Zellen war zu keinem Zeitpunkt der Studie messbar.

Die Untersuchung zeigte, dass wiederholte Wespengiftinjektionen bei Wespengiftallergikern nach einem anfänglichen Anstieg zu einer Abnahme der wespengiftspezifischen IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> und IL-13<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen führt, was eine Deletion oder Anergie von T<sub>H</sub>2-Zellen vermuten lässt. Die kürzlich bei Atopikern entdeckte Subpopulation von T<sub>H</sub>2-Zellen, die T<sub>H</sub>2A-Zellen, die durch eine SIT eliminiert werden, bekräftigt die Theorie von der Deletion pathologischen T<sub>H</sub>2-Zellen als wichtigsten immunologischen Mechanismus einer SIT. Der Idee der Entwicklung eines protektiven Phänotyps widerspricht, dass in dieser Untersuchung kein Anstieg antigenspezifischer IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-10<sup>+</sup> T-Zellen zu verzeichnen war.

Schlussfolgernd ermöglicht das neuartige ARTE-Protokoll die Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen direkt und ex-vivo, wodurch Artefakte aufgrund zeitaufwändiger ex-vivo Methoden vermieden werden. Das ARTE-Protokoll kann somit in Zukunft bei der Erforschung der immunologischen Mechanismen der SIT nützlich sein.

## 8 Summary

Wasp venom allergy is one of the main reasons for severe anaphylaxis. Although venom immunotherapy (VIT) is an efficient therapy, its mechanisms at the antigen specific T-cell level are still not completely understood and studies are limited due to their low frequency in the periphery. Here we characterised antigen-specific peripheral T-cell responses during initiation of VIT directly *ex vivo* by applying the novel flow cytometric antigen-reactive T cell enrichment protocol (ARTE) to analyse small amounts of antigen-specific T cells.

20 patients with wasp allergy were studied by using ARTE during the course of VIT. After 7 h *in vitro* stimulation wasp allergen-reactive T cells were magnetically enriched via CD40L (CD154) and characterized (CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CD154<sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) before starting immunotherapy and then one, three and seven weeks after initiating VIT. In addition, six patients were further analysed for IL-5<sup>+</sup>, IL-9<sup>+</sup>, IL-13<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup> T-cells before and one week after the initiation of VIT.

We observed a significant increase of antigen specific CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells and antigen-specific IL-4 producing T<sub>H</sub>2 cells at the beginning of VIT. This was followed by a rapid decline to baseline levels. The further analysis of the T<sub>H</sub>2 compartment showed an increase of IL-5 and Ki-67 producing T cells, comparable to the development of IL-4 producing T<sub>H</sub>2 cells. Similar findings were obtained by analysing CD45-RO<sup>+</sup> T cells and IL-2 producing T cells. An increase of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup> T cells was not detectable at any time point of the study and generally their amounts were noticeably low during the entire study.

Our study shows that repeated wasp injections promote an early onset of increased numbers of antigen specific IL-4, IL-5 and IL-13 producing T<sub>H</sub>2 cells which decrease during the course of VIT to baseline levels. The data suggest that repeated allergen injections may rather cause a deletion or anergy of the antigen specific T<sub>H</sub>2 cells. The decrease of T<sub>H</sub>2 cells during the course of VIT was not accompanied by an increase of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> or IL-10 producing cells, challenging the concept of deviation into a “protective” phenotype. Considering the findings, the application of novel flow cytometric tools enables to study antigen specific T cell responses direct *ex vivo* and thereby helps to circumvent artefacts induced by *ex vivo* expansion methods.

## 9 Literaturverzeichnis

- Akdis, C.A./ Akdis, M./ Blesken, T./ Wymann, D./ Alkan, S.S./ Müller, U./ Blaser, K. (1996): Epitope-specific T Cell Tolerance to Phospholipase A2. In: *The Journal of Clinical Investigation*. 98. Jahrgang, Heft 7, S. 1676 – 1683.
- Akdis, C.A./ Blesken, T./ Akdis, M./ Wüthrich B./ Blaser, K. (1998): Role of Interleukin 10 in Specific Immunotherapy. In: *The Journal of Clinical Investigation*. 102. Jahrgang, Heft 1, S. 98 – 106.
- Akdis, C.A./Akdis, M. (2011): Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127. Jahrgang, Heft 1, S. 18 – 27.
- Akdis, C.A./Akdis, M.(2015): Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. In: *World Allergy Organization Journal*. 8. Jahrgang, Heft 1, S. 17 – 29.
- Akdis, M./ Verhagen, J./ Taylor, A./ Karamloo, F./ Karagiannidis, C./ Cramer, R./ Thunberg, S./ Deniz, G./ Valenta, R./ Fiebig, H./ Kegel, C./ Disch, R./ Schmidt-Weber, C.B./ Blaser, K./ Akdis, C.A. (2004): Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. In: *The Journal of Experimental Medicine*. 199. Jahrgang, Heft 11, S. 1567 – 1575.
- Akdis, M./ Blaser, K./ Akdis, C.A. (2005): T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 116. Jahrgang, Heft 5, 961-968.
- Averbck, M./ Gebhardt, C./ Emmrich, F./ Treudler, R./ Simon, J.C. (2007): Immunologic principles of allergic disease. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 5. Jahrgang, Heft 11, S. 1015 – 1026.
- Aversa, G./ Punnonen, J./ Carballido, J.M./ Cocks, B.G./ de Vries, J.E. (1994): CD40 ligand-CD40 interaction in Ig isotype switching in mature and immature human B cells. In: *Seminars in Immunology*. 6. Jahrgang, S. 295 – 301.
- Bacher, P./ Scheffold, A. (2013a): Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. In: *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 83. Jahrgang, Heft 8, S. 692 – 701.
- Bacher, P./ Schink, C./ Teutschbein, J./ Kniemeyer, O./ Assenmacher, M./ Brakhage, A.A./ Scheffold, A. (2013b): Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. In: *Journal of Immunology*. 190. Jahrgang, Heft 8, S. 3967 – 3976.

- Bacher, P./ Kniemeyer, O./ Schönbrunn, A./ Sawitzki, B./ Assenmacher, M./ Rietschel, E./ Steinbach, A./ Cornely, O.A./ Brakhage, A.A./ Thiel, A./ Scheffold, A. (2014): Antigen specific expansion of human regulatory T cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi. In: *Mucosal Immunology*. 7. Jahrgang, Heft 4, S. 916 – 928.
- Bacher, P./ Scheffold, A. (2015): New technologies for monitoring human antigen-specific T cells and regulatory T cells by flow-cytometry. In: *Current Opinion in Pharmacology*. 23. Jahrgang, S. 17 – 24.
- Bacher, P./ Heinrich, F./ Stervbo, U./ Nienen, M./ Vahldieck, M./ Iwert, C./ Vogt, K./ Kollet, J./ Bael, N./ Sawitzki, B./ Schwarz, C./ Bereswill, S./ Heimesaat, M.M./ Heine, G./ Gadermaier, G./ Asam, C./ Assenmacher, M./ Kniemeyer, O./ Brakhage, A.A./ Ferreira, F./ Wallner, M./ Worm, M./ Scheffold, A. (2016): Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. In: *Cell*. 167. Jahrgang, Heft 4, S.1067 – 1078.
- Bacher, P./ Scheffold, A. (2018): The effect of regulatory T cells on tolerance to airborne allergens and allergen immunotherapy. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 142. Jahrgang, Heft 6, S. 1697 – 1709.
- Banghard, Dr. med. Werner/ Bencard® (07.05.2019): Nomenclature of the Animal of Origin of the Allergen Extract "Venomil Wasp". E-Mail: banghardw@bencard.com, Telefon: +49 89 36811-486.
- Bakker, A.H./ Schumacher, T.N.M. (2005): MHC multimer technology: current status and future prospects. In: *Current Opinion in Immunology*. 17. Jahrgang, Heft 4, S. 428 – 433.
- BD Biosciences (2014): Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung, S. 5–36. <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=31055> (30.12.2019).
- Bellinghausen, I./ Metz, G./ Enk, A.H./ Christmann, S./ Knop, J./ Saloga, J. (1997): Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. In: *European Journal of Immunology*. 27. Jahrgang, S. 1131 – 1139.
- Bencard® (2005): Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels) Venomil® Wespe S. 1–5. <https://docplayer.org/114296976-Fachinformation-zusammenfassung-der-merkmale-des-arzneimittels.html> (30.12.2019)
- Blotta, M.H./ Marshall, J.D./ DeKruyff, R.H./ Umetsu, D.T. (1996): Cross-linking of the CD40 ligand on human CD4+ T lymphocytes generates a costimulatory signal that up-



- regulates IL-4 synthesis. In: *The Journal of Immunology*. 156. Jahrgang, Heft 9, S.3133 – 3140.
- Bohle, B./ Kinaciyan, T./ Gerstmayr, M./ Radakovics, A./ Jahn-Schmid, B/ Ebner, C. (2007): Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 120. Jahrgang, Heft 3, S. 707 – 713.
- Bonifazi, F./ Jutel, M./ Biló, B.M./ Birnbaum, J./ Müller, U. (2005): Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. In: *Allergy*. 60. Jahrgang, Heft 12, S. 1459 – 1470.
- Brockow, K./ Jofer, C./Behrendt, H./Ring, J. (2008): Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. In: *Allergy*. 63. Jahrgang, Heft 2, S. 226 – 232.
- Brockow, K./ Kiehn, M./ Riethmuller, C./ Vieluf, D./ Berger, J./Ring, J. (1997): Efficacy of antihistamine pretreatment in the prevention of adverse reactions to Hymenoptera immunotherapy: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 100. Jahrgang, Heft 4, S. 458 – 463.
- Carballido J.M./ Carballido-Perrig, N./ Terres, G./ Heusser, C.H./ Blaser K. (1992): Bee venom phospholipase A2-specific T cell clones from human allergic and non-allergic individuals: cytokine patterns change in response to the antigen concentration. In: *European Journal of Immunology*. 22. Jahrgang, Heft 6, S. 1357 – 1363.
- Carballido J.M./ Faith, A./ Carballido-Perrig, N./ Blaser, K.(1997): The intensity of T cell receptor engagement determines the cytokine pattern of human allergen-specific T helper cells. In: *European Journal of Immunology*. 27. Jahrgang, S. 515 – 521.
- Chattopadhyay, P.K./ Yu, J./ Roederer, M. (2005): A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. In: *Nature Medicine*. 11. Jahrgang, Heft 10, S. 1113 – 1117.
- Chiang, D./ Chen, X./ Jones, S.M./ Wood, R.A./ Sicherer, S.H./ Burks, A.W./ Leung, D. Y.M./ Agashe, C./ Grishin, A./ Dawson, P./ Davidson, W.F./ Newman, L./ Sebra, R./ Merad, M./ Sampson, H.A./ Losic, B./ Berin, M.C.(2018): Single-cell profiling of peanut-responsive T cells in patients with peanut allergy reveals heterogeneous effector TH2 subsets. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 141. Jahrgang, Heft 6, S. 2107 – 2120.
- Cox, L./ Larenas-Linnemann, D./ Lockey, R.F./ Passalacqua, G. (2010): Speaking the same language: The World Allergy Organization Subcutaneous Immunotherapy Systemic

- Reaction Grading System. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125. Jahrgang, Heft 3, S. 569 – 574.
- Del Prete, G./ De Carli, M./ Almerigogna, F./ Giudizi, M.G./ Biagiotti, R./ Romagnani, S. (1993): Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production  
In: *The Journal of Immunology*. 150. Jahrgang, Heft 2, S. 353 – 360.
- Demoly, P./ Piette, V./ Daures, J.-P. (2003): Treatment of allergic rhinitis during pregnancy.  
In: *Drugs*. 63. Jahrgang, Heft 17, S. 1813–1820.
- Dillon, M.B.C./ Schulten, V./ Oseroff, C./ Paul, S./ Dullanty, L.M./ Frazier, A./ Belles, X./ Piulachs, M.-D./ Visness, C./ Bacharier, L./ Bloomberg, G.R./ Busse, P./ Sidney, J./ Peters, B./ Sette, A. (2015): Different Bla-g T cell antigens dominate responses in asthma versus rhinitis subjects. In: *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 45. Jahrgang, Heft 12, S. 1856 – 1867.
- Durham, S.R./ Nelson, H. (2011): Allergen immunotherapy: a centenary celebration. In: *World Allergy Organization Journal*. 4. Jahrgang, Heft 6, S. 104 – 106.
- Durham, S.R./ Ying, S./ Varney, V.A./ Jacobson, M.R./ Sudderick, R.M./ Mackay, I.S./ Kay, A.B./ Hamid, Q.A. (1996): Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4 + T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- $\gamma$ . In: *Journal of Allergy and Clinical Immunotherapy*. 97. Jahrgang, Heft 6, S. 1356 – 1365.
- Eckl-Dorna, J./ Villazala-Merino, S./ Linhart, B./ Karaulov, A.V./ Zhernov, Y./ Khaitov, M./ Niederberger-Leppin, V./ Valenta, R. (2018): Allergen-specific antibodies regulate secondary allergen-specific immune responses. In: *Frontiers in Immunology*. 9. Jahrgang, S. 1 – 15.
- Erdmann, S.M./ Sachs, B./ Kwiecien, R./ Moll-Slodowy, S./ Sauer, I./ Merk, H.F. (2004): The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. In: *Allergy*. 59. Jahrgang, Heft 10, S. 1102 – 1109.
- Farrar, J.D. / Asnagli, H. /Murphy, K.M. (2002): T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. In: *Journal of Clinical Investigation*. 109. Jahrgang, Heft 4, S. 431 – 435.
- Fleisher A.T. / Olivera J.B. (2019): Flow Cytometry. In: *Clinical Immunology. Principles and Practice*. Fünfte Auflage. S.1239-1251

- Francis, J.N./ Till, S.J./ Durham, S.R. (2003): Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111. Jahrgang, Heft 6, S. 1255 – 1261.
- Galera, C./ Soohun, N./ Zankar, N./ Caimmi, S./ Gallen, C./ Demoly, P. (2009): Severe anaphylaxis to bee venom immunotherapy: efficacy of pretreatment and concurrent treatment with omalizumab. In: *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. 19. Jahrgang, Heft 3, S. 225 – 229.
- Galli, S.J./ Tsai, M./ Piliponsky, A.M. (2008): The development of allergic inflammation. In: *Nature*. 454. Jahrgang, Heft 7203, S. 445–454.
- Gleich, G.J./ Zimmermann, E.M./ Henderson, L.L./ Yunginger, J.W. (1982): Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 70. Jahrgang, Heft 4, S. 261-271
- Groux, H./ Bigler, M./ de Vries, J.E./ Roncarolo, M.-G. (1996): Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. In: *The Journal of Experimental Medicine*. 184. Jahrgang, Heft 1, S. 19 – 29.
- Groux, H./ O'Garra, A./ Bigler, M./ Rouleau M./ Antonenko, S./ de Vries, J.E./ Roncarolo, M.-G. (1997): A CD4+T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. In: *Nature*. 389. Jahrgang, Heft 6652, S. 737 – 742.
- Guenova, E./ Volz, T./ Eichner, M./ Hoetzenecker, W./ Caroli, U./ Griesinger, G./ Burow, G./ Mitev, V./ Biedermann, T. (2010a): Basal serum tryptase as risk assessment for severe Hymenoptera sting reactions in elderly. In: *Allergy*. 65. Jahrgang, Heft 7, S. 919 – 923.
- Guenova, E./ Volz, T./ Eichner, M./ Hoetzenecker, W./ Caroli, U./ Griesinger, G./ Burow, G./ Mitev, V./ Biedermann, T. (2010b): Basal serum tryptase as risk assessment for severe Hymenoptera sting reactions in elderly. In: *Allergy*. 65. Jahrgang, Heft 7, S. 919 – 923.
- Haerberli, G./ Bronnimann, M./ Hunziker, T./ Müller, U. (2003): Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 33. Jahrgang, Heft 9, S. 1216 – 1220.
- Hoffman, D.R./ Jacobson R.S. (1984): Allergens in hymenoptera venom XII: How much protein is in a sting? In: *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 52. Jahrgang, Heft 4, S. 276 – 278.

- Hunt, K.J./ Valentine, M.D./ Sobotka, A.K./ Benton, A.W./ Amodio, F.J./ Lichtenstein, L.M. (1978a): A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. In: The New England Journal of Medicine. 299. Jahrgang, Heft 4, S. 157 – 161.
- Hunt, K.J./ Valentine, M.D./ Sobotka, A.K./ Benton, A.W./ Amodio, F.J./ Lichtenstein, L.M. (1978b): A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. In: he New England Journal of Medicine. 299. Jahrgang, Heft 4, S. 157 – 161.
- Hylander, T./ Latif, L./ Petersson-Westin, U./ Cardell, L.O. (2013): Intralymphatic allergen-specific immunotherapy: An effective and safe alternative treatment rout for pollen induced allergic rhinitis. In: The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 131. Jahrgang, Heft 2, S.412 – 420
- Jutel, M./ Pichler, W.P./ Skrbic, D./ Urwyler, A./ Dahinden, C./ Müller, U.R. (1995): Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. In: The Journal of Immunology. 154. Jahrgang, Heft 8, S. 4187 – 4194.
- Kay, A.B. (2001): Allergy and allergic diseases. First of two parts. In: The New England Journal of Medicine. 344. Jahrgang, Heft 1, S. 30 – 37.
- Kelso J.M. (2004): The rate of systemic reactions to immunotherapy injections is the same whether or not the dose is reduced after a local reaction. In: Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 92. Jahrgang, Heft 2, S. 225 – 227.
- Kleine-Tebbe, J./ Bufe, A./ Ebner, C./ Eigenmann, P./ Friedrichs, F./ Fuchs, T./ Huttegger, I./ Jung, K./ Klimek, L./ Kopp, M./ Lässig, W./ Merk, H./ Niggemann, B./ Rabe, U./ Saloga, J./ Schmid-Grendelmeier, P./ Sitter, H./ Virchow, J.C./ Wagenmann, M./ Wedi, B./ Worm, M. (2009): Die spezifische Immuntherapie bei IgE vermittelten allergischen Erkrankungen. In: Allergo Journal. 18. Jahrgang, S. 508 – 537.
- Klimek, L./ Vogelberg, C./ Werfel, T. (2018): Weißbuch Allergie in Deutschland. 4. Auflage. Springer Medizin Verlag S.21.
- Korosec, P./ Erzen, R./ Silar, M./ Bajrovic, N./ Kopac, P./ Kosnik, M. (2009): Basophil responsiveness in patients with insect sting allergies and negative venom-specific immunoglobulin E and skin prick test results. In: Clinical and Experimental Allergy. 39. Jahrgang, Heft 11, S. 1730 – 1737.
- Kwok, W.W./ Roti, M./ DeLong, J.H./ Tan, V./ Wambre, E./ James, E.A./Robinson, David (2010): Direct ex vivo analysis of allergen-specific CD4+ T cells. In: The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 125. Jahrgang, Heft 6, S. 1407 – 1409.

- La Sala, A./ Urbani, F./ Torosantucci, A./ Cassone, A./ Ausiello, C.M. (1996): Mannoproteins from *Candida albicans* elicit a Th-type-1 cytokine profile in human *Candida* specific long-term T cell cultures. In: *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 10. Jahrgang, Heft 1, S. 8 – 12.
- Lee, H./ Roediger, C./ Bauer, A./ Zuberbier, T./ Worm, M. (2006): Prospective safety analysis of an ultrarush specific immunotherapy in adults with wasp venom allergy. 61. Jahrgang, Heft 10, S. 1237-1238.
- Leonard, C./ Tormey, V./ Burke, C./ Poulter L.W. (1997): Allergen-induced Cytokine Production in Atopic Disease and Its Relationship to Disease Severity. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 17. Jahrgang, Heft 3, S. 368 – 375.
- Li, L./Boussiotis, V.A. (2006): Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. In: *Journal of Molecular Medicine*. 84. Jahrgang, Heft 11, S. 887 – 899.
- Ludolph-Hauser, D. / Ruëff, F./ Fries, C./ Schopf, P./ Przybilla, B. (2001): Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. In: *Lancet*. 357. Jahrgang, Heft 9253, S. 361 – 362.
- Macaubas, C./ Wahlstrom, J./ Galvao da Silva, A.P./ Forsthuber, T.G./ Sonderstrup, G./ Kwok, W.W./ DeKruyff, R.H./ Umetsu, D.T. (2006): Allergen-Specific MHC Class II Tetramer+ Cells Are Detectable in Allergic, but Not in Nonallergic, Individuals. In: *The Journal of Immunology*. 176. Jahrgang, Heft 8, S. 5069 – 5077.
- Makatsori, M./ Calderon, M.A. (2014): Anaphylaxis: still a ghost behind allergen immunotherapy. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 14. Jahrgang, Heft 4, S. 316 – 322.
- Marcotte, G.V./ Braun, C.M./ Norman, P.S./ Nicodemus, C.F./ Kagey-Sobotka, A./ Lichtenstein, L.W./ Essayan, D.M. (1998): Effects of peptide therapy on ex vivo T-cell responses. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunotherapy*. 101. Jahrgang, Heft 4, S. 505 – 513.
- Marshall G.D./ Agarwal S.K./ Lloyd C./ Cohen L./ Henninger E.M./ Morris G.J. (1998): Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. In: *Brain, Behavior, and Immunity*. 12. Jahrgang, Heft 4, S. 297 – 307.
- McHugh S.M./ Deighton J./ Stewart A.G./ Lachmann P.J./ Ewan P.W. (1995): Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 25. Jahrgang, Heft 9, 828 – 738.

- McMichael, A.J./ Kelleher, A. (1999): The arrival of HLA class II tetramers. In: *Journal of Clinical Investigation*. 104. Jahrgang, Heft 12, S. 1669 – 1670.
- Meiler, F./ Zumkehr, J./ Klunker, S./ Rückert, B./ Akdis, C.A./ Akdis, M.(2008): In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. In: *The Journal of Experimental Medicine*. 205. Jahrgang, Heft 12, S. 2887 – 2898.
- Miltenyi, S./ Müller, W./ Weichel, W. / Radbruch, A. (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. In: *Cytometry. Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 11. Jahrgang, Heft 2, S. 231 – 238.
- Miltenyi Biotec® (2018): CD40 antibodies – functional grade, human. In: Data sheet. Version 02. <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macsf-flow-cytometry/antibodies/primary-antibodies/cd40-antibodies-functional-grade-human-hb14.html> (05.01.2020)
- Miltenyi Biotec® (2019): Magnetic cell separation. <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/resources/macshandbook/macstechnologies/cell-separation/magnetic-cell-separation.html> (06.01.2020)
- Möbs, C./ Ipsen, H./ Mayer, L./ Slotoch, C./ Petersen, A./ Würtzen, P./ Hertl, M./ Pfützner, W. (2012): Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific TH2 responses, transient TR1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 130. Jahrgang, Heft 5, S. 1108 – 1116.
- Moore, K.W./ O'Garra, A./ de Waal Malefyt, R./ Vieira, P./ Mosmann, T.R. (1993): Interleukin-10. In: *Annual Review of Immunology*. 11. Jahrgang, S. 165 – 190.
- Mosbech, H./ Müller, U. (2000): Side-effects of insect venom immunotherapy: results from an EAACI multicenter study. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. In: *Allergy*. 55. Jahrgang, Heft 11, S. 1005 – 1010.
- Müller, H.L. (1966): Diagnosis and Treatment of Insect Sensitivity. In: *Journal of Asthma Research*. 3. Jahrgang, Heft 4, S. 331 – 333.
- Müller, U./ Thurnheer, U./ Patrizzi, R./ Spiess, J./ Hoigne, R. (1979): Immunotherapy in bee sting hypersensitivity. Bee venom versus wholebody extract. In: *Allergy*. 34. Jahrgang, Heft 6, S. 369 – 378.
- Müller, U./ Akdis, C.A./ Fricker, M./ Akdis, M./ Blesken, T./ Bettens, F./ Blaser K. (1998): Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 101. Jahrgang, Heft 6, S. 747 – 754.

- Müller, U.R./ Haeberli, G. (2005): Use of beta-blockers during immunotherapy for Hymenoptera venom allergy. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115. Jahrgang, Heft 3, S. 606 – 610.
- Murphy, D.B. (1993): T cell mediated immunosuppression. In: *Current Opinion in Immunology*. 5. Jahrgang, Heft 3, S. 411 – 417
- Murphy, K.M./ Travers, P./ Walport, M. (2014): *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Berlin/Heidelberg: Springer Spektrum.
- Nielsen, L./ Johnsen, C.R./ Mosbech, H./ Poulsen, L.K./ Malling, H.J. (1996): Antihistamine premedication in specific cluster immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled study. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 97. Jahrgang, Heft 6, S. 1207 – 1213.
- Nisini, R./ Romagnoli, G./ Gomez, M.J./ La Valle, R./ Torosantucci, A./ Mariotti, S./ Teloni R./ Cassone, A.(2001): Antigenic properties and processing requirements of 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of anti-Candida human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones. In: *Infection and Immunity*. 69. Jahrgang, Heft 6, S. 3728 – 3736.
- Nouri-Aria, K.T./ Wachholz, P.A./ Francis, J.N./ Jacobson, M.R./ Walker, S.M./ Wilcock, L.K./ Staple, S.Q./ Aalberse, R.C./ Till, S.J./ Durham, S.R. (2004): Grass Pollen Immunotherapy Induces Mucosal and Peripheral IL-10 Responses and Blocking IgG Activity. In: *The Journal of Immunology*. 172. Jahrgang, Heft 5, S. 3252 – 3259.
- O'Brien R.M./ Byron K.A./ Varigos G.A./ Thomas W.R. (1997): House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN- $\gamma$  and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 27. Jahrgang, Heft 1, S. 46 – 51.
- OLS-Omni Life Science GmbH & Co. KG (2016): CASY - Meet the Legend in Cell-based Research, S. 3–4. [https://www.ols-bio.de/media/pdf/CASY\\_2017\\_ebook.pdf](https://www.ols-bio.de/media/pdf/CASY_2017_ebook.pdf) (30.12.2019)
- Oude Elberink, J.N.G./ van der Heide, S./ Guyatt, G.H./ Dubois, A.E.J. (2009): Immunotherapy improves health-related quality of life of adult patients with dermal reactions following yellow jacket stings. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 39. Jahrgang, Heft 6, S. 883 – 889.
- Parviainen, S./ Taivainen, A./ Liukko, A./ Nieminen, A./ Rytönen-Nissinen, M./ Kinnunen, T. / Virtanen, T. (2010): Comparison of the allergic and nonallergic CD4+ T-cell

- responses to the major dog allergen Can f 1. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 126. Jahrgang, Heft 2, S. 406 – 408.
- Pène J./ Desroches, A./ Paradis, L./ Lebel, B./ Farce, M./ Nicodemus, C.F./ Yssel, H./ Bousquet, J. (1998): Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells of patients allergic to cats. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 102. Jahrgang, S. 571 – 578.
- Pfaar, O./ Bachert, C./ Bufe, A./ Buhl, R./ Ebner, C./ Eng, P./ Friedrichs, F./ Fuchs, Thomas/ Hamelmann, E./ Hartwig-Bade, D./ Hering, T./ Huttegger, I./ Jung, K./ Klimek, L./ Kopp, M.V./ Merk, H./ Rabe, U./ Saloga, J./ Schmid-Grendelmeier, P./ Schuster, A./ Schwerk, N./ Sitter, H./ Umpfenbach, U./ Wedi, B./ Wöhrl, S./ Worm, M./ Kleine-Tebbe, J. (2014b): Leitlinie zur (allergen-) spezifischen Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (AeDA), der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI), der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie (DGHNO-KHC), der Deutschen Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin (DGKJ), der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (GPP), der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP), des Deutschen Berufsverbandes der HNO-Ärzte (BV-HNO), des Berufsverbandes der Kinder- und Jugendärzte (BVKJ), des Bundesverbandes der Pneumologen (BDP) und des Berufsverbandes der Deutschen Dermatologen (BVDD). In: *Allergo Journal International*. 316. Jahrgang, Heft 23, S. 28 – 64.
- Przybilla, B./ Ruëff, F./ Walker, A./ Räwer, H.-C./ Aberer, W./ Bauer, C.P./ Berdel, D./ Biedermann, T./ Brockow, K./ Forster, J./ Fuchs, T./ Hamelmann, E./ Jakob, T./ Jarisch, R./ Merk, H.F./ Müller, U./ Ott, H./ Sitter, W./ Urbanek, R./ Wedi, B. (2011): Diagnose und Therapie der Bienen und Wespengiftallergie. Leitlinie Insektengiftallergie 2011. *Allergo Journal*, 20. Jahrgang, S. 318 – 339.
- Reimers, A./ Hari, Y./ Müller, U. (2000): Reduction of side-effects from ultrarush immunotherapy with honeybee venom by pretreatment with fexofenadine: a double-blind, placebo-controlled trial. In: *Allergy*. 55. Jahrgang, Heft 5, S. 484 – 488.
- Reisinger, J./ Horak, F./ Pauli, G./ van Hage, M./ Cromwell, O./ König, F./ Valenta, R./ Niederberger, V. (2005): Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination



- with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 116. Jahrgang, Heft 2, S. 347 – 354.
- Renz, H./ Biedermann, T./ Bufe, A./ Eberlein, B./ Jappe, U./ Ollert, M./ Petersen, A./ Kleine-Tebbe, J./ Raulf-Heimsoth, M./ Saloga, J./ Werfel, T./ Worm M. (2010): In-vitro-Allergiediagnostik. In: *Allergo Journal*. 19. Jahrgang, S. 110–128.
- Renzi P.M./ Turgeon, J.P./ Marcotte, J.E./ Drblik, S.P./ Bérubé, D./ Gagnon, M.F./ Spier, S. (1999): Reduced Interferon- $\gamma$  Production in Infants with Bronchiolitis and Asthma. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 159. Jahrgang, S. 1417 – 1422.
- Reinck, H./ Ruëff, F./ Przybilla, B. (2008): Recurrent Severe Anaphylactic Reactions to Venom Immunotherapy (VIT): Omalizumab Induces Tolerance. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 121. Jahrgang, Heft 2, S.29
- Ring, J./ Beyer, K./ Biedermann, T./ Bircher, A./ Duda, D./ Fischer, J./ Friedrichs, F./ Fuchs, Thomas/ Gieler, U./ Jakob, T./ Klimek, L./ Lange, L./ Merk, H.F./ Niggemann, B./Pfaar, O./ Przybilla, B./ Ruëff, F./ Rietschel, E./ Schnadt, S./ Seifert, R./ Sitter, H./ Varga, E. M./Worm, M./ Brockow, K. (2014): Leitlinie zu Akuttherapie und Management de Anaphylaxie S2-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinisch Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbands Deutscher Allergologen (AeDA), de Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutsche Akademie für Allergologie und Umweltmedizin (DAAU), des Berufsverbands der Kinder- und Jugendärzte Deutschlands (BVKJ), der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI), der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI), der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI), der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Psychosomatische Medizin (DGPM), der Arbeitsgemeinschaft Anaphylaxie Training und Edukation (AGATE) und der Patientenorganisation Deutscher Allergie- und Asthmabund (DAAB). In: *Allergo Journal International*. 23. Jahrgang, Heft 3, S. 96 – 112.
- Ring J, Meßmer K. (1977): Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. 309. Jahrgang, Heft 8009, S. 466 – 469.

- Roesch, A./ Boerzsoenyi, J./ Babilas, P./ Landthaler, M./ Szeimies, R.-M. (2008): Outcome survey of insect venom allergic patients with venom immunotherapy in a rural population. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 6. Jahrgang, Heft 4, S. 292–297.
- Rogers, P.R./ Croft, M.(1999): Peptide Dose, Affinity, and Time of Differentiation Can Contribute to the Th1/Th2 Cytokine Balance. In: *Journal of Immunology*. 163. Jahrgang, Heft 3, S. 1205–1213.
- Rolland J./ O'Hehir, R. (1998): Immunotherapy of allergy: anergy, deletion, and immune deviation. In: *Current Opinion in Immunology*. 10. Jahrgang, Heft 6, S. 640 – 645.
- Romagnani, S. (2004): Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113. Jahrgang, Heft 3, S. 395 – 400.
- Ruëff, F./ Przybilla, B./ Müller, U./ Mosbech, H. (1996): The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. In: *Allergy*. 51. Jahrgang, Heft 4, S. 216 – 225.
- Ruëff, F./ Wenderoth, A./ Przybilla, B. (2001): Patients still reacting to a sting challenge while receiving conventional Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108. Jahrgang, Heft 6, S. 1027 – 1032.
- Ruëff, F./Placzek, M. / Przybilla, B. (2006): Mastocytosis and Hymenoptera venom allergy. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical immunology*. 6. Jahrgang, Heft 4, S. 284 – 288.
- Ruëff, F./ Przybilla, B./ Bilo, M.B./ Müller, U./ Scheipl, F./ Aberer, W./ Birnbaum, J./ Bodzenta-Lukaszyk, A./ Bonifazi, F./ Bucher, C./ Campi, P./ Darsow, U./ Egger, C./ Haeberli, G./ Hawranek, T./ Korner, M./ Kucharewicz, I./ Kuchenhoff, H./ Lang, R./ Quercia, O./ Reider, N./ Severino, M./ Sticherling, M./ Sturm, G.J./ Wuthrich, B. (2009): Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase—a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124. Jahrgang, Heft 5, S. 1047 – 1054.
- Ruëff, F./ Bergmann, K.-C./ Brockow, K./ Fuchs, T./ Grübl, A./ Jung, K./ Klimek, L./ Müsken, H./ Pfaar, O./ Przybilla, B./ Sitter, H./ Wehrmann, W. (2010): Hauttests zur

- Diagnostik von allergischen Soforttypreaktionen. In: *Allergo Journal*. 19. Jahrgang, S. 402 – 415.
- Santana M.A./ Rosenstein Y. (2003): What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. In: *Journal of Cellular Physiology*. 195. Jahrgang, Heft 3, S. 392 – 401.
- Schäfer, T. (2009): Epidemiologie der Insektengiftallergie. In: *Allergo Journal*. 18. Jahrgang, Heft 5, S. 353–358.
- Schandené, L./ Alonso-Vega, C./ Willems, F./ Gérard, C./ Delvaux, A./ Velu, T./ Devos, R./ de Boer, M./ Goldman, M. (1994): B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. In: *The Journal of Immunology*. 152. Jahrgang, Heft 9, S. 4368 – 4374.
- Schulten, V./ Peters, B./ Sette, A. (2014): New strategies for allergen T cell epitope identification: going beyond IgE. In: *International Archives of Allergy and Immunology*. 165. Jahrgang, Heft 2, S. 75 – 82.
- Schulten, V./ Tripple, V./ Aasbjerg, K./ Backer, V./ Lund, G./ Würtzen, P.A./ Sette, A./ Peters B. (2016): Distinct modulation of allergic T cell responses by subcutaneous vs. sublingual allergen-specific immunotherapy. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 46. Jahrgang, Heft 3, S. 439 – 448.
- Schulten, V./ Westernberg, L./ Birrueta, G./ Sidney, J./ Paul, S./ Busse, P./ Peters, B./ Sette, A. (2018): Allergen and Epitope Targets of Mouse-Specific T Cell Responses in Allergy and Asthma. In: *Frontiers in Immunology*. 9. Jahrgang, S. 235.
- Secrist, H./ Chelen, C.J./ Wen, Y./ Marshall J.D./ Umetsu, D.T. (1993): Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4 T cells from allergic individuals. In: *Journal of Experimental Medicine*. 178. Jahrgang, Heft 6, S. 2123 – 2130.
- Secrist, H./ DeKruyff, R.H./ Umetsu, D.T. (1995): Interleukin 4 Production by CD4 + T Cells from Allergic Individuals Is Modulated by Antigen Concentration and Antigen-presenting Cell Type. In: *Journal of Experimental Medicine*. 181. Jahrgang, Heft 3, S. 1081 – 1089.
- Senti, G./ Prinz Vavricka, B.M./ Erdmann, I./ Diaz, M.I./ Markus, R./ McCormack, S.J./ Simard, J.J./ Wuthrich, B./ Cramer, R./ Graf, N./ Johansen, P./ Kundig, T.M. (2008): Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: A randomized controlled trial. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105. Jahrgang, Heft 46, S. 17908 – 17912.

- Senti, G./ Cramer, R./ Krüger, D./ Johansen, P./ Martinez-Gomez, J.M./ Graf, Nicole/ Steiner, M./ Hothorn, L.A./ Grönlund, H./ Tivig, C./ Zaleska, A./ Soyer, O./ van Hage, M./ Akdis, C.A./ Akdis, M./ Rose, H./ Kündig, T.M. (2012): Intralymphatic immunotherapy for cat allergy induces tolerance after only 3 injections. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 129. Jahrgang, Heft 5, S 1290 – 1296
- Simon, A.K./ Hollander, G.A./ McMichael, A. (2015): Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. In: *Proceedings. Biological sciences*. 282. Jahrgang, Heft 1821, S. 1-9
- Simons, F.E.R./ Arduso, L.R.F./ Dimov, V./ Ebisawa, M./ El-Gamal, Y.M./ Lockett, R.F./ Sanchez-Borges, M./ Senna, G.E./ Sheikh, A./ Thong, B.Y./ Worm, M. (2013): World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 update of the evidence base. In: *International Archives of Allergy and Immunology*. 162. Jahrgang, Heft 3, S. 193 – 204.
- Soyer O.U./ Akdis, M./ Ring, J./ Behrendt, H./ Cramer, R./ Lauener, R./ Akdis, C.A. (2013): Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. In: *Allergy*. 68. Jahrgang, Heft 2, S. 161 – 170.
- Steinbrink, K./ Jonuleit, H./ Müller, G./ Schuler, G./ Knop, J./ Enk, A.H (1999): Interleukin-10-Treated Human Dendritic Cells Induce a Melanoma-Antigen-Specific Anergy in CD8+ T Cells Resulting in a Failure to Lyse Tumor Cells. In: *Blood*. 93. Jahrgang, Heft 5, S. 1634 – 1642.
- Strait, R.T./ Morris, S.C./ Finkelman, F.D. (2006): IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking. In: *Journal of Clinical Investigation*. 116. Jahrgang, Heft 3, S. 833-841
- Stumpf, J.L./ Shehab, N./ Patel, A.C. (2006): Safety of Angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with insect venom allergies. In: *The Annals of pharmacotherapy*. 40. Jahrgang, Heft 4, S. 699 – 703.
- Taylor, A./ Verhagen, J./ Blaser, K./ Akdis, M./ Akdis, C.A. (2006): Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. In: *Immunology*. 117. Jahrgang, Heft 4, S. 433 – 442.
- TenBroek Jr., J.A./ Wolf, M.P./ Hoffman, S.N./ Rosenwasser, L.J./Konstam, M.A./Salem, D.N./ Wong, J.B. (2004): Should beta-blockers be given to patients with heart disease and peanut-induced anaphylaxis? A decision analysis. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113. Jahrgang, Heft 5, S. 977 – 982.
- Thiel, A./ Scheffold, A./ Radbruch, A. (2004): Antigen-specific cytometry-new tools arrived! In: *Clinical Immunology*. 111. Jahrgang, Heft 2, S. 155 – 161.

- Fleisher, T.A./ Oliveira, J.B. (2019) *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 5. Auflage. *Diagnostic Immunology - Chapter 92: Flow Cytometry*. Elsevier Verlag.
- Torosantucci, A./ Bromuro, C./ Gomez, M.J./Ausiello, C.M./ Urbani, F./ Cassone, A. (1993): Identification of a 65-kDa Mannoprotein as a Main Target of Human Cell Mediated Immune Response to *Candida albicans*. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 168. Jahrgang, Heft 2, S. 427 – 435.
- Traidl-Hoffmann, C./ Jakob T./ Behrendt, H.(2009): Determinants of allergenicity. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123. Jahrgang, Heft 3, S. 558 – 566.
- Valdor, R./ Macian, F. (2013): Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. In: *Seminars in Immunology*. 25. Jahrgang, Heft 4, S. 313 – 320.
- Varney V.A./ Hamid, Q.A./Gaga, M./ Ying, S./ Jacobson, M./ Frew, A.J./ Kay, A.B./ Durham S.R. (1993): Influence of Grass Pollen Immunotherapy on Cellular Infiltration and Cytokine mRNA Expression during Allergen-induced Late-Phase Cutaneous Responses  
Influence of Grass Pollen Immunotherapy on Cellular Infiltration and Cytokine mRNA Expression during Allergen-induced Late-Phase Cutaneous Responses. In: *Journal of Clinical Investigation*. 92. Jahrgang, Heft 2, S. 644 – 651.
- van Neerven, R.J./ Arvidsson, M./ Ipsen, H./ Sparholt, S.H./ Rak, S./ Wurtzen, P.A. (2004): A double-blind, placebo-controlled birch allergy vaccination study: inhibition of CD23-mediated serum-immunoglobulin E-facilitated allergen presentation. In: *Clinical and Experimental Allergy*. 34. Jahrgang, Heft 3, S. 420–428
- von Mutius, E./ Martinez, F.D/ Fritzsche, C./ Nicolai, T./ Roell, G./ Thiemann, Hans-H. (1994): Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 149. Jahrgang, S. 358 – 364.
- Wachholz, P.A./ Durham, S.R. (2004): Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 4. Jahrgang, Heft 4, S. 313 – 318.
- Wambre, E./ Delong, J.H./ James, E.A./ LaFond, R.E./ Robinson, D./ Kwok, W.W. (2012a): Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T cell outcomes during specific immunotherapy. In: *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 129. Jahrgang, Heft 2, S. 544 – 551.
- Wambre, E./ James, E.A./ Kwok, W.W. (2012b): Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. In: *Current Opinion in Immunology*. 24. Jahrgang, Heft 6, S. 700–706.
- Wambre, E./ Delong, J.H./ James, E.A./ Torres-Chinn, N./ Pflutzner, W./ Mobs, C./

- Durham, S.R./ Till, S.J./ Robinson, D./ Kwok, W.W. (2014): Specific immunotherapy modifies allergen-specific CD4(+) T-cell responses in an epitope-dependent manner In: The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 133. Jahrgang, Heft 3, S. 872 – 879.
- Wambre, E./ Bajzik, V./ Delong, J.H./ O'Brien, K./ Nguyen, Q.-A./ Speake, C./ Gersuk, V.H./ DeBerg, H.A./ Whalen, E./ Ni, C./ Farrington, M./ Jeong, D./ Robinson, D./ Linsley, P. S./ Vickery, B.P./ Kwok, W.W. (2017): A phenotypically and functionally distinct human TH2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. In: Science Translational Medicine. 9. Jahrgang, Heft 401, S.1 – 10
- Wedi, B./ Ruëff, F. (2011): Pharmakoprophylaxe und Begleitmedikation bei spezifischer Immuntherapie. In: Hausarzt. 62. Jahrgang, Heft 9, S. 633–670.
- Weissler, K.A./ Rasooly, M./DiMaggio, T./ Bolan, H./ Cantave, D./ Martino, D./ Neeland, M. R./ Tang, M.L.K./ Dang, T.D./ Allen, K.J./ Frischmeyer-Guerrero, P.A (2018): Identification and analysis of peanut-specific effector T and regulatory T cells in children allergic and tolerant to peanut. In: The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 141. Jahrgang, Heft 5, S. 1699 – 1710
- Wichmann H.-E. (1996): Possible explanation for the different trends of asthma and allergy in east an west Germany. In: Clinical and Experimental Allergy. 26. Jahrgang, Heft 6, S. 621 – 623.
- Worm, M./ Eckermann, O./ Dölle, S./ Aberer, W./ Beyer, K./ Hawranek, T./ Hompes, S./ Koehi, A./ Mahler, V./ Nemat, K./ Niggemann, B./ Pföhler, C./ Rabe, U./ Reissig, A./ Rietschel, E./ Scherer, K./ Treudler, R./ Rueff, F. (2014): Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4,000 cases from Germany, Austria and Switzerland. In: Deutsches Ärzteblatt. 111. Jahrgang, Heft 21, S. 367-375

## 10 Anhang

### ARTE-Protokoll für eine PBMC-Zellzahl größer $6 \times 10^7$

Wurde die Zellzahl von  $6 \cdot 10^7$  überschritten, dann wurden die Zellen in 6 ml RPMI 1640 Medium + 5 % AB Serum resuspendiert und auf drei Löcher einer 6-Loch-Platte aufgeteilt (jeweils 2 ml/Loch). In jedes Loch wurden 20  $\mu$ l des CD40 Antikörpers und in die mit Wespengift zu stimulierende Probe 40  $\mu$ l Wespengift (1:1 Mischung aus Trockengift und HLA Lösung der Firma Bencard® Allergie) bzw. in die mit dem Candida zu stimulierende Probe 40  $\mu$ l das Candida-Antigen MP65. Anschließend inkubierten die Zellen für fünf Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nachfolgend wurden 4  $\mu$ l Brefeldin A in jedes Loch gegeben und es folgte eine weitere Inkubation von 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurden die Proben in ein 5 ml Reaktionsgefäß gegeben, die Löcher mit 2 ml PEB-Puffer gespült und die Spüllösung ebenfalls in die Reaktionsgefäße gegeben. Gleichzeitig wurden 25  $\mu$ l Zellsuspension aus einem Reaktionsgefäß entnommen und eine Färbung hergestellt, um den Anteil der angereicherter CD4+ T-Zellen zu bestimmen, wie unter 4.6.1 beschrieben.

Die drei Reaktionsgefäße wurden nun bei 4 °C und 400 g mit Bremse für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Im Anschluss wurden die Zellpellets aufgeklopft und jeweils ein Gemisch aus 25  $\mu$ l CD154-Biotin und 125  $\mu$ l PEB-Puffer vorbereitet, in dem die Zellen für zehn Minuten bei 4 °C inkubierten. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 3 ml PEB-Puffer gewaschen und bei 4 °C und 400 g mit Bremse für 5 min Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und ein Gemisch aus 25  $\mu$ l Anti-Biotin MicroBeads Ultra Pure und 125  $\mu$ l PEB-Puffer auf die aufgeklopften Zellpellets gegeben. Während der fünfzehnminütigen Inkubation bei einer Temperatur von 4 °C konnten die MicroBeads den monoklonalen Antikörper CD154-Biotin binden und dadurch die Zellen magnetisieren. Im Anschluss wurden die nicht gebundenen MicroBeads mittels eines Waschriffs, bestehend aus 3 ml PEB-Puffer und einer anschließenden fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 400 g mit Bremse entfernt. Die Zellpellets wurden in 500  $\mu$ l PEB-Puffer resuspendiert und es konnte mit der magnetischen Separation begonnen werden.

Nachdem der MACS Separator zusammengebaut, die Trennsäulen eingehängt und mit 500  $\mu$ l PEB-Puffer befeuchtet wurden, wurden die Proben auf die Trennsäulen aufgetragen. Die Trennsäulen wurden mit 500  $\mu$ l PEB-Puffer und 500  $\mu$ l PBS-Puffer gewaschen und 60  $\mu$ l Oberflächenfärbung auf jede Trennsäule aufgetragen (Tabelle 15), die anschließend für 15 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubierten. Nach der Inkubation wurden die

Trennsäulen mit 500 µl PBS gewaschen und die Zellen mit 500 µl PBS und einem Stempel aus den Trennsäulen eluiert.

Es wurden drei neue Trennsäulen in den MACS Separator eingehängt, jeweils mit 500 µl PEB-Puffer befeuchtet und anschließend die drei Zellsuspensionen auf die Trennsäule aufgetragen. Nachdem die Zellsuspensionen durch die Trennsäulen gelaufen waren, wurde jeweils 200 µl Permeabilisierungspuffer auf die Trennsäulen aufgetragen. Darauf folgte die Intrazellulärfärbung (Tabelle 16 und Tabelle 17), für die 60 µl der Färbelösung auf die Zellen jeder Trennsäule aufgetragen wurden und für 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubierten.

Nach der Inkubation der Intrazellulärfärbung wurden 200 µl Permeabilisierungspuffer auf die Trennsäulen gegeben und anschließend die Zellen mit 1 ml PEB-Puffer aus der Trennsäule in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert. Nachdem die drei Positivfraktionen bei 4 °C und 400 g für 5 min zentrifugiert wurden, konnten die Überstände entfernt und die Zellpellets in 50 µl PEB-Puffer resuspendiert werden. Die Zellen waren nun so aufbereitet, dass sie mit der Durchflusszytometrie analysiert werden konnten.



## 11 Thesen

1. Wiederholte Wespengiftinjektionen führen bei Wespengiftallergikern bereits innerhalb der ersten drei Wochen einer Spezifischen Immuntherapie (SIT) nach einem kurzzeitigen Anstieg eine Woche nach SIT-Beginn zu einer Reduktion von wespengiftspezifischen IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> und IL-13<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen. Dies lässt vermuten, dass die SIT die Deletion oder Anergy von pathologischen T<sub>H</sub>2-Zellen induziert, wodurch eine Toleranz gegenüber dem zu behandelnden Allergen erlangt werden kann.
2. Die SIT induziert keine Proliferation wespengiftspezifischer T-Zellen. Der kurzzeitige Anstieg wespengiftspezifischer IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> und IL-13<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen ging nicht mit einem Anstieg des Proliferationsmarkers Ki-67 einher, sodass der Anstieg dieser Zellen vielmehr durch einen Differenzierungs- als durch einen Proliferationsprozess zu erklären ist.
3. Im Verlauf der SIT- Einleitung kam es zu keinem Anstieg wespengiftspezifischer IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen, wodurch die Theorie, eine SIT induziere die Entwicklung eines protektiven Phänotyps, indem es zu einem T<sub>H</sub>2 zu T<sub>H</sub>1 Wechsels komme, verworfen werden kann. Kontrolluntersuchungen nach einem Jahr SIT bestätigten diese Ergebnisse, da die Frequenz wespengiftspezifischer IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen nach einem Jahr SIT so niedrig war wie zu Beginn der SIT.
4. Im Verlauf der SIT-Einleitung kam es zu keinem Anstieg wespengiftspezifischer IL-10<sup>+</sup> T-Zellen, durch die eine von regulatorische T-Zellen ausgehende Toleranzinduktion hätte begründet werden können. Messungen nach einem Jahr SIT bestätigten, dass die SIT keinen Anstieg wespengiftspezifischer IL-10<sup>+</sup> T-Zellen induziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass 76% der wespengiftspezifischer IL-10<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls IL-4<sup>+</sup> waren. Dies deutete darauf hin, dass die meisten IL-10<sup>+</sup> T-Zellen eher von T<sub>H</sub>2 als von regulatorischen T-Zellen stammten.
5. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den wespengiftspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellprofilen von Nicht-Allergikern und Wespengiftallergikern vor SIT festgestellt werden. So besaßen weder die Wespengiftallergiker mehr wespengiftspezifische IL-4<sup>+</sup>, IL-5<sup>+</sup> und IL-13<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen als die Nicht-Allergiker, noch besaßen die Nicht-Allergiker mehr wespengiftspezifische IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-10<sup>+</sup> T-Zellen als die Wespengiftallergiker. Das weist darauf hin, dass anhand des antigenspezifischen T-Zellprofils nicht auf Allergiker oder Nicht-Allergiker geschlossen werden kann.

6. Weder das Alter noch das Geschlecht oder der Schweregrad einer Wespenstichreaktion haben Einfluss auf das antigenspezifische T-Zellprofil. Jedoch konnte gezeigt werden, dass gleichzeitig an allergischer Rhinitis oder Asthma leidende Wespengiftallergiker höhere Frequenzen wespengiftspezifischer IL-4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen besaßen als Wespengiftallergiker, die an keinen weiteren atopischen Erkrankungen litten.
7. Die Verwendung des neuartigen ARTE-Protokolls ermöglicht die Untersuchung antigenspezifischer T-Zellen direkt und ex-vivo, wodurch Artefakte durch zeitaufwändige ex-vivo Methoden vermieden werden konnte.

## 12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

---

Ort, Abgabedatum

---

Unterschrift

## 13 Vorträge und Posterpräsentationen

DGAKI Junior Members Posterpreis 2018 auf dem 13. Deutschen Allergiekongress für das Poster mit dem Titel: „*Verlauf der antigenspezifischen T-Zellantwort während einer Wespengift-Immuntherapie*“

Poster Preises auf dem EACCI-Kongress 2018 für das Poster mit dem Titel: „*Profile of antigen specific T cells during initiation of wasp venom immunotherapy determined by direct ex-vivo antigen-reactive T cell enrichment*“

## 14 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Geburtsort: Duisburg  
Geburtstag: 10.05.1993  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Fischerstraße 2, 24103 Kiel  
Telefon: 0152 28656057  
E-Mail: samira.saleh93@gmx.de

–

### Schulische Ausbildung/Studium:

- 2016 – 2021** Promotion in der Dermatologie der Charité, Campus Mitte unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm mit dem Titel *„Bestimmung des antigenspezifischen T-Zellprofils im Verlauf einer Wespengift-Immuntherapie durch Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen direkt und ex-vivo“*
- 10/2012 – 12/2020** Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock  
1. Staatsexamen: Februar 2015, Note: 2,0  
2. Staatsexamen: Oktober 2019, Note: 2,0  
3. Staatsexamen: Dezember 2020, Note: 1,0  
Gesamtnote: 1,66
- 10/2010 – 04/2012** Forschungsarbeit im Rahmen einer „Besonderen Lernleistung“ zum Thema *„Forschung am Staphylococcus aureus Bakterium- Ein quali- und quantifizierter Nachweis des LEKTI3-Abbaus“* in der Arbeitsgruppe *„Molekulare Charakterisierung antimikrobieller Peptide und Proteine der menschlichen Haut“* unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Jens-M. Schröder am Dermatologiezentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
- 01/2009 – 06/2009** Mount Maunganui Collage, Neuseeland (Auslandaufenthalt)
- 2003 – 2012** Gymnasium Altenholz, Kiel

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,6

1999 – 2003                      Grundschule Dänischenhagen, Kiel

–

**Kongresse/ Engagement/ Auszeichnungen:**

**27.09. – 29.09.2018**    DGAKI Junior Members Posterpreis 2018 auf dem 13. Deutschen Allergiekongress für das Poster mit dem Titel: „*Verlauf der antigenspezifischen T-Zellantwort während einer Wespengift-Immuntherapie*“

**26.05. – 28.05.2018**    Poster Preis für das Poster mit dem Titel: „*Profile of antigen specific T cells during initiation of wasp venom immunotherapy determined by direct ex-vivo antigen-reactive T cell enrichment*“ auf dem EACCI-Kongress 2018

**07/2009 – 06/2010**    Mitglied der Schülervvertretung und 1. Schülervvertreterin in Schulkonferenzen

**06/2007 – 02/2012**    Ehrenamtliche Schulsanitäterin nach dreitägiger Ausbildung durch den Arbeiter-Samariter-Bund RV Kiel

–

**Praktika:**

**29.06. – 18.10.2020**    PJ-Tertial in der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses, Kiel

**09.03. – 28.06.2020**    PJ-Tertial in der Dermatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein

**18.11. – 08.03.2020**    PJ-Tertial in der Inneren Medizin der Imland Klinik, Eckernförde

**31.07. – 31.08.2017**    Famulatur in der allgemeinmedizinischen Praxis von Herrn Dr. med Christoph Schmidt, Berlin-Spandau

**20.02. – 20.03.2017**    Famulatur in der dermatologischen Tagesstation der Charité, Campus Mitte, Berlin

**05.10. – 30.10.2015** Famulatur in der Dermatologie des Concord General Repatriation Hospital in Sydney, Australien

**03.08. – 28.08.201** Famulatur in der Psychiatrie des Concord Repatriation Hospital in Sydney, Australien

–

#### **Nebenberufliche Tätigkeiten:**

**Seit 06/2017** Leitung des „Skillslab Rostock“: Vertragsaufsetzung für die Skillslab- Tutoren, Organisation der Gehälter, Organisation der Gehälter, Organisation der Skillslab-Kurse, Etablierung eines neuen EKG- Kurses, Zusammenarbeit mit Dozenten, Inventur

**08/2016 - 06/2017** Tutorin im „Skillslab Rostock“ für medizinische Hautnaht, Sonographie, Blutabnahme und Legen peripherer Venenkatheter

–

#### **Sprach und PC-Kenntnisse:**

Deutsch

Englisch (sehr gut in Wort und Schrift)

Word, Power Point, Excel

GraphPad Prism

## 15 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen meinen Dank aussprechen, ohne deren Mithilfe und Unterstützung die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

An erster Stelle möchte ich meinen besonderen Dank Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm aussprechen. Dafür, dass sie mir ermöglichte, an diesem höchst interessanten Thema zu forschen und für ihre immerwährende Unterstützung, die mir eine reibungslose Forschungsarbeit ermöglichte. Ich möchte mich bei ihr zudem für den stetig bereichernden und konstruktiven Austausch bedanken, der mir den kritischen Zugang zu der Thematik eröffnete und wesentlich zu der Entstehung dieser Arbeit beitrug. Ich empfand ihre Betreuung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit hinweg und darüber hinaus als ausgesprochen fürsorglich und motivierend.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Bacher aussprechen. Dafür, dass sie mich in die Methodik einführte und mir stets eine Ansprechpartnerin in methodischen und wissenschaftlichen Fragestellungen war.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.med. Guido Heine für die vielen anregenden wissenschaftlichen Gespräche bedanken, die mir eine weiterführende kritische Betrachtung der Thematik ermöglichten.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. rer. med. Sabine Dölle für ihre Unterstützung, sowie Herrn Dennis Ernst für die stete Hilfsbereitschaft in laboratorischen Fragestellungen und seine Einführung in sämtliche Laborarbeiten. Ebenso möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm, insbesondere bei Frau Dr. biol. hum. Kristin Franke für ihre Hilfsbereitschaft und anregenden Diskussionen bedanken.

Insbesondere möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich fortwährend in allen meinen Zielen unterstützen. Ebenso danke ich meiner Schwester, Alina, dafür, dass sie mir trotz der räumlichen Entfernung immer eine liebende Schwester und Gesprächspartnerin ist.

Einem besonderen Dank möchte ich noch an meinen Freund, Jannik Ifland, richten. Für seine liebevolle Unterstützung auf dem Weg meines Studiums und dieser Arbeit und für sein immerwährendes Verständnis, wenn das Studium oder diese Arbeit mal mehr Raum in Anspruch nahm, als wir es uns zeitweise wünschten.