

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Der Einfluss von IL-10 auf die allergeninduzierte IL-4- und IL-13-Freisetzung aus  
basophilen Granulozyten von Patienten mit Wespengiftallergie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johanna-Julia Walter

aus

München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Przybilla

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. David Vöhringer

Priv. Doz. Dr. med. René Chatelain

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Carolyn Krieg, geb. Bauer

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

12.11. 2009

Meiner geliebten Familie

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	7
1.1 Grundlagen der allergischen Reaktion .....	7
1.2 Allergische Reaktionen vom Soforttyp (Typ I).....	7
1.3 Basophile Granulozyten und ihre Bedeutung für die allergische Immunantwort.....	8
1.3.1 Bildung und Freisetzung von Mediatoren.....	8
1.3.2 Die Rolle der Zytokine IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten .....	9
1.4 Wespengiftanaphylaxie .....	10
1.4.1 Epidemiologie .....	10
1.4.2 Wespengift als Allergen .....	11
1.4.3 Klinisches Erscheinungsbild systemischer Stichreaktionen .....	12
1.5 Spezifische Immuntherapie.....	13
1.5.1 Therapieprinzip .....	13
1.5.2 Immunologische Wirkmechanismen.....	14
1.5.3 Spezifische Immuntherapie mit Insektengift.....	16
2 Fragestellung .....	19
3 Patienten, Material und Methode .....	20
3.1 Patienten .....	20
3.1.1 Hauttestungen.....	20
3.1.2 Spezifische IgE-Antikörper.....	21
3.1.3 Atopische Diathese.....	21
3.1.4 Mastzelltryptasekonzentration im Serum.....	21
3.1.5 Stichprovokation .....	22
3.2 Material .....	22
3.3 Reagentien.....	22
3.4 Geräte .....	24

3.5 Freisetzung von IL-4 und IL-13 durch basophile Granulozyten in Kurzzellkultur .....	25
3.5.1 Aufbereitung der basophilen Granulozyten .....	25
3.5.2 Zusammensetzung des Nährmediums .....	26
3.5.3 Zubereitung der Stimuli .....	26
3.5.4 Verdünnungsreihe des Wespengiftes und IL-10 .....	27
3.5.5 Freisetzung von IL-4 und IL-13 .....	27
3.5.6 Leerwert .....	28
3.5.7 Gewinnung und Lagerung der Zellsuspensionen .....	28
3.6 Bestimmung der Konzentrationen von IL-4 und IL-13 mittels ELISA .....	29
3.6.1 Grundprinzip des ELISA .....	29
3.6.2 IL-4-Bestimmung .....	29
3.6.3 IL-13-Bestimmung .....	31
3.7 Rechnerische, statistische und graphische Auswertung .....	32
3.7.1 Rechnerische Auswertung .....	32
3.8.2 Statistische Auswertung .....	33
3.8.2 Graphische Auswertung .....	34
4. Ergebnisse .....	35
4.1 Klinische und demographische Daten der Patienten .....	35
4.2 IL-4 Freisetzung aus basophilen Granulozyten .....	36
4.2.1 Stimulation der IL-4-Sekretion durch Wespengift .....	36
4.2.2 Inhibition der Freisetzung von IL-4 durch IL-10 .....	38
4.2.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von klinischen Charakteristika .....	40
4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-4 Untersuchung .....	44
4.3 IL-13-Freisetzung aus basophilen Granulozyten .....	45
4.3.1 Stimulation von IL-13 durch Wespengift .....	45
4.3.2 Inhibition der Freisetzung von IL-13 durch IL-10 .....	47

4.3.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von klinischen Charakteristika.....	50
4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-13 Untersuchung.....	54
4.4 Einzelfalldarstellung.....	54
5 Diskussion .....	59
5.1 Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus T-Zellen während der spezifischen Immuntherapie.....	59
5.2 Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten während der spezifischen Immuntherapie.....	60
5.3 Der Einfluss von IL-10 auf die Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten .....	61
5.4 Ausblick .....	63
6 Zusammenfassung.....	65
7 Literaturverzeichnis.....	67
8 Abkürzungsverzeichnis .....	77
9 Danksagung.....	79
10 Lebenslauf.....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der allergischen Reaktion

Allergische Erkrankungen sind seit Jahrhunderten bekannt. Der Begriff „Allergie“ wurde erstmals 1906 durch den Wiener Pädiater Clemens von Pirquet als eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus definiert. Heute wird unter „Allergie“ eine „spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit verstanden“ (78).

Nach *Coombs und Gell* werden allergische Reaktionen in vier Typen unterschieden. Hierzu gehören (78):

Typ I: Allergische Reaktionen vom Soforttyp (meist Immunglobulin (Ig) E-vermittelt)

Typ II: Zytotoxische allergische Reaktionen (IgG- und IgM-vermittelt)

Typ III: Allergische Immunkomplex-Reaktionen (IgG- oder IgM-vermittelt)

Typ IV: Allergien vom Spättyp (T-zellulär-vermittelt)

Da die Insektengiftanaphylaxie eine typische IgE-vermittelte Typ-I-Reaktion ist, wird auf die Beschreibung der anderen Reaktionstypen im Folgenden verzichtet.

## 1.2 Allergische Reaktionen vom Soforttyp (Typ I)

Nach den heutigen Vorstellungen werden, je nach dem Sekretionsmuster ihrer Zytokine, T-Helferzellen (TH) in Typ-1 und Typ-2 unterschieden. Die erste Subpopulation stellen die TH1-Zellen dar. Diese sind an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt, die typischerweise Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Interleukin (IL) 2 und Tumornekrosefaktor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) sezernieren. IL-12 gilt als wichtigstes Zytokin für die Aktivierung einer TH1-Antwort, die durch intrazelluläre bakterielle, virale oder parasitäre Infektionen stimuliert wird und die Bildung von INF- $\gamma$  induziert (32). Die zweite Subpopulation, die TH2-Zellen, ist für die allergische Immunantwort von Bedeutung. Werden naive T-Zellen von antigen-präsentierenden Zellen aktiviert, differenzieren sie unter dem Einfluss von IL-4 zu TH2-Zellen (7, 80). Diese Effektor-TH2-Zellen exprimieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13.

Mit Hilfe von IL-5 vermitteln sie die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und durch die Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-13 veranlassen sie die B-Zellen über einen Isotyp-Switch, IgG4- und IgE-Antikörper zu produzieren (80). Die TH1- und TH2-Antwort sind in der Lage sich gegenseitig zu regulieren. So wird die IgE-Produktion durch die TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 induziert und gefördert, während sie durch  $\text{INF-}\gamma$  inhibiert wird (50, 64).

Bei der IgE-vermittelten Allergie vom Soforttyp werden nach dem Erstkontakt mit dem Allergen spezifische IgE-Antikörper gebildet. Diese binden mit ihrem Fc-Fragment an die hochaffinen  $\text{Fc}\epsilon$ -Rezeptoren von basophilen Granulozyten im Blut oder an Mastzellen im Gewebe. Bei erneuter Allergenexposition werden auf der Oberfläche dieser Zellen mindestens zwei IgE-Antikörper durch Brückenbildung quervernetzt (78, 34). Die dadurch ausgelöste Degranulation der Mastzellen oder basophilen Granulozyten führt zur Ausschüttung potenter Mediatoren wie Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen, die das Krankheitsbild der Soforttypallergie bedingen. Die Freisetzung dieser inflammatorischen Botenstoffe bewirkt das Auftreten von Rötungen, Juckreiz, Ödemen und die Kontraktion glatter Muskelfasern. Zu den klassischen Beispielen der allergischen Sofortreaktion zählen Anaphylaxie, Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale und Urtikaria (78).

## **1.3 Basophile Granulozyten und ihre Bedeutung für die allergische Immunantwort**

### **1.3.1 Bildung und Freisetzung von Mediatoren**

Seit etwa 40 Jahren ist bekannt, dass basophile Granulozyten eine bedeutende Rolle bei der allergischen Reaktion spielen (47). Basophile Granulozyten zirkulieren im Gegensatz zu den gewebsständigen Mastzellen in der Blutbahn, wo sie weniger als 1% aller Leukozyten ausmachen. Bei Rekrutierung wandern sie aber in entzündetes Areal ein, wie mehrere Studien zeigten. So waren Basophile in der Spätphase allergischer Reaktionen in großer Zahl in Nase (9, 32), Lunge (29) und Haut (16) vertreten. Zahlreiche Studien belegen, dass die Ausprägung der Symptome bei einer Überempfindlichkeitsreaktion mit der Anzahl der im Blut zirkulierenden Basophilen und der damit verbundenen Freisetzung von Mediatoren korreliert (87). Bei Allergenkontakt werden IgE-Antikörper brückenartig durch das Allergen verbunden und führen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus basophilen Granulozyten und

Mastzellen. Einerseits liegen diese wie das Histamin, dessen Wirkmechanismus auf der Kontraktion glatter Muskelfasern sowie der Dilatation und Permeabilisation von Gefäßen beruht (91), in gespeicherter Form in den zytoplasmatischen Granula vor. Auf der anderen Seite werden bei der allergischen Reaktion auch inflammatorische Mediatoren, wie Leukotriene, Prostaglandine und der plättchenaktivierender Faktor freigesetzt, die erst zu Beginn der anaphylaktischen Reaktion neu synthetisiert werden (91). Weiterhin konnten die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass basophile Granulozyten die wichtigsten Produzenten der Zytokine IL-4 und IL-13 bei der allergischen Immunantwort sind (15, 27, 46, 51, 65, 86).

Das Zytokin IL-3, ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, besitzt einen positiven Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Zytokinsekretion basophiler Granulozyten (25, 44, 91). Es stellt somit den wichtigsten Stimulus für diese Zellen dar (19). So konnte gezeigt werden, dass IL-3 die Überlebenszeit der Basophilen verlängert (52) und bei nicht-IgE-vermittelter Stimulation IL-3 vornehmlich die Expression von IL-13 induziert (65, 76).

Weiterhin synthetisieren Basophile das für die Differenzierung eosinophiler Granulozyten notwendige IL-5 (32). Inwiefern basophile Granulozyten auf die molekularen Vorgänge der spezifischen Immuntherapie Einfluss nehmen, konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden.

### **1.3.2 Die Rolle der Zytokine IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten**

Sowohl IL-4 als auch IL-13 spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung allergischer Reaktionen. Diese beiden Mediatoren sind die bisher einzigen bekannten Zytokine, die fähig sind, den Isotyp-Switch von IgM-Antikörpern zu IgE und IgG4 auszulösen (22, 23, 73, 74).

IL-4 wird nicht nur in TH2-Zellen, sondern auch in basophilen Granulozyten in großen Mengen synthetisiert. Die Gegenwart von IL-4 fördert in naiven T-Zellen, den so genannten TH0-Zellen, die Differenzierung zu T-Helferzellen vom Typ 2 (1, 94). Dies stellt einen wichtigen Schritt in der allergischen Immunantwort dar. Das kodierende Gen für IL-13 liegt in unmittelbarer Nähe des Genlokus für IL-4, sodass diese beiden Zytokine wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind (32). Ähnlich wie IL-4 wird IL-13 in basophilen Granulozyten, in CD4<sup>+</sup>-Zellen (vornehmlich in TH1-Zellen) und CD8<sup>+</sup>-Zellen gebildet (55).

Über die Hemmung der IL-12- und INF- $\gamma$ -Synthese beeinflusst IL-13 die Polarisierung der Zellen zur allergischen TH2-Antwort (24). Mehrere Studien belegen, dass basophile Granulozyten nach Antigenstimulation bereits sehr früh beginnen, ihre Zytokine freizusetzen. So lässt sich IL-4 schon nach 5 bis 10 Minuten in kleinsten Mengen nachweisen, während es innerhalb von 4 Stunden nach immunologischer Aktivierung seine maximale Quantität erreicht (51, 86, 88, 89). Im Gegensatz zu der schnellen und steil ansteigenden IL-4-Freisetzung nimmt die IL-13-Konzentration erst langsam nach mehreren Stunden messbar zu und erlangt ihren Höhepunkt nach 20 Stunden (46, 76). Die Suppression der TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 ist für den Erfolg einer spezifischen Immuntherapie ausschlaggebend. So konnte bei Bienengiftallergikern, die eine Hyposensibilisierung erhielten, nach 60 Tagen Therapie in den peripheren Blutzellen dieser Patienten eine Unterdrückung der spezifischen T-Zell-Proliferation festgestellt werden. Gleichzeitig wurde eine verminderte Sekretion der TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie der TH1-Zytokine IL-2 und INF- $\gamma$  beobachtet (5). Kürzlich konnte nun gezeigt werden, dass während der Frühphase der Immuntherapie nicht nur TH2-Zellen weniger IL-4 und IL-13 produzieren, sondern dass auch in basophilen Granulozyten die Produktion von IL-4 und IL-13 unterdrückt wird (68).

## **1.4 Wespengiftanaphylaxie**

### **1.4.1 Epidemiologie**

Systemische allergische Überempfindlichkeitsreaktionen als Folge eines Insektenstiches, hierbei vor allem nach Bienen- oder Wespenstichen, treten bei 0,8–5% der deutschen Bevölkerung auf (58, 72). Bis zu 19% der Bevölkerung Europas und der USA reagieren auf einen Insektenstich mit gesteigerten örtlichen Reaktionen (14, 60). Laut dem Bundesamt für Statistik versterben in Deutschland jährlich etwa 20 Menschen aufgrund einer Hymenopterenengiftüberempfindlichkeit (97), wobei mit einer erheblich höheren Dunkelziffer gerechnet werden muss. Bei plötzlichen unklaren Todesfällen, die sich in den Sommermonaten ereigneten, wurden post mortem im Serum der Verstorbenen häufig Hymenopterenengift-spezifische IgE-Antikörper gefunden (95).

### 1.4.2 Wespengift als Allergen

Die meisten Anaphylaxien auf einen Insektenstich werden in Mitteleuropa durch das Gift der Honigbiene (*Apis mellifera*) oder bestimmter Faltenwespen (*Vespula germanica*, *Vespula vulgaris*) hervorgerufen (70, 71, 102). Sehr selten lassen sich hier andere Hymenopteren wie Hummeln (*Bombus spp.*), Wespen der Gattung *Dolichovespula*, Hornissen (*Vespa crabro*), Feldwespen (*Polistes*), Ameisen (*Formicidae*) oder Mücken (*Diptera*) als Auslöser systemischer Stichreaktionen finden (78).

Die toxische Wirkung des Wespengifts löst an der Stichstelle meist eine schmerzhaft, brennende und juckende Lokalreaktion mit umschriebener Rötung und Schwellung aus. Normalerweise beträgt bei dieser örtlichen Reaktion der Durchmesser des Erythems und der Schwellung weniger als zehn Zentimeter und ist innerhalb von 24 Stunden deutlich rückläufig.

Kommt es zu einer außerordentlich hohen Anzahl von Stichen kann auch beim nicht sensibilisierten Mensch durch das Insektengift eine systemische toxische Reaktion induziert werden, die potentiell tödlich sein kann (70, 78).

Durch den Stich einer Wespe werden ungefähr 3–10 µg Gift abgegeben (70). Im Wespengift der gemeinen Wespe (*Vespula vulgaris*) wurden als Hauptallergene Phospholipase A1 (Ves v 1), Hyaluronidase (Ves v 2) und das Antigen 5 (Ves v 5) identifiziert (43). Die Zusammensetzung des Wespengifts ist der folgenden Tabelle 1 zu entnehmen. Da die Gifte verschiedener Gattungen der Familie Vespidae ähnliche Inhaltsstoffe aufweisen, kann es zu Kreuzreaktionen kommen, wie beispielsweise bei Wespen- und Hornissengift. Obwohl manche Patienten „kruzreagierende“ Antikörper mit Bienen- und Wespengift im Serum aufweisen, sind die Bestandteile dieser beiden Gifte unterschiedlich (70).

Tabelle 1: Inhaltsstoffe von Vespidengift (78)

Inhaltsstoffe		Molekulargewicht (kDa)	Prozentualer Anteil
Proteine	Antigen 5	25000	15%
	Phospholipase	~35000	10%
	Hyaluronidase	45000	2%
	Proteasen	?	?
Peptide	Kinine	~2000	?
Mediatoren	Histamin	111	4%
	Serotonin	176	~1%
	Leukotriene B4 und C4	336	~0,001%
	Dopamin	153	~5%
	Acetylcholin	146	5%

### 1.4.3 Klinisches Erscheinungsbild systemischer Stichreaktionen

Die klinischen Symptome einer anaphylaktischen Reaktion auf einen Insektenstich reichen von ausschließlichen disseminierten Hauterscheinungen wie Juckreiz, Urtikaria, Flush oder Angioödem, über respiratorische, kardiovaskuläre oder gastrointestinale Beschwerden bis hin zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock mit Bewusstlosigkeit und Herz-Kreislaufstillstand. Dabei kann ein einziger Stich bei einem Sensibilisierten zu einer tödlichen anaphylaktischen Reaktion führen (71). Sehr selten können auch ungewöhnliche Stichreaktionen wie Serunkrankheit, Vaskulitis, Neuropathie, thrombozytopenische Purpura und Dermatitis auftreten (70).

Klassischerweise treten die Beschwerden innerhalb weniger Minuten ein, erreichen nach 15 bis 30 Minuten ihren Höhepunkt und legen sich wieder innerhalb eines Zeitraumes von 1 bis zu 3 Stunden. Eine Ursache für die Verstärkung anaphylaktischer Symptome kann die

vorausgegangene Einnahme von Medikamenten wie Betablocker oder ACE- Hemmer darstellen (31, 35, 41, 66, 98).

Für die Einteilung anaphylaktischer Reaktionen bestehen unterschiedliche Klassifikationen. In dieser Arbeit wird für die Bewertung des Schweregrads die Skalierung nach *Ring und Meßmer* (78) verwendet.

Tabelle 2: Schweregradskala zur Klassifizierung anaphylaktischer/ anaphylaktoider Reaktionen

<b>Grad</b>	<b>Haut</b>	<b>Abdomen</b>	<b>Respirationstrakt</b>	<b>Herz-Kreislauf</b>
I	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem	-	-	-
II	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem (nicht obligat)	Nausea Krämpfe	Rhinorrhoe Heiserkeit Dyspnoe	Tachykardie (Differenz>20/min.) Hypotension (Differenz>20/mmHg systolisch) Arrhythmie
III	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem (nicht obligat)	Erbrechen Defäkation	Larynxödem Bronchospasmus Zyanose	Schock
IV	Juckreiz Flush Urtikaria Angioödem (nicht obligat)	Erbrechen Defäkation	Atemstillstand	Kreislaufstillstand

## 1.5 Spezifische Immuntherapie

### 1.5.1 Therapieprinzip

Die spezifische Immuntherapie (SIT) stellt die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit IgE-vermittelter allergischer Reaktionen dar. Die Therapie wurde vor fast 100 Jahren von *Noon* und *Freeman* zur Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis eingeführt (78). Das

Prinzip der SIT ist seit dieser Zeit weitgehend unverändert und beruht in der subkutanen Applikation allergener Substanzen in aufsteigender Dosierung (78). Durch zahlreiche immunologische Veränderungen wird eine über die Therapiedauer hinaus anhaltende Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen erreicht. (8).

## **1.5.2 Immunologische Wirkmechanismen**

### **1.5.2.1 T-regulatorische Zellen**

Neben den bisher bekannten TH1- und TH2-Zellen wurde eine neue Subpopulation der T-Zellen beschrieben, die immunsuppressive Funktion sowie ein abweichendes Zytokinprofil bezüglich TH1- und TH2-Zellen besitzen (17). Diese regulatorischen T-Zellen (Treg), die früher auch Suppressor-T-Zellen genannt wurden, werden in  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen, die Typ-I-Treg (Tr1)-Zellen, Th3-Zellen sowie weitere Populationen wie die natürlichen Killer-(NK)-T-Zellen und  $CD8^+$ -T-Zellen (6, 32) unterteilt. Die Treg-Zellen sind in der Lage die allergische TH2-Antwort zu inhibieren (6), große Mengen an IL-10 und TGF- $\beta$  zu produzieren (45) sowie direkt die Proliferation und Zytokin-Expression von TH1- und TH2-Zellen zu supprimieren (20). Ihre gezielte Induktion mit Produktion der Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  führt zu einer peripheren T-Zell-Toleranz. Die Verschiebung von der TH2-Antwort zu einer Treg-dominierenden Immunantwort spielt somit eine Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung einer ausgewogenen Immunantwort während der allergenspezifischen Immuntherapie (2, 3, 11, 39).

### **1.5.2.2 Die Wirkung von IL-10 auf T-Zellen**

Obwohl die SIT mit Wespengift schon seit vielen Jahren zur Behandlung der Insektengiftallergie genutzt wird, ist es bisher nicht gelungen, ihre Wirkmechanismen, die zum Schutz bei erneuten Stichen führen, vollständig zu klären. Ziel der Hyposensibilisierung ist es, langfristige Toleranz dank des Wiedererlangens der normalen Immunität gegen Allergene zu ermöglichen (56).

Folgende Ereignisse werden als immunologische Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie diskutiert:

- Aktivierung regulatorischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die IL-10 und TGF- $\beta$  produzieren und Toleranz vermitteln (3, 10, 39),
- Induktion von Anergie, einer verminderten Reaktionsbereitschaft mit abnehmender Zytokin-Produktion und Proliferation nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor (26, 39, 53)
- die Bildung IgE-modulierender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (79),
- eine Zunahme von allergenblockierenden IgG-Antikörpern, hierbei hauptsächlich der Klasse IgG4 (100),
- gegebenenfalls langsame Reduktion der allergenspezifischen IgE-Produktion (12, 28,)
- ein Wechsel von der allergischen TH2-Antwort zum TH1-Profil (36),
- Funktionshemmung von Effektorzellen, wie Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen (67)
- eine verminderte Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren (21).

Man weiß, dass während der Hyposensibilisierung durch kontinuierliche Behandlung mit hohen Allergenkonzentrationen die Proliferation peripherer T-Zellen und die T-Zell-Zytokin-Antwort unterdrückt werden, während gleichzeitig die Produktion des immunsuppressiven IL-10 in spezifischen T-Zellen ansteigt und somit immunologische Toleranz in den T-Zellen erreicht wird (3, 39). Hierbei werden proliferative und Zytokin-Antworten in TH1- und TH2-Zellen inhibiert, während zugleich IL-10 vermehrt gebildet wird. Welche bedeutende Rolle IL-10 für die SIT und deren Erfolg spielt, konnte in anergen T-Zellen gezeigt werden, die durch Neutralisation von endogenem IL-10 wieder reaktiviert wurden (5). Während IL-10 auf der einen Seite also Anergie in T-Zellen im Rahmen der SIT induziert, wird zusätzlich die Produktion von Allergen-spezifischen- IgE-Antikörpern supprimiert, bei gleichzeitigem Anstieg der Synthese von IgG4-Antikörpern (3). Deshalb ist IL-10 nicht nur in die Entwicklung der T-Zell-Toleranz involviert, sondern kann auch die Bildung spezifischer Antikörperisotypen regulieren und die spezifische IgE-Antwort gegen einen dominanten

IgG4-Phänotypen lenken (56). Synthetisiert wird IL-10 in T-regulatorischen Zellen, hierunter vor allem in Tr1-Zellen und aktivierten  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen, sowie in Monozyten und B-Zellen (3).

### **1.5.2.3 Die Wirkung von IL-10 auf basophile Granulozyten**

Es konnte bisher noch nicht im Detail geklärt werden, inwiefern IL-10 das Verhalten von basophilen Granulozyten bei der spezifischen Immuntherapie beeinflusst. Man weiß, dass die meisten Patienten, die sich einer Hyposensibilisierung unterziehen, schon sehr früh gegen weitere Insektenstiche geschützt sind. Die Frage, warum Hymenopterenengift-allergische Patienten bereits nach einer einwöchigen Schnell-Therapie mit Insektengift geschützt sind, bleibt offen. Möglicherweise könnte für diesen frühzeitigen Schutz die verringerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Histamin und Sulfidoleukotrienen aus basophilen Granulozyten eine Rolle spielen (67).

Man beobachtete während der SIT eine Zunahme des T-Zell-Zytokins IL-10 und gleichzeitig eine geringere Freisetzung von Histamin und Leukotrienen aus Basophilen. Zusätzlich fiel eine verminderte Anzahl der Basophilen im peripheren Blut auf, die sich vermutlich durch einen Mangel an TH2-Zytokinen erklären lässt, die für Priming, Überleben und Aktivität dieser Effektorzellen benötigt werden (56). Durch Entfernung von T-Zellen und Neutralisierung von IL-10 konnte der supprimierende Effekt auf das Proliferations- und Freisetzungsverhalten Basophiler jedoch wieder aufgehoben werden (67). Es ist also zu vermuten, dass basophile Granulozyten auf das T-Zell-Zytokin IL-10 während der Frühphase der spezifischen Immuntherapie reagieren.

### **1.5.3 Spezifische Immuntherapie mit Insektengift**

Eine hochwirksame Behandlungsmöglichkeit, um Insektengiftallergiker vor erneuten lebensgefährlichen anaphylaktischen Reaktionen zu schützen, stellt die SIT dar (13, 48, 60). In zahlreichen Studien wurde die Wirksamkeit der Hyposensibilisierung nach einem Stichereignis beobachtet. Obwohl die Ergebnisse teilweise deutlich voneinander abweichen (18, 57, 59, 63, 69), belegt die Mehrzahl der Studien, dass bei nur 2,4% (18) bis 20,4% (69) der Patienten die SIT mit der Standarddosis versagt. Besonders die Effektivität der

Immuntherapie mit Wespengift ist außerordentlich hoch und gewährleistet nach Steigerung der Erhaltungsdosis eine Schutzwirkung von nahe 100%. Grundsätzlich ist die Indikation zur Immuntherapie bei jeder systemischen IgE-vermittelten Soforttypreaktion aufgrund eines Insektenstiches zu stellen (70). Die Ausnahme scheinen Kinder zu bilden. In einer Studie mit Patienten im Alter von zwei bis 16 Jahren, die nach einem Insektenstich lediglich leichte allergische Reaktionen mit ausschließlicher Hautmanifestation gezeigt hatten, kam es auch ohne Hyposensibilisierung nach erneuten Insektenstichen zu keinen schwereren Überempfindlichkeitsreaktionen (99).

Prinzipiell lassen sich zwei Verfahren der SIT unterscheiden. Bei der stationären Schnellhyposensibilisierung (Ultrarush, Rush) mit wässriger Allergenlösung wird die Erhaltungsdosis von 100 µg Insektengift innerhalb weniger Tage erreicht. Danach wird ambulant zunächst wöchentlich bis schließlich im Abstand von 4 Wochen weiterhin die Giftdosis von 100 µg injiziert. Die ambulant durchgeführte konventionelle Hyposensibilisierung benötigt bis zum Erreichen der Erhaltungsdosis einige Monate. Da die Schnellhyposensibilisierung innerhalb kurzer Zeit zu einem wirksamen Schutz führt, ist sie besonders während der Flugzeit der Insekten von Bedeutung (70, 59).

Die häufigsten Nebenwirkungen der SIT sind Lokalreaktionen wie Rötung und Schwellung an der Injektionsstelle und Müdigkeit. In der Steigerungsphase zeigen bis zu 40% der Patienten systemische anaphylaktische Reaktionen, die aber meistens mild und gut therapierbar verlaufen (70). Solche systemischen Komplikationen im Laufe der Dosissteigerung treten häufiger bei Bienen- als bei Wespengift auf (14, 84, 93).

Um den Erfolg der Behandlung zu beurteilen, sollten sich die Patienten einem standardisierten Stichprovokationstest mit einem lebenden Insekt in Notfallbereitschaft unterziehen (81). Bei weiterhin systemischer Reaktion wird die Erhaltungsdosis auf 200 µg oder höher gesteigert, um dann fast immer vollkommenen Schutz zu erreichen (70). Nach den derzeitigen Therapieempfehlungen kann die Immuntherapie nach frühestens 3–5 Jahren beendet werden, wenn keine systemischen Nebenwirkungen aufgetreten sind und ein erneuter Feldstich oder die Stichprovokation komplikationslos vertragen wurden (71, 60). Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, wird die Hyposensibilisierung fortgeführt, bis Hauttestreaktionen und spezifisches Serum-IgE gegenüber dem krankheitsursächlichen Gift nicht mehr nachweisbar sind (60). Da aber „negative“ Befunde keinen Therapieerfolg attestieren, muss vor Absetzen der Hyposensibilisierung die individuelle Situation des Patienten geprüft

werden. So kann eine lebenslange Therapie bei Patienten mit Mastozytose oder erhöhtem basalen Serum-Tryptase-Spiegel nach dem heutigen Stand der Forschung indiziert sein (71).

## **2 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es, die allergeninduzierte Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten wespengiftallergischer Patienten vor Beginn einer Immuntherapie zu charakterisieren. Besonderes Interesse galt der Frage nach einem eventuell hemmenden Einfluss des T-Zell-Zytokins IL-10 auf die Ausschüttung von IL-4 und IL-13.

## 3 Patienten, Material und Methode

### 3.1 Patienten

Die Patienten, die für die Studie ausgewählt wurden, hatten sich aufgrund einer Anaphylaxie auf einen Insektenstich in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München vorgestellt.

In die Studie wurden insgesamt 20 Probanden im Alter zwischen 27 und 68 Jahren eingeschlossen. Voraussetzung für die Aufnahme in die Untersuchungsreihe war eine anaphylaktische Reaktion auf einen Wespenstich und keine bisher begonnene Hyposensibilisierung gegen Insektengift. Die Einteilung des Schweregrades der Stichreaktion erfolgte gemäß der Klassifikation nach *Ring und Messmer* (70) (siehe Tabelle 2). Die Patienten zeigten anaphylaktische Reaktionen von Grad I–III.

Für die Untersuchung von IL-4 wurden aus dem Kollektiv 15 Patienten und für die von IL-13 20 Patienten herangezogen. Die Verteilung der Probanden ist in 4.1.3 in Tabelle 5 dargestellt.

Vor Einleitung der stationären Hyposensibilisierung wurde nach schriftlich dokumentierter Einwilligung der Teilnehmern der Studie einmalig Blut für die geplante Untersuchung entnommen.

#### 3.1.1 Hauttestungen

Die allergologische Diagnostik umfasste Hautpricktests mit Insektengift in ansteigender Dosierung (0,1–100 µg/ml) als Schwellentest. Hierfür wurde ein Tropfen Wespengift (ALK-lyophilisiert SQ, ALK-SCHERAX, Arzneimittel, Hamburg) in einer Anfangskonzentration von 0,1 µg/ml auf die Volarseite des Unterarms aufgetragen und die Haut an dieser Stelle im schrägen Winkel mit einer Pricklanzette kurz angestochen. Zeigte sich nach 15 bis 20 Minuten keine Hautreaktion, wurde die Konzentration um jeweils eine Zehnerpotenz bis zu einer Maximaldosis von 100,0 µg/ml gesteigert. Trat eine positive Reaktion auf, wurde der Test bei diesem Schwellenwert beendet. Physiologische Kochsalzlösung (0,9%) bzw. Histamindihydrochlorid (0,1%) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Quaddeln unter 3 mm und Erytheme unter 5 mm Durchmesser wurden als negativ bewertet.

Weiterhin wurden Hautpricktestungen mit Katzenepithelen-, Hausstaubmilben- (*Dermatophagoides pteronyssinus*), Gräserpollen- und Naturgummilatexallergenen (ALK-SCHERAX, Arzneimittel, Hamburg) analog vorgenommen.

### 3.1.2 Spezifische IgE-Antikörper

Die Konzentration der spezifischen IgE-Antikörper gegen Bienen-bzw. Wespengift wurden mittels CAP-FEIA (Fluorescence-Enzyme-Immuno-Assay) nach Anleitung des Herstellers (Phadia, Freiburg) bestimmt. Die Einteilung der spezifischen IgE-Antikörper in CAP-Klassen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Einteilung in CAP-Klassen

CAP-Klasse	Spezifische IgE-Antikörper [kU/l]	Beurteilung des Nachweises der allergenspez. IgE-Antikörper
0	0-0,34	Nicht nachweisbar
1	0,35-0,69	Niedrig
2	0,7-3,49	Mittel
3	3,5-17,4	Hoch
4	17,5-49	Sehr hoch
5	50-99	Sehr hoch
6	>100	Sehr hoch

### 3.1.3 Atopische Diathese

Rhinitis allergica, Asthma bronchiale oder atopisches Ekzem in der Anamnese galten als Atopie-Kriterien.

### 3.1.4 Mastzelltryptasekonzentration im Serum

Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung der basalen Konzentration der Mastzelltryptase im Serum. Bei keinem der Patienten lag eine erhöhte Serumtryptasekonzentration über der 95. Perzentile ( $> 11,4 \mu\text{g/ml}$ ) vor, die als signifikanter Risikofaktor für das Auftreten von schweren anaphylaktischen Reaktionen gilt (83, 30, 49, 72).

### 3.1.5 Stichprovokation

Retrospektiv wurden die allergischen Reaktionen, die bei der Stichprovokation auftraten, mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. Die Provokation erfolgte frühestens sechs Monate nach Einleitung der Schnellhyposensibilisierung. Unter Notfallbereitschaft wurde der Patient von einer Wespe in den Oberarm gestochen.

### 3.2 Material

- 20 ml Spritzen (Braun, Melsungen)
- Multifly 21 G (Sarstedt, Nümbrecht)
- Pipetten: eppendorf Research (variabel) 200 $\mu$ l, 500, 1000 $\mu$ l (Eppendorf, Hamburg)
  - Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen: Combitips plus 2,5 ml / 5 ml (Eppendorf, Hamburg)
  - epT.I.P.S. 2-200  $\mu$ l, 50-1000  $\mu$ l, 2-500  $\mu$ l (eppendorf Totally Integrated Pipetting System, Eppendorf, Hamburg)
- Falcon-Röhrchen 50 ml (Greiner, Nürtingen)
- Standard Reaktionsgefäß 3810 (Eppendorf, Hamburg)
- Analysenröhrchen Polystyrol, Nr. 12-55 (Greiner, Nürtingen)
- Parafilm M, Breite 10cm (Brand & Co, Wertheim)
- 96-well Mikrotiterplatten (Nunc, Langenselbold)

### 3.3 Reagentien

- Heparin (Liquemin N 25000, Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Macrodex 6% (Pharma Reusch Bonn)
- Destilliertes, chemisch reines Wasser (Aqua dest., Apotheke der Universität München)
- 0,3% Humanes Serum Albumin-Lösung (HSA):

0,1 g HSA (Sigma, St. Louis, USA)

mit 33,34 ml Aqua dest.

- Pipes-Puffer (250mM Pipes, 1,1 M NaCl, 50 mM KCl):

(alle folgenden Substanzen von Merck, Darmstadt)

64,3 g NaCl

3,85 g KCl

83,83 g Pipes

ad ca. 950 ml Aqua dest., pH auf 7,4 eingestellt mit 10 N Na OH

ad 1000 ml Aqua dest.

- Pipes-Albumin-Glucose-Puffer (PAG-Puffer):

100 ml Pipes-Puffer (s.o.)

1 g Dextrose (Sigma, St. Louis, USA)

ad ca. 1000 ml Aqua dest.

10 ml 0,3 % HSA-Lsg. (s.o.)

ad ca. 1000 ml Aqua dest., pH 7,4

- PAG/EDTA-Puffer:

100 ml Pipes-Puffer (s.o.)

40 ml 100 mM EDTA(Sigma, St. Louis, USA)

1 g Dextrose (s.o.)

ad ca. 900 ml Aqua dest.

10 ml 0,3% HSA-Lsg. (s.o.)

ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4

- Tris-Puffer (Merck, Darmstadt)

- Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM (Sigma, St. Louis, USA)
- Nährmedium:
  - 62,5 µl Gentamycin (5 µg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
  - 25 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum 5% (Sigma, St. Louis, USA)
  - 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 1% (Biochrom, Berlin)
  - ad 470 ml IMDM
- Reless® Wespengift (Lyophilisat, ALK-SCHERAX, Arzneimittel, Hamburg)
- IL-3 (Sigma, St. Louis, USA)
- IL-10 (Chemicon International, Temecula, USA)
- IL-4-ELISA-KIT (Diacclone Research, Besançon Cedex, Frankreich)
- IL-13-ELISA-KIT (Diacclone Research, Besançon Cedex, Frankreich)

### 3.4 Geräte

- Zentrifuge: Multifuge 3 S-R (Kendro Laboratory Products, Langenselbold)
- Vortex-Schüttler: Genie (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
- Schüttelapparat für Platten: Titramax 101 (Heidolph Instruments, Schwabach)
- Brutschrank: NAPCO water-jacketed CO<sub>2</sub> Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- ELISA-Reader (Mikrotek Laborsysteme, Overath)

## **3.5 Freisetzung von IL-4 und IL-13 durch basophile Granulozyten in Kurzzeitzellkultur**

### **3.5.1 Aufbereitung der basophilen Granulozyten**

#### **3.5.1.1 Blutentnahme und Sedimentation**

Den Probanden wurden jeweils 20 ml Blut aus der Vena cubitalis mit einer 20 ml Spritze entnommen. Der Konus war vorher mit ca. 1 ml Heparin gefüllt worden, um eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden.

Das heparinisierte Blut wurde in der Spritze belassen, diese entlüftet und für die Sedimentation mit einem Butterfly mit ca. 4–5 ml Macrodex 6% bis zum Kolbenanschlag aufgezogen. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für etwa 90 Minuten in der Spritze aufgestellt. In dieser Zeit sedimentierten die Erythrozyten. Der gelbtrübe seröse Überstand (ca. 10 ml) enthielt die Leukozyten. Dieser wurde über den Butterfly in ein spitzkonisches 50 ml-Röhrchen (Falcon) vorsichtig abgespritzt. Der in der Spritze verbliebene Hauptanteil der Erythrozyten wurde verworfen.

#### **3.5.1.2 Waschen der Zellen**

Das Röhrchen mit dem Leukozytenüberstand wurde verschlossen bei 1200 Umdrehungen/Minute (U/min) für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der serumhaltige Überstand verworfen, die am Boden abgesetzten Zellen wurden durch sehr vorsichtiges Schwenken gelöst.

Nun wurde die Zellsuspension mit 2–3 ml des auf 4 °C temperierten PAG-EDTA Puffer langsam resuspendiert. Nachdem sich alle Zellklümpchen aufgelöst hatten, wurde das Röhrchen bis zur 50-ml-Markierung mit dem Puffer aufgefüllt und der Inhalt vorsichtig vermischt. Anschließend wurde das Röhrchen erneut bei 1200 U/min für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen mit 4 °C gekühltem PAG-Puffer vorsichtig in Suspension gebracht und abschließend bei 1200 U/min für 10 Minuten zentrifugiert.

Nach dem letzten Abgießen des serösen Überstandes wurden die Zellen in 2,5 ml Nährmedium aufgenommen und sehr behutsam miteinander vermengt, um eine Lysierung zu vermeiden.

### **3.5.2 Zusammensetzung des Nährmediums**

Um optimale Kulturbedingungen für die basophilen Granulozyten zu schaffen, wurden dem IMDM-Medium Gentamycin (5 µg/ml), hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (5%) und nicht-essentielle Aminosäuren (1%) zugesetzt. Das zubereitete Medium wurde in Portionen zu 15 ml bzw. 30 ml im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

Vor Gebrauch wurde das Nährmedium bei Raumtemperatur aufgetaut. Als Stimulus wurde IL-3 (60 ng/ml) zugegeben. Die Portionen mit 15 ml Nährmedium erhielten 250 µl IL-3, die Portionen mit 30 ml Nährmedium 500 µl IL-3. Dies entsprach einer Endkonzentration von 1 ng/ml.

### **3.5.3 Zubereitung der Stimuli**

Während der Waschvorgänge der Zellen wurden unterschiedliche Konzentrationen von Allergienlösungen aus Wespengift und IL-10 hergestellt.

#### **3.5.3.1 Wespengift**

In Vorversuchen wurden zwei verschiedene Konzentrationen der Wespengiftlösung getestet. Das Insektengift wurde mit dem Nährmedium so verdünnt, dass die Endkonzentrationen 1000 ng/ml und 100 ng/ml betragen. Da sich aber in den Untersuchungen mit der niedrigeren Konzentration keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielen ließen, wurden die folgenden Versuche ausschließlich mit Wespengift in einer Endkonzentration von 1000 ng/ml durchgeführt. Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte auf Eis, um einen möglichen Protein- und somit Aktivitätsverlust zu vermeiden. Wie folgt wurde das Wespengift mit dem Nährmedium verdünnt:

- 80 µl Wespengift (100.000 ng/ml) + 3920 µl IMDM → 4000 µl Wespengift (2000 ng/ml)

### 3.5.3.2 IL-10

Das Lyophilisat des rekombinanten IL-10 wurde in 5 mM Tris Puffer gelöst und in Portionen zu 25 µl bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Konzentration der IL-10-Stammlösung betrug 10 ng/µl. Es wurde mit dem Nährmedium zwei Verdünnungen im Verhältnis 1:10 erstellt:

- 3 µl IL-10 (10 ng/µl) + 27 µl IMDM → 30 µl IL-10 (1 ng/µl)
- 3 µl IL-10 (1 ng/µl) + 27 µl IMDM → 30 µl IL-10 (0,1 ng/µl)

### 3.5.4 Verdünnungsreihe des Wespengiftes und IL-10

Die Lösung aus Wespengift und Nährmedium wurden mit Hilfe des Vortex-Schüttlers gut durchmischt und auf vier kleine Analysenröhrchen zu jeweils 1000 µl verteilt. Anschließend wurden jeweils 20 µl des IL-10-Verdünnungsschema den Röhrchen zupipettiert und der Inhalt erneut mittels Vortex-Schüttler vermengt:

- 1000 µl Wespengift (2000 ng/ml)
- 1000 µl Wespengift + 20 µl IL-10 (10 ng/µl). → 1020 µl Allergenlösung (IL-10 200 ng/ml)
- 1000 µl Wespengift + 20 µl IL-10 (1 ng/µl) → 1020 µl Allergenlösung (IL-10 20 ng/ml)
- 1000 µl Wespengift + 20 µl IL-10 (0,1 ng/µl) → 1020 µl Allergenlösung (IL-10 2 ng/ml)

### 3.5.5 Freisetzung von IL-4 und IL-13

Für die Bestimmung der IL-4- und IL-13-Freisetzung wurde jeweils eine Mikrotiterplatte verwendet. Die beiden Platten wurden mit je 102 µl der zubereiteten Allergenlösungen pro Vertiefung in einer Doppelbestimmung bestückt. Die in 2,5 ml Nährmedium suspendierten Zellen wurden im Brutschrank zusammen mit den Mikrotiterplatten bei 37°C für 10 Minuten angewärmt. Anschließend wurden zum Antigenstimulus jeweils 102 µl Zellsuspension zugesetzt und im Brutschrank inkubiert.

- 102 µl Allergenlösung (IL-10 200 ng/ml) + 102 µl Zellsuspension  
→ 204 µl Zellsuspension (IL 10 100 ng/ml)
- 102 µl Allergenlösung (IL-10 20 ng/ml) + 102 µl Zellsuspension  
→ 204 µl Zellsuspension (IL 10 10 ng/ml)
- 102 µl Allergenlösung (IL-10 2 ng/ml) + 102 µl Zellsuspension  
→ 204 µl Zellsuspension (IL 10 1 ng/ml)

### **3.5.6 Leerwert**

Um die Spontanfreisetzung der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit Wespengift zu testen, wurden für den Leerwert zwei Vertiefungen nur mit dem Nährmedium bestückt und ebenfalls mit der Zellsuspension inkubiert. In der rechnerischen Auswertung wurde der Leerwert dann von dem jeweiligen Ergebnis der Proben abgezogen.

### **3.5.7 Gewinnung und Lagerung der Zellsuspensionen**

Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde eine Mikrotiterplatte bei 1200 U/min 10 Minuten zentrifugiert und für die IL-4-Bestimmung aus jeder Vertiefung 120 µl der Kulturüberstände entnommen.

Nach 20 Stunden wurde die für die IL-13 Bestimmung die andere Mikrotiterplatte bei 1200 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Es wurden 120 µl der Zellüberstände abpipettiert.

Die in Doppelbestimmung gewonnenen Proben wurden für die spätere IL-4- und IL-13-Bestimmung mittels ELISA in verschließbaren Röhrchen im Gefrierschrank bei -80° C aufbewahrt.

## **3.6 Bestimmung der Konzentrationen von IL-4 und IL-13 mittels ELISA**

### **3.6.1 Grundprinzip des ELISA**

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) bezeichnet ein enzymimmunologisches Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe Antigene durch enzymgekoppelte Antikörper quantitativ bestimmt werden können. Hierbei werden antigenspezifische Antikörper zunächst an eine solide Oberfläche gebunden, beispielsweise die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird mit den gebundenen Antikörpern inkubiert. In mehreren Waschvorgängen der Mikrotiterplatte wird das ungebundene Antigen entfernt. Anschließend wird ein weiterer Antikörper zugegeben, der mit einem Enzym gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet nun an ein anderes Epitop des Antigens. Es bildet sich somit ein Antigen-Antikörper-Antigen-Komplex (Sandwich-Prinzip). Als Enzym findet meistens Biotin, dem Horse-Radish-Peroxidase-Streptavidin (HRP-Streptavidin) zugesetzt wird, Verwendung. Nach erneutem Auswaschen der ungebundenen Antikörper, wird die chromogene Substanz Tetramethylbenzidin (TMB) zugefügt, die als Substrat dient. Durch die enzymatische Umsetzung des Chromogens entsteht eine Farbentwicklung. Die Extinktion wird mit Hilfe des Photometers bestimmt und verhält sich proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Antigens in der Probe.

### **3.6.2 IL-4-Bestimmung**

Der Messbereich der IL-4-Konzentrationen lag zwischen  $< 0,5$  pg/ml und 35 pg/ml.

#### **3.6.2.1 Verdünnungsreihe des Standards**

Die beschriebenen Arbeitsgänge fanden auf Eis statt, um einen Proteinverlust zu vermeiden. Zur Bestimmung der Interleukine wurde mit dem lyophilisierten IL-4-Standard eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurde das Lyophilisat in 1,1 ml Standardverdünnungspuffer (SVP) gelöst. Gemäß den Empfehlungen des Herstellers wurde eine Verdünnungsreihe in absteigender Konzentration von 35 pg/ml bis 1 pg/ml angefertigt. Anders als in der Anleitung vorgegeben, wurde nicht direkt auf der Mikrotiterplatte gearbeitet, sondern die Standardlösung in Analysenröhrchen verdünnt. So konnte eine potentielle Beschädigung der IL-4-Antikörper-Beschichtung der Vertiefungen durch die Pipettenspitze verhindert werden.

- 1100 µl IL-4 (35 pg/ml)
- 250 µl IL-4 (35 pg/ml) + 250 µl SVP → 500 µl IL-4 (17,5 pg/ml)
- 250 µl IL-4 (17,5 pg/ml) + 250 µl SVP → 500 µl IL-4 (8,75 pg/ml)
- 250 µl IL-4 (8,75 pg/ml) + 250 µl SVP → 500 µl IL-4 (4,4 pg/ml)
- 250 µl IL-4 (4,4 pg/ml) + 250 µl SVP → 500 µl IL-4 (2,1 pg/ml)
- 250 µl IL-4 (2,1 pg/ml) + 250 µl SVP → 500 µl IL-4 (1 pg/ml)

### 3.6.2.2 Bestückung der Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatte enthielt 96 bereits mit einem monoklonalen IL-4-Antikörper beschichtete Vertiefungen. Die Standard-Verdünnungsreihe und die aufgetauten IL-4-haltigen Kulturüberstände wurden in Doppelbestimmung angelegt. Es wurden jeweils 100 µl in eine Vertiefung gegeben. 2 Bestimmungsfelder wurden für die Negativkontrolle nur mit Standardverdünnungspuffer bestückt.

### 3.6.2.3 Ausführung des IL-4-ELISA

Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Plastikfolie bedeckt und bei Raumtemperatur (18–25°C) 2 Stunden inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal gewaschen und im Anschluss 50 µl des im zugehörigen Puffer gelösten, biotungebundenen IL-4-Antikörpers allen Vertiefungen zupipettiert. Wieder wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert sowie erneut dreimal gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurden je 100 µl Streptavidin-HRP den Vertiefungen zugegeben. Es erfolgte erneut eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte wiederum dreimal gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 100 µl der lichtempfindlichen TMB-Lösung zugesetzt und die Platte für 15–20 Minuten im Dunklen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt und die Farbreaktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

### 3.6.3 IL-13-Bestimmung

Der Messbereich der IL-13-Konzentrationen lag zwischen  $< 1,5$  pg/ml und 100 pg/ml.

#### 3.6.3.1 Verdünnungsreihe des Standards

Analog zum IL-4-ELISA erfolgte die Herstellung der Standardverdünnungsreihe nicht auf der Mikrotiterplatte, sondern in Analysenröhrchen. Um einen möglichen Proteinverlust zu vermeiden, wurde ebenfalls auf Eis gearbeitet. Der lyophilisierte IL-13-Standard wurde in 1,6 ml Standardverdünnungspuffer gelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe in absteigender Konzentration von 100 pg/ml bis 3,125 pg/ml erstellt.

- 1600  $\mu$ l IL-13 (100 pg/ml)
- 250  $\mu$ l IL-13 (100 pg/ml) + 250  $\mu$ l SVP  $\rightarrow$  500  $\mu$ l IL-13 (50 pg/ml)
- 250  $\mu$ l IL-13 (50 pg/ml) + 250  $\mu$ l SVP  $\rightarrow$  500  $\mu$ l IL-13 (25 pg/ml)
- 250  $\mu$ l IL-13 (25 pg/ml) + 250  $\mu$ l SVP  $\rightarrow$  500  $\mu$ l IL-13 (12,5 pg/ml)
- 250  $\mu$ l IL-13 (12,5 pg/ml) + 250  $\mu$ l SVP  $\rightarrow$  500  $\mu$ l IL-13 (6,25 pg/ml)
- 250  $\mu$ l IL-13 (6,25 pg/ml) + 250  $\mu$ l SVP  $\rightarrow$  500  $\mu$ l IL-13 (3,125 pg/ml)

#### 3.6.3.2 Bestückung der Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatte enthielt 96 bereits mit einem monoklonalen IL-13-Antikörper beschichtete Vertiefungen. Entsprechend dem Versuchsablauf des IL-4-ELISA wurde die Mikrotiterplatte mit jeweils 100  $\mu$ l der IL-13-Standardverdünnungsreihe sowie der aufgetauten IL-4-haltigen Kulturüberstände in Doppelbestimmung bestückt. 2 Bestimmungsfelder erhielten für die Negativkontrolle nur Standardverdünnungspuffer.

#### 3.6.3.3 Ausführung des IL-13-ELISA

Die mit der Standard-Verdünnungsreihe und den Kulturüberständen bestückte Mikrotiterplatte wurde mit 50  $\mu$ l des im zugehörigen Puffer gelösten, biotingebundenen Antikörpers den Vertiefungen zugegeben und die Platte abgedeckt für 90 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaliger Waschung wurden je 100 µl Streptavidin-HRP den Vertiefungen zugegeben. Es erfolgte erneut eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte wiederum dreimal gewaschen. Für die Farbreaktion wurden in jede Vertiefung 100 µl der lichtempfindlichen TMB-Lösung pipettiert und die Platte für 15–20 Minuten im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

### **3.7 Rechnerische, statistische und graphische Auswertung**

#### **3.7.1 Rechnerische Auswertung**

Bei der Messung der IL-4 und IL-13-Freisetzung wurde aus der Fluoreszenzrate der Standardverdünnungsreihe und der Negativkontrolle eine Eichkurve erstellt. Aus der Doppelbestimmung der Testproben wurde der Mittelwert errechnet. Als Leerwert fungierte die Extinktion der Proben, deren Zellen ausschließlich mit Nährmedium inkubiert worden waren. Dieser Leerwert wurde von den gemessenen IL-4- und IL-13-Werten abgezogen, um die Konzentration der Interleukine in den Testproben zu erhalten. Die Ergebnisse wurden über das Softwareprogramm Microsoft Excel XP (Microsoft Corporation) eingegeben.

Zur Ermittlung des Einflusses der klinischen Charakteristika auf die Freisetzung von IL-4 und IL-13 wurden zwei verschiedene Formeln definiert.

#### **Prozentuale Reduktion von IL-4 und IL-13 durch IL-10**

Prozentuale Reduktion der IL-4-Freisetzung =

$$100\% - 100 \times \frac{\text{IL-4-Freisetzung [bei 1000 ng/ml Wespengift und 100 ng/ml IL-10]}}{\text{IL-4-Freisetzung [bei 1000 ng/ml Wespengift und 0 ng/ml IL-10]}}$$

Prozentuale Reduktion der IL-13-Freisetzung =

$$100\% - 100 \times \frac{\text{IL-13-Freisetzung [bei 1000 ng/ml Wespengift und 100 ng/ml IL-10]}}{\text{IL-13-Freisetzung [bei 1000 ng/ml Wespengift und 0 ng/ml IL-10]}}$$

Die prozentuale Reduktion gibt somit das Ausmaß der supprimierenden Wirkung von IL-10 in Prozent wieder. Dabei wird die maximale IL-10 Konzentration von 100 ng/ml angenommen, da hier der größte Effekt im Rahmen dieser Analyse erwartet wird.

#### **Absolute Stimulation von IL-4 und IL-13 durch IL-10**

Absolute Stimulation der IL-4-Freisetzung =

IL-4-Freisetzung [bei 1000 ng/ml Wespengift, ohne IL-10] – Leerwert

Absolute Stimulation der IL-13-Freisetzung =

IL-13-Freisetzung [bei 1000 ng/ml Wespengift ohne IL-10] – Leerwert

Die absolute Stimulation gibt die IL-4 bzw. IL-13 Freisetzung wieder, die durch die Zugabe von 1000 ng/ml Wespengift induziert wurde.

#### **3.8.2 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 für Microsoft Windows.

Als statistisches Testverfahren zur Ermittlung des Einflusses von IL-10 und Wespengift auf die Freisetzung von IL-4 und IL-13 wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest für verbundene Stichproben verwendet.

Für die Beurteilung des Zusammenhangs zwischen den klinischen Charakteristika und den laborchemisch ermittelten Effekten wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die in der Literatur üblichen Signifikanzniveaus verwendet. Die entsprechenden Niveaus wurden innerhalb der Tests durch die Angabe von \*, \*\* und \*\*\* gekennzeichnet und sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Signifikanzniveaus

<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanzniveau</b>	<b>Kennzeichnung</b>
$\geq 0,05$	nicht signifikant	
$< 0,05$	Signifikant	*
$< 0,01$	Hochsignifikant	**
$< 0,001$	Höchstsignifikant	***

### 3.8.2 Graphische Auswertung

Die Graphiken wurden mit Microsoft Excel erstellt. Die Ergebnisse der IL-4- und IL-13-Freisetzung wurden in pg/ml auf der x-Achse gegen die ansteigenden IL-10-Konzentrationen in ng/ml auf der y-Achse aufgetragen. Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Boxplots.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Klinische und demographische Daten der Patienten

Die klinischen und demographischen Daten der Probanden sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Klinische und demographische Daten der untersuchten Patienten

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Spezifisches IgE gegen Wespengift (CAP-Klasse)	Spezifisches IgE gegen Bienengift (CAP-Klasse)	Basale Mastzelltryptase im Serum ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pricktest				Atopie	Schweregrad der Stichreaktion	Reaktion auf Stichprovokation	Probandengruppe IL-4	Probandengruppe IL-13
						Gräser	Dermatophagoides pteronyssinus	Katze	Naturlatex					
1	w	50	1	0	4,72	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
2	w	67	3	0	7,85	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
3	w	34	2	1	3,76	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
4	w	36	3	2	3,94	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
5	w	56	2	2	4,62	0	0	0	0	nein	II	ja	ja	ja
6	w	63	3	0	2,47	0	0	0	0	nein	II	nein	nein	ja
7	w	55	2	1	5,53	0	0	0	0	nein	II	nein	nein	ja
8	w	68	3	0	2,05	0	0	0	0	nein	II-III	nein	ja	ja
9	m	64	2	0	3,89	0	0	0	0	nein	III	nein	ja	ja
10	m	50	3	3	8,22	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
11	m	46	2	0	12,1	+++	+++	0	0	Ja	III	nein	nein	ja
12	m	68	3	2	10,6	0	0	0	0	nein	II-III	nein	nein	ja
13	m	50	3	3	5,33	0	0	0	0	nein	II	nein	nein	ja
14	m	54	2	2	6,08	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
15	m	42	3	0	5,74	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
16	m	47	2	0	3,77	0	0	0	0	nein	I	nein	ja	ja
17	m	49	3	4	8,01	+	0	0	0	Ja	II	nein	ja	ja
18	m	27	2	2	2,83	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja
19	w	45	1	0	3,9	0	0	0	0	nein	I-II	nein	ja	ja
20	w	36	3	1	5,60	0	0	0	0	nein	II	nein	ja	ja

w = weiblich; m = männlich

## 4.2 IL-4 Freisetzung aus basophilen Granulozyten

Es wurde untersucht, inwieweit IL-10 das Freisetzungsverhalten des Zytokins IL-4 aus basophilen Granulozyten bei Patienten mit Wespengiftallergie beeinflusst.

Im Folgenden wurden zwei verschiedene Effekte analysiert und nachgewiesen:

1. Die Stimulation der Freisetzung von IL-4 durch Wespengift
2. Die Reduktion der Freisetzung von IL-4 durch den Zusatz von IL-10 nach Stimulation mit Wespengift
3. Die Abhängigkeit der Ergebnisse von klinischen Charakteristika

Die Analyse der Ergebnisse erfolgt dabei jeweils in zwei Schritten: Zunächst werden die Zusammenhänge aus deskriptiver Sicht beschrieben und im Anschluss die Ergebnisse statistisch getestet und auf Signifikanz hin untersucht.

### 4.2.1 Stimulation der IL-4-Sekretion durch Wespengift

Um den Nachweis der Stimulation der IL-4-Freisetzung durch die Zugabe von Wespengift zu erbringen, wurden für das Patientenkollektiv zwei Messreihen aufgestellt und miteinander verglichen. Die erste Messreihe (LW) enthält die Ausschüttung von IL-4 ohne Zugabe von Wespengift und IL-10, es handelt sich hierbei um den Leerwert. Die zweite Messreihe (W1000) umfasst die Konzentration von IL-4 nach Zugabe von 1000 ng/ml Wespengift. Die entsprechenden Lagemaße der Messreihen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht Messreihen zur Stimulation von IL-4 durch Wespengift

Messreihe IL-4 [pg/ml]	LW	W1000
Wespengift [ng/ml]	0	1000
IL-10 [ng/ml]	0	0
Maximum	0,796	7,495
Oberes Quartil	0,478	2,676
Median	0,352	1,359
Unteres Quartil	0,180	0,838
Minimum	0,009	0,269
Bereinigung um Leerwert	-	nein

Auf deskriptiver Ebene ist bereits deutlich zu erkennen, dass sich alle Lagemaße in die gleiche Richtung verändert haben. Der obere (untere) Extremwert erhöht sich um 6,699 pg/ml (0,260 pg/ml), der Median zeigt eine Veränderung um 1,007 pg/ml, und das obere (untere) Quartil verändert sich um 2,198 pg/ml (0,658 pg/ml).

Die Untersuchung mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests bestätigt den Effekt auf statistischer Ebene: Die Stimulation von IL-4 durch Wespengift ist höchstsignifikant ( $p = 0,001$ ). Da der Median zwischen den Messreihen LW und W1000 ansteigt, kann der Effekt der Stimulation von IL-4 durch Wespengift als bestätigt angesehen werden. Die entsprechenden Parameter der Teststatistik sind zur Übersicht in Tabelle 7 dargestellt.

Der Effekt ist graphisch in Abbildung 1 in Form eines Boxplots zusammengefasst.

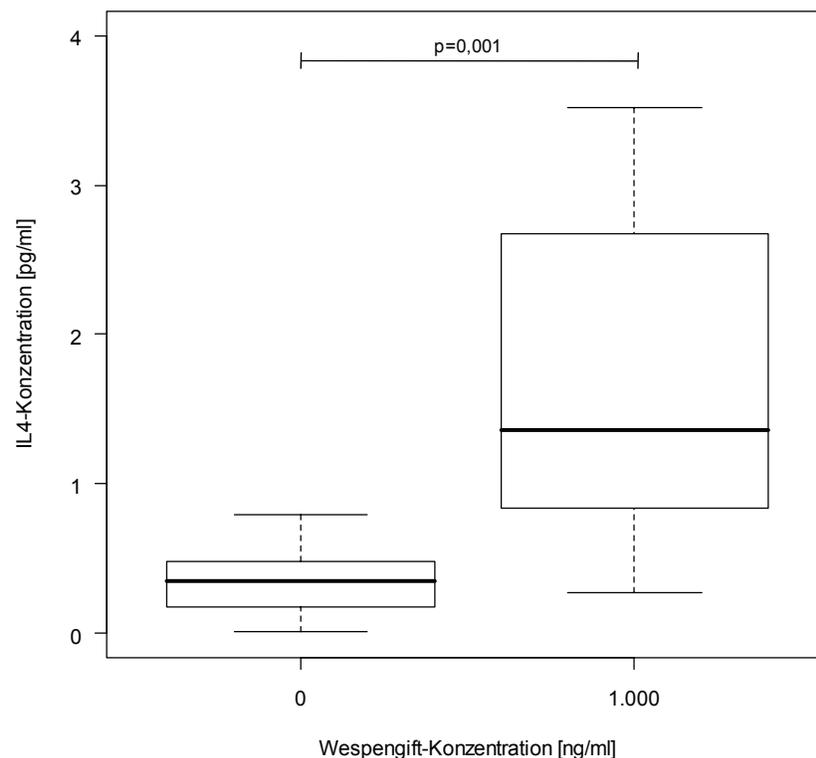


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Stimulation der IL-4-Freisetzung durch 1000 ng/ml Wespengift (Ausreißer aus Darstellungsgründen nicht dargestellt, vgl. Tabelle 6)

Tabelle 7: Statistik zum Nachweis der Stimulation von IL-4 durch Wespengift

Verglichene Messreihen			N	Mittlerer Rang	Rangsumme	Z-Statistik	p-Wert
LW	W1000	Negative Ränge (A>B)	0	0,000	0,000	-3,408	0,001 ***
		Positive Ränge (B>A)	15	8,000	120,000		
		Bindungen (A=B)	0				
		Gesamt	15				

#### 4.2.2 Inhibition der Freisetzung von IL-4 durch IL-10

Im Folgenden soll die IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit IL-10 untersucht werden. Wie in Kapitel 1 beschrieben, wird ein negativer Zusammenhang zwischen der Konzentration von IL-10 und der Ausschüttung des Zytokins IL-4 vermutet, d.h. eine höhere Konzentration von IL-10 sollte die Freisetzung von IL-4 reduzieren.

Der supprimierende Effekt wird bei vier verschiedenen Konzentrationen von IL-10 untersucht und die Messreihen entsprechend benannt: 0 ng/ml (W1000), 1 ng/ml (W1000\_K1), 10 ng/ml (W1000\_K10) und 100 ng/ml (W1000\_K100). Die jeweiligen Messreihen wurden um Leerwerte bereinigt, um die Effekte vergleichbar zu machen. Dieses Vorgehen führt zu dem zunächst kontraintuitiv erscheinenden Effekt, dass die angegebenen Konzentrationen negative Werte annehmen können. Diese negativen Werte sind folgendermaßen zu interpretieren: Ab einer gewissen Konzentration von IL-10 wird die durch Wespengift 1000 ng/ml induzierte Freisetzung von IL-4 komplett inhibiert und zusätzlich auch das durch „natürliche“ Stimulation ausgeschüttete IL-4 supprimiert. Die Tabelle 8 zeigt die Lagemaße der Messreihen im Überblick.

Tabelle 8: Messreihen zur Reduktion von IL-4 durch Zugabe von IL-10

Messreihe IL-4 [pg/ml]	W1000	W1000_K1	W1000_K10	W1000_K100
Wespengift [ng/ml]	1000	1000	1000	1000
IL-10 [ng/ml]	0	1	10	100
Maximum	6,986	5,818	5,615	4,996
Oberes Quartil	2,223	2,374	2,175	2,064
Median	1,182	1,013	1,111	0,796
Unteres Quartil	0,466	0,356	0,338	0,270
Minimum	0,072	0,048	0,006	-0,035
Bereinigung um Leerwert	ja	ja	ja	ja

Auf deskriptiver Ebene lässt sich zunächst feststellen, dass der Median der durch Wespengift induzierten IL-4-Freisetzung durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von IL-10 immer unter dem Median ohne Zusatz von IL-10 liegt. Der Median der Messreihe ohne IL-10-Konzentration (W1000) ist 1,182 pg/ml. Bei einer Zugabe von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml liegt die Konzentration jeweils bei 1,013 pg/ml, 1,111 pg/ml und 0,796 pg/ml. Weiterhin ist erkennbar, dass sich auch die oberen und unteren Extremwerte aller Messreihen mit positiver Konzentration von IL-10 unterhalb dem Referenzfall ohne Zusatz von IL-10 befinden.

Die deskriptiven Beobachtungen bestätigen sich im statistischen Test. Dabei wurden die Messreihen mit positiven IL-10 Konzentrationen (W1000\_K1, W1000\_K10 und W1000\_K100) mit dem Referenzfall ohne IL-10 Konzentration (W1000) verglichen. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Statistik zum Nachweis der Reduktion IL-4-Freisetzung durch IL-10

Verglichene Messreihen			N	Mittlerer Rang	Rangsumme	Z-Statistik	p-Wert
W1000	W1000_K1	Negative Ränge (A>B)	9	7,889	71,000	-0,625	0,532
		Positive Ränge (B>A)	6	8,167	49,000		
		Bindungen (A=B)	0				
		Gesamt	15				
W1000	W1000_K10	Negative Ränge (A>B)	10	8,400	84,000	-1,363	0,173
		Positive Ränge (B>A)	5	7,200	36,000		
		Bindungen (A=B)	0				
		Gesamt	15				
W1000	W1000_K100	Negative Ränge (A>B)	10	9,700	97,000	-2,101	0,036 *
		Positive Ränge (B>A)	5	4,600	23,000		
		Bindungen (A=B)	0				
		Gesamt	15				

Wie zu erkennen ist, zeigt sich der supprimierende Effekt erst bei der höchsten verwendeten IL-10-Konzentration von 100 ng/ml signifikant zum Niveau  $p=0,036$ . Da der Median bei der IL-10-Konzentration von 100 ng/ml unterhalb des Medians ohne Zusatz von IL-10 liegt, gilt der Effekt der Supprimierung als bestätigt.

Die einzelnen Lagemaße und Signifikanzniveaus sind in Abbildung 2 in Form eines Boxplots noch einmal zusammenfassend dargestellt.

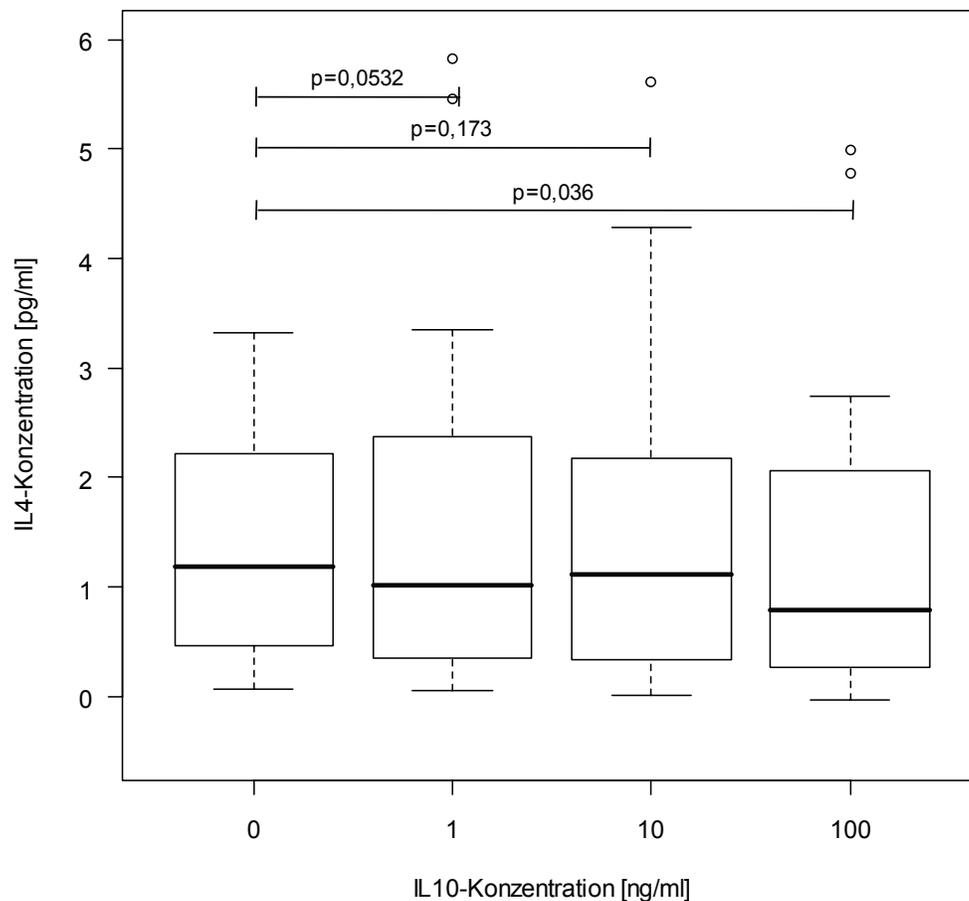


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Reduktion der IL-4-Freisetzung durch Zugabe von IL-10

### 4.2.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von klinischen Charakteristika

#### 4.2.3.1 Stimulation der IL-4-Freisetzung durch Wespengift

Der Effekt der Freisetzung von IL-4 durch den Zusatz von Wespengift wird im Folgenden auf die Abhängigkeit von klinischen Daten hin untersucht.

Die Höhe der IL-4-Freisetzung wird dabei jeweils im Median und dem Mittelwert dargestellt, wobei die Probanden in jeweils verschiedene Klassen (z.B. Alter, Geschlecht, etc.) eingeteilt werden.

Tabelle 10 zeigt die Abhängigkeit vom Alter. Dabei wurden die Probanden in drei verschiedene Altersklassen (0 – 30 Jahre, 31 – 50 Jahre, 51 – 100 Jahre) eingeteilt. Die Freisetzung von IL-4 durch die Zugabe von 1000 ng/ml Wespengift zeigt im Median einen deutlichen Unterschied, der jedoch auf den geringen Umfang an Beobachtungen in Altersklasse 1 (0 – 30 Jahre) zurückzuführen ist. Der Unterschied zwischen Klasse 2 und 3 zeigte sich nicht signifikant ( $p = 0,641$ ).

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen Alter und Stimulation der IL-4-Freisetzung durch Wespengift

Alter	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
0 - 30 Jahre	1	7%	6,986	6,986
31 - 50 Jahre	9	60%	1,333	1,982
51 - 100 Jahre	5	33%	0,553	0,596
Gesamt	15	100%		

Die Freisetzung von IL-4 wurde weiterhin auf die Abhängigkeit der CAP-Klasse Wespe hin untersucht. Dazu wurden die Probanden in die Klassen 1, 2 und 3 eingeteilt. Obwohl der Median zwischen den Gruppen deutlich variiert, ergibt sich kein signifikanter Effekt.

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen CAP-Klasse und Stimulation der IL-4-Freisetzung durch Wespengift

CAP-Klasse Wespe	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
1	2	13%	1,407	1,407
2	6	40%	0,702	2,479
3	7	47%	1,182	1,445
Gesamt	15	100%		

Die Untersuchung auf Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten zeigt einen deutlichen Unterschied in der Freisetzung von IL-4 im Median. Männliche Probanden setzen bei Stimulation mit Wespengift im Median nur 0,854 pg/ml IL-4 frei, während die weiblichen Probandinnen hingegen 1,407 pg/ml freisetzen. Der Effekt ist statistisch dennoch nicht signifikant ( $p = 0,298$ ).

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen Geschlecht und Stimulation der IL-4-Freisetzung durch Wespengift

Geschlecht	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
männlich	7	47%	0,851	1,803
weiblich	8	53%	1,407	1,898
Gesamt	15	100%		

Die Probanden wurden weiterhin nach dem Schweregrad der Stichreaktion klassifiziert. Aufgrund des unterschiedlichen Stichprobenumfangs der einzelnen Klassen, kann kein statistischer Test durchgeführt werden (Klasse I und III haben jeweils nur 2 Beobachtungen, während Klasse II 11 Beobachtungen aufweist).

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Stichreaktion und der Stimulation der IL-4-Freisetzung durch Wespengift

Schweregrad Stich	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
I	2	13%	1,092	1,092
II	11	73%	1,182	2,180
III	2	13%	0,823	0,823
Gesamt	15	100%		

#### 4.2.2.3 Reduktion der IL-4-Freisetzung durch IL-10

Die Reduktion der IL-4-Freisetzung durch IL-10 nach Zusatz von Wespengift wird im Folgenden auf die Abhängigkeit von klinischen Daten hin untersucht. In den Tabellen wird jeweils die prozentuale Reduktion der IL-4 Freisetzung nach Zugabe von 100 ng/ml IL-10 dargestellt.

Die prozentuale Reduktion von IL-4 ist im Median in der Alterklasse 1 (0 – 30 Jahre) zwar höher als in den Alterklassen 2 und 3, jedoch kann der Effekt statistisch aufgrund der niedrigen Anzahl an Probanden in Klasse 1 (n=1) nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen Alter und prozentualer Reduktion der IL-4-Freisetzung durch Zugabe von 100 ng/ml IL-10

Alter	Anzahl der Fälle		Prozentuale Reduktion IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
0 - 30 Jahre	1	5%	27%	27%
31 - 50 Jahre	11	55%	16%	7%
51 - 100 Jahre	8	40%	24%	21%
Gesamt	20	100%		

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Reduktionswirkung von IL-10 auf die IL-4-Freisetzung von der CAP-Klasse (Wespengift) untersucht. Die Probanden wurden gemäß ihrer CAP-Klasse in drei Gruppen eingeteilt. Die Reduktion variiert zwischen den einzelnen Klassen zwar im Median, ist statistisch jedoch nicht signifikant.

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen CAP-Klasse und prozentualer Reduktion der IL-4-Freisetzung durch Zugabe von 100 ng/ml IL-10

CAP-Klasse Wespe	Anzahl der Fälle		Prozentuale Reduktion IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
1	2	13%	15%	15%
2	6	40%	24%	12%
3	7	47%	16%	14%
Gesamt	15	100%		

Die Reduktion der IL-4-Freisetzung durch IL-10 wurde schließlich auf die Abhängigkeit vom Geschlecht der Probanden untersucht. Trotz der deutlich unterschiedlichen Mediane (27% bei Männern, 7% bei Frauen), konnte der Effekt statistisch nicht signifikant nachgewiesen werden ( $p=0,298$ ).

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen Geschlecht und prozentualer Reduktion der IL-4-Freisetzung durch Zugabe von 100 ng/ml IL-10

Geschlecht	Anzahl der Fälle		Prozentuale Reduktion IL-4 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
männlich	7	47%	27%	17%
weiblich	8	53%	7%	10%
Gesamt	15	100%		

#### 4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-4 Untersuchung

Zusammenfassend können bei der Betrachtung der vorangegangenen Analysen zwei Ergebnisse festgehalten werden:

- (1.) Die Freisetzung von IL-4 wird durch den Zusatz von 1000 ng/ml Wespengift stimuliert. Der Effekt ist statistisch hochsignifikant ( $p < 0,009$ )
- (2.) Die Zugabe von IL-10 supprimiert die Sekretion von IL-4. Der Effekt ist statistisch signifikant ( $p < 0,036$ ).

### 4.3 IL-13-Freisetzung aus basophilen Granulozyten

Es wurde untersucht, inwieweit IL-10 die Freisetzung des Zytokins IL-13 aus basophilen Granulozyten bei Patienten mit Wespengiftallergie beeinflusst.

Im Folgenden werden zwei verschiedene Effekte analysiert und nachgewiesen:

1. Die Stimulation der Freisetzung von IL-13 durch Wespengift
2. Die Reduktion der Freisetzung von IL-13 durch den Zusatz von IL-10 nach Stimulation mit Wespengift
3. Die Abhängigkeit der Ergebnisse von den klinischen Charakteristika

Die Analyse der Ergebnisse erfolgt dabei jeweils in zwei Schritten: Zunächst werden die Zusammenhänge aus deskriptiver Sicht beschrieben und im Anschluss die Ergebnisse statistisch getestet und auf Signifikanz hin untersucht.

#### 4.3.1 Stimulation von IL-13 durch Wespengift

Um den Nachweis der Stimulation der IL-13 Sekretion durch die Zugabe von Wespengift zu erbringen, wurden für das Patientenkollektiv zwei Messreihen aufgestellt und miteinander verglichen. Die erste Messreihe (LW) enthält die Ausschüttung von IL-13 ohne Zugabe von Wespengift und IL-10, es handelt sich hierbei um den Leewert. Die zweite Messreihe (W1000) umfasst die Konzentration von IL-13 nach Zugabe von 1000 ng/ml Wespengift. Die entsprechenden Lagemaße der Messreihen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Übersicht Messreihen zur Stimulation von IL-13 durch Wespengift

Messreihe IL-13 [pg/ml]	LW	W1000
Wespengift [ng/ml]	0	1000
IL-10 [ng/ml]	0	0
Maximum	190,174	411,389
Oberes Quartil	4,330	14,598
Median	2,081	7,010
Unteres Quartil	0,797	4,697
Minimum	0,000	0,391
Bereinigung um Leerwert	-	nein

Auf deskriptiver Ebene ist bereits deutlich zu erkennen, dass sich alle Lagemaße erhöhen. Der obere (untere) Extremwert verändert sich um 221,215 pg/ml (0,391 pg/ml), der Median erhöht sich um 4,929 pg/ml, und das obere (untere) Quartil verändert sich um 10,268 pg/ml (3,900 pg/ml).

Die Untersuchung mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests bestätigt den Effekt höchstsignifikant ( $p=0,048$ ). Da der Median zwischen den Messreihen LW und W1000 ansteigt, kann der Effekt der Stimulierung von IL-13 durch Wespengift als bestätigt angesehen werden. Die entsprechenden Parameter der Teststatistik sind zur Übersicht in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Statistik zum Nachweis der Stimulation von IL-13 durch Wespengift

Verglichene Messreihen			N	Mittlerer Rang	Rangsumme	Z-Statistik	p-Wert
LW	W1000	Negative Ränge (A>B)	5	10,400	52,000	-1,979	0,048 *
		Positive Ränge (B>A)	15	10,533	158,000		
		Bindungen (A=B)	0	0	0		
		Gesamt	20	0	0		

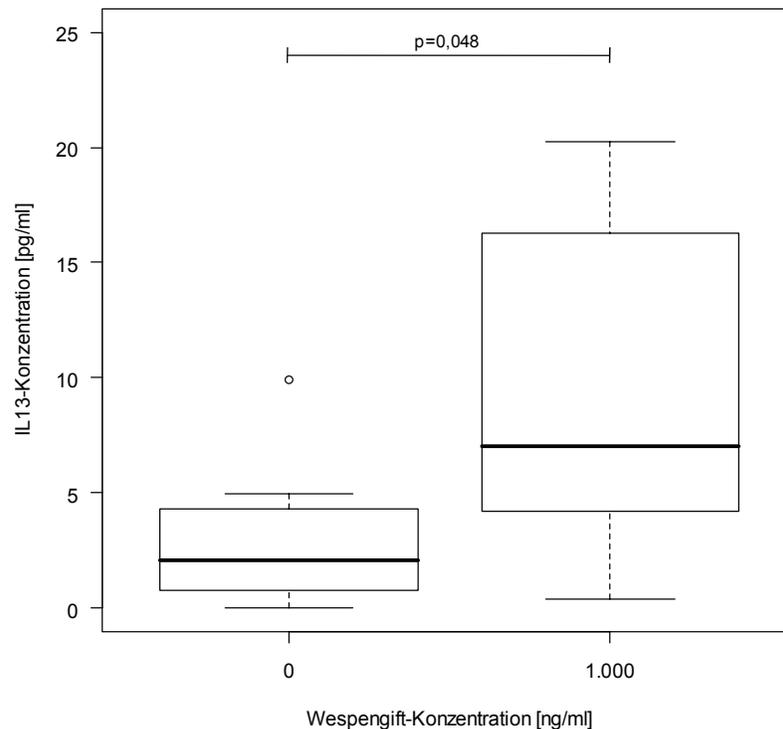


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Stimulation der IL-4-Freisetzung durch 1000 ng/ml Wespengift (Ausreißer aus Darstellungsgründen nicht vollständig berücksichtigt, vgl. Tabelle 18)

#### 4.3.2 Inhibition der Freisetzung von IL-13 durch IL-10

Im Folgenden wird IL-13-Freisetzung nach Inkubation mit IL-10 untersucht. Wie in Kapitel 1 zuvor beschrieben, wird ein negativer Zusammenhang zwischen der Konzentration von IL-10 und der Ausschüttung des Zytokins IL-13 vermutet, d.h. eine höhere Konzentration von IL-10 sollte die Freisetzung von IL-13 reduzieren.

Der supprimierende Effekt wird bei vier verschiedenen Konzentrationen von IL-10 untersucht und die Messreihen entsprechend benannt: 0 ng/ml (W1000), 1 ng/ml (W1000\_K1), 10 ng/ml (W1000\_K10) und 100 ng/ml (W1000\_K100). Die jeweiligen Messreihen wurden um Leerwerte bereinigt, um die Effekte vergleichbar zu machen (zur Interpretation negativer Werte siehe Kapitel 4.2.2). Die Tabelle 19 zeigt die Lagemaße der Messreihen im Überblick.

Tabelle 19: Messreihen zur Reduktion von IL-13 durch Zugabe von IL-10

Messreihe IL-13 [pg/ml]	W1000	W1000_K1	W1000_K10	W1000_K100
Wespengift [ng/ml]	1000	1000	1000	1000
IL-10 [ng/ml]	0	1	10	100
Maximum	221,215	48,055	28,780	23,924
Oberes Quartil	11,242	5,852	3,123	2,639
Median	4,962	2,861	1,282	0,798
Unteres Quartil	2,277	0,045	-0,118	-0,479
Minimum	0,247	-75,973	-9,861	-31,077
Bereinigung um Leerwert	ja	ja	ja	ja

Auf deskriptiver Ebene lässt sich zunächst feststellen, dass der Median der durch Wespengift induzierten Ausschüttung von IL-13 durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von IL-10 jeweils immer unter dem Median ohne Zusatz von IL-10 liegt. Der Median der Messreihe ohne IL-10-Konzentration (W1000) ist bei 4,962 pg/ml. Durch Zugabe von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml ergeben sich Konzentrationen von 2,861 pg/ml, 1,282 pg/ml und 0,798 pg/ml. Weiterhin ist erkennbar, dass sich auch die oberen und unteren Extremwerte aller Messreihen mit positiver Konzentration von IL-10 jeweils unterhalb dem Referenzfall ohne Zusatz von IL-10 befinden.

Die deskriptiven Beobachtungen bestätigen sich im statistischen Test. Dabei wurden jeweils die Messreihen mit positiven IL-10-Konzentrationen (W1000\_K1, W1000\_K10 und W1000\_K100) mit dem Referenzfall ohne IL-10 (W1000) verglichen. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Statistik zum Nachweis der Reduktion IL-13-Freisetzung durch IL-10

Verglichene Messreihen			N	Mittlerer Rang	Rangsumme	Z-Statistik	p-Wert
W1000	W1000_K1	Negative Ränge (A>B)	19	10,316	196,000	-3,920	0,000 ***
		Positive Ränge (B>A)	1	14,000	14,000		
		Bindungen (A=B)	0				
		Gesamt	20				
W1000	W1000_K10	Negative Ränge (A>B)	20	10,500	210,000	-3,920	0,000 ***
		Positive Ränge (B>A)	0	0,000	0,000		
		Bindungen (A=B)	0	0	0		
		Gesamt	20	0	0		
W1000	W1000_K100	Negative Ränge (A>B)	20	10,500	210,000	-3,920	0,000 ***
		Positive Ränge (B>A)	0	0,000	0,000		
		Bindungen (A=B)	0	0	0		
		Gesamt	20	0	0		

Wie zu erkennen ist, zeigt sich der hemmende Effekt bereits bei der niedrigsten verwendeten IL-10-Konzentration von 1 ng/ml höchstsignifikant ( $p=0,000$ ). Auch die weiteren, getesteten Konzentrationsniveaus von 10 ng/ml und 100 ng/ml sind höchstsignifikant. Da diese Mediane jeweils unterhalb des Medians ohne Zusatz von IL-10 liegen, gilt der Effekt der Supprimierung als bestätigt.

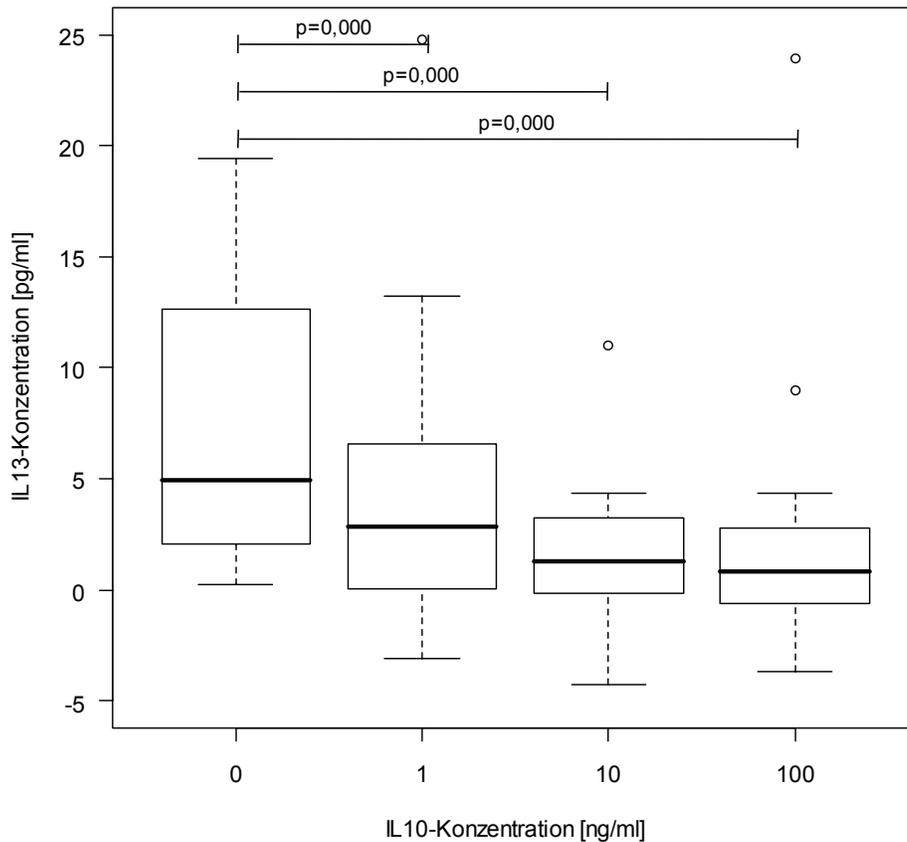


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Reduktion der IL-13-Freisetzung durch Zugabe von IL-10 (Ausreißer aus Darstellungsgründen nicht dargestellt, vgl. Tabelle 19)

### 4.3.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von klinischen Charakteristika

#### 4.3.3.1 Stimulation der IL-13-Freisetzung durch Wespengift

Der Effekt der Freisetzung von IL-13 durch den Zusatz von Wespengift wird im Folgenden auf die Abhängigkeit von klinischen Daten hin untersucht. Die IL-13-Freisetzung wird dabei jeweils im Median und dem Mittelwert dargestellt.

Tabelle 21 zeigt die Abhängigkeit des Effektes vom Alter. Dabei wurden die Probanden in drei verschiedene Altersklassen (0 – 30 Jahre, 31 – 50 Jahre, 51 – 100 Jahre) eingeteilt. Die Stimulation von IL-13 durch die Zugabe von 1000 ng/ml Wespengift zeigt im Median kaum einen Unterschied. Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben ergibt ebenfalls keine Signifikanz.

Tabelle 21: Zusammenhang zwischen Alter und Stimulation der IL-13-Freisetzung durch Wespengift

Alter	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
0 - 30 Jahre	1	5%	5,426	5,426
31 - 50 Jahre	11	55%	4,432	11,351
51 - 100 Jahre	8	40%	5,032	33,340
Gesamt	20	100%		

Die Stimulation wurde weiterhin auf die Abhängigkeit der CAP-Klasse Wespengift hin untersucht. Dazu wurden die Probanden in die drei aufgetretenen Klassen 1, 2 und 3 eingeteilt. Obwohl der Median zwischen den Gruppen deutlich schwankt, ergibt sich aus statistischer Sicht kein signifikanter Effekt. Die großen Unterschiede sind auf die geringe Anzahl der Beobachtungen in Klasse 1 (n=2) zurückzuführen.

Tabelle 22: Zusammenhang zwischen CAP-Klasse und Stimulation der IL-13-Freisetzung durch Wespengift

CAP-Klasse Wespe	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
1	2	10%	3,505	3,505
2	8	40%	6,517	37,834
3	10	50%	4,465	8,891
Gesamt	20	100%		

Die Untersuchung auf Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten zeigt eine leicht unterschiedliche Freisetzung von IL-13. Im Gegensatz zu IL-4 setzten die Männer im Median mehr IL-13 frei als die Frauen (männliche Probanden 5,032 pg/ml IL-13 vs. weibliche Probandinnen 4,929 pg/ml IL-13). Der Effekt ist dennoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,650$ ).

Tabelle 23: Zusammenhang zwischen Geschlecht und Stimulation der IL-13-Freisetzung durch Wespengift

Geschlecht	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
männlich	10	50%	5,032	26,646
weiblich	10	50%	4,929	13,213
Gesamt	20	100%		

Bezüglich des Zusammenhangs der Freisetzung von IL-13 mit dem Schweregrad der Stichreaktion wurden die Probanden in drei Klassen eingeteilt. Der Vergleich der Klassen führt jedoch zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis. Dennoch kann aus der Darstellung der Mediane ein klarer Trend abgelesen werden: Je stärker der Schweregrad der Stichreaktion ist, desto mehr IL-13 wird nach Stimulation mit Wespengift freigesetzt.

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Stichreaktion und der Stimulation der IL-13-Freisetzung durch Wespengift

Schweregrad Stich	Anzahl der Fälle		Absolute Stimulation IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
I	2	10%	3,066	3,066
II	14	70%	5,032	10,823
III	4	20%	9,178	60,232
Gesamt	20	100%		

#### 4.3.3.2 Reduktion der IL-13-Freisetzung durch IL-10

Der Effekt der Reduktion der IL-13-Freisetzung durch IL-10 wird im Folgenden auf die Abhängigkeit von klinischen Daten hin untersucht. In den folgenden Tabellen wird jeweils die prozentuale Reduktion der IL-13-Freisetzung nach Zugabe von 100 ng/ml IL-10 dargestellt.

Die prozentuale Reduktion von IL-13 ist im Median in der Alterklasse 1 (0 – 30 Jahre) zwar wesentlich geringer als in den Alterklassen 2 und 3, jedoch kann der Effekt statistisch aufgrund der niedrigen Anzahl an Probanden in Klasse 1 (n=1) nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 25: Zusammenhang zwischen Alter und prozentualer Reduktion der IL-13-Freisetzung durch Zugabe von 100 ng/ml IL-10

Alter	Anzahl der Fälle		Prozentuale Reduktion IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
0 - 30 Jahre	1	5%	29%	29%
31 - 50 Jahre	9	45%	54%	51%
51 - 100 Jahre	5	25%	62%	56%
Gesamt	15	100%		

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der supprimierenden Wirkung von IL-10 auf die IL-13-Freisetzung von der CAP-Klasse (Wespengift) untersucht. Die Probanden wurden in die entsprechenden CAP-Klassen eingeteilt. Der Zusammenhang zwischen der verminderten IL-13-Freisetzung und der CAP-Klasse ist statistisch nicht signifikant.

Tabelle 26: Zusammenhang zwischen CAP-Klasse und prozentualer Reduktion der IL-13-Freisetzung durch Zugabe von 100 ng/ml IL-10

CAP-Klasse Wespe	Anzahl der Fälle		Prozentuale Reduktion IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
1	2	10%	58%	58%
2	8	40%	43%	45%
3	10	50%	64%	57%
Gesamt	20	100%		

Die Reduktion der IL-13-Freisetzung durch IL-10 wurde schließlich auf die Abhängigkeit vom Geschlecht der Probanden untersucht. Trotz der unterschiedlichen Mediane (62% bei Männern, 47% bei Frauen), konnte der Effekt statistisch nicht signifikant nachgewiesen werden ( $p=0,650$ ).

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen Geschlecht und prozentualer Reduktion der IL-13-Freisetzung durch Zugabe von 100 ng/ml IL-10

Geschlecht	Anzahl der Fälle		Prozentuale Reduktion IL-13 Freisetzung	
	n=	%	Median	Mittelwert
männlich	10	50%	62%	57%
weiblich	10	50%	47%	48%
Gesamt	20	100%		

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-13 Untersuchung

Zusammenfassend können bei der Betrachtung der vorangegangenen Analysen zwei Ergebnisse festgehalten werden:

1. Die Freisetzung von IL-13 wird durch den Zusatz von 1000 ng/ml Wespengift stimuliert. Der Effekt ist statistisch signifikant ( $p = 0,048$ )
2. Die Zugabe von IL-10 supprimiert die Freisetzung von IL-13. Der Effekt ist statistisch höchstsignifikant ( $p = 0,000$ ).

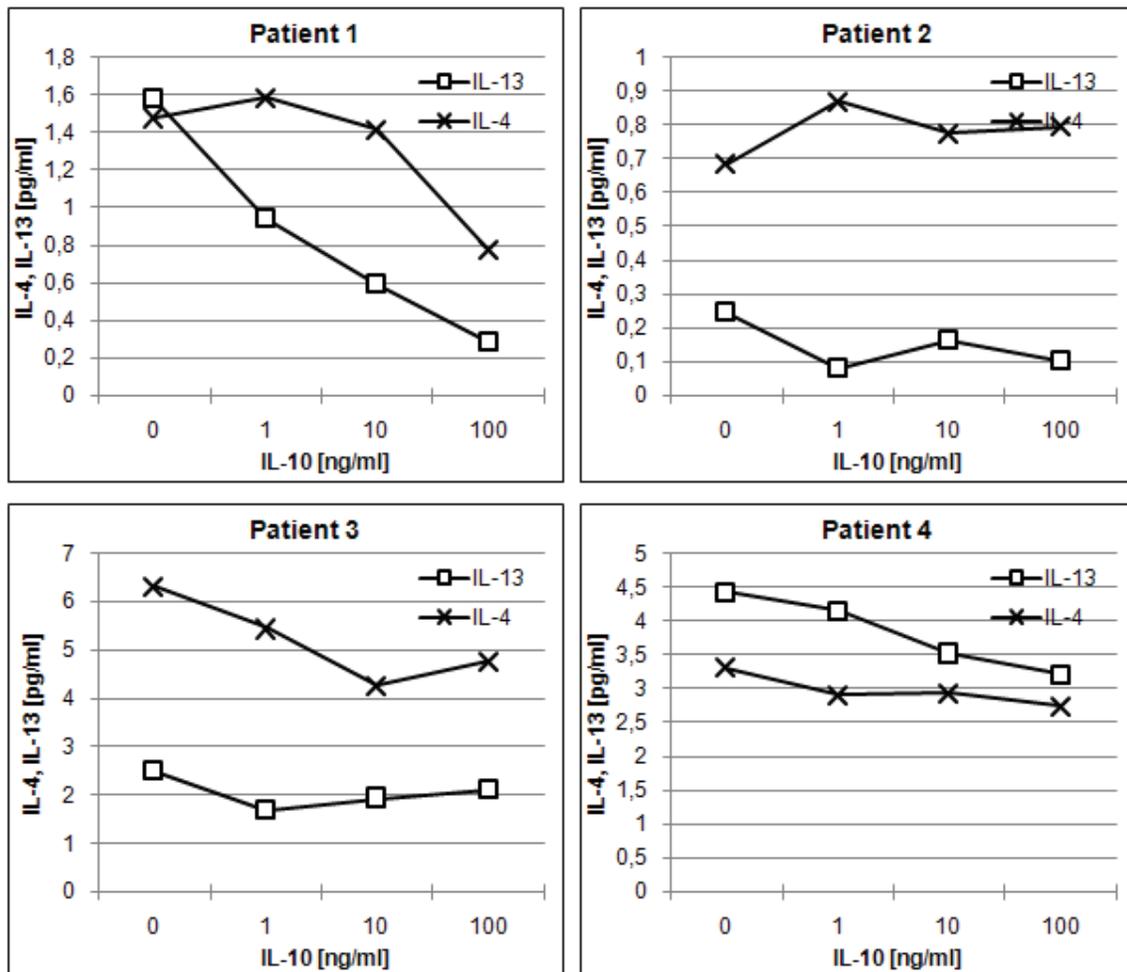
#### 4.4 Einzelfalldarstellung

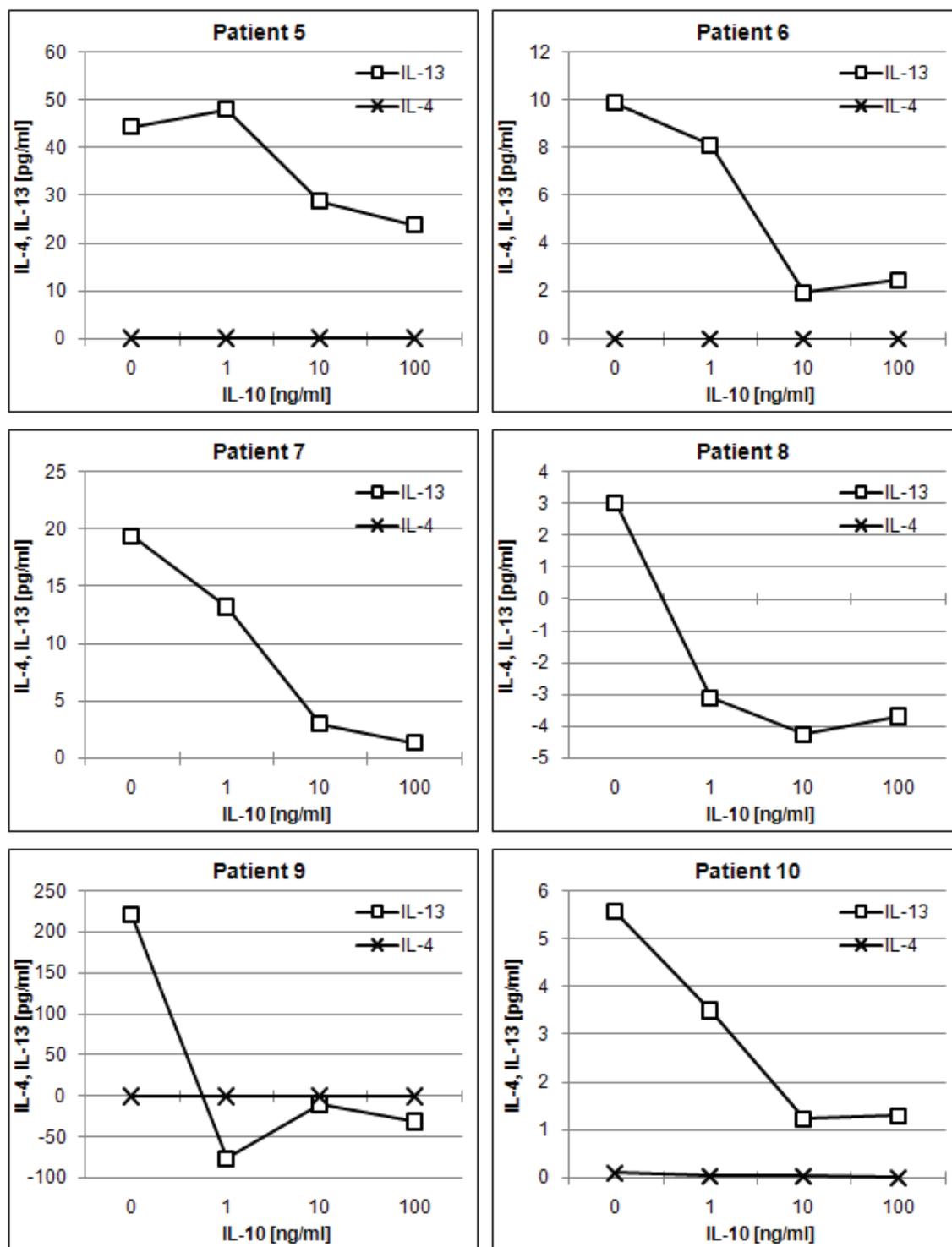
Im Folgenden werden die einzelnen Messreihen von IL-4 und IL-13 individuell für jeden Patienten graphisch dargestellt. Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse in zwei Gruppen gliedern:

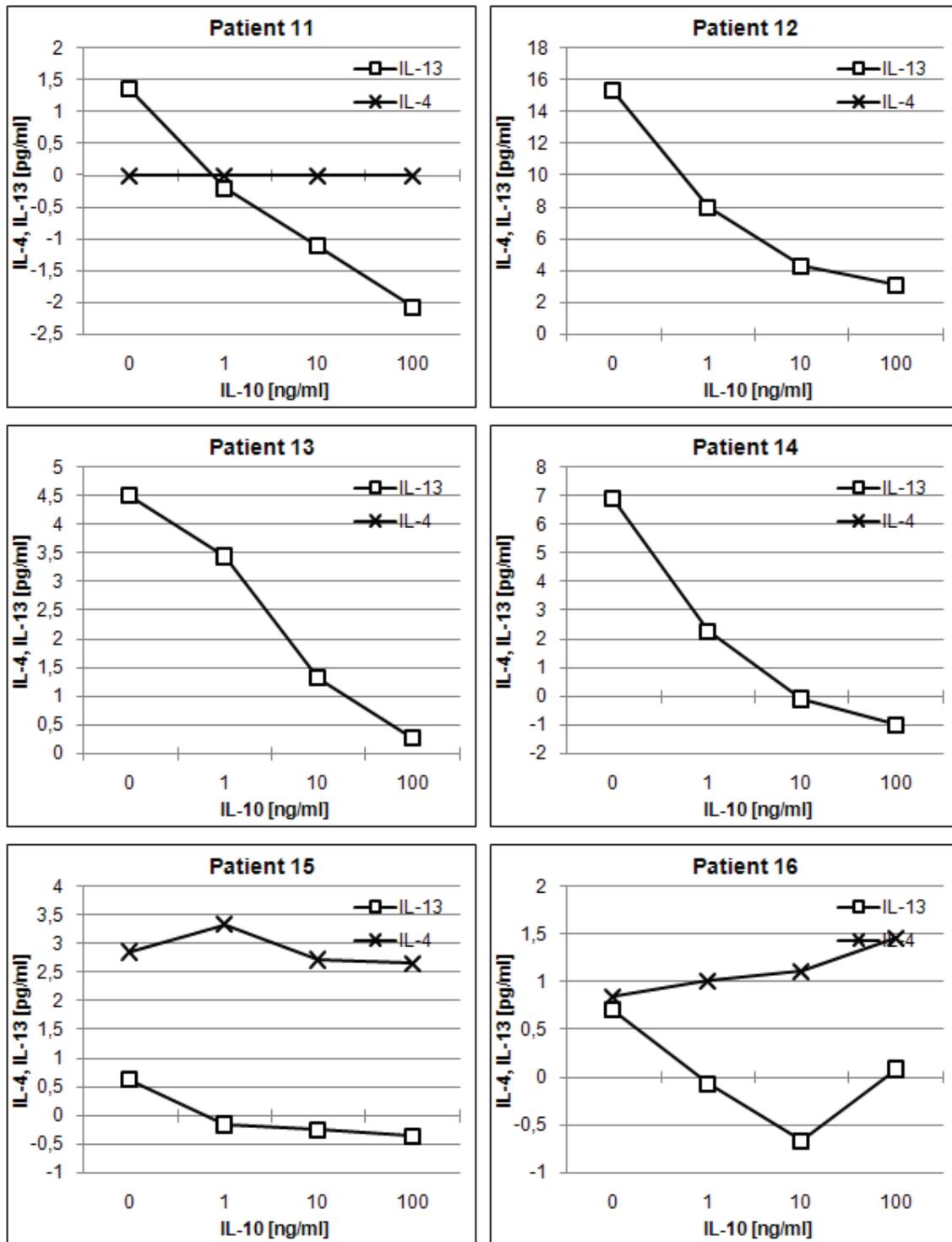
1. Es zeigt sich deutlich, dass die IL-13-Freisetzung bei allen Patienten mit steigender IL-10 Konzentration immer abnimmt. Dies bestätigt auf detaillierter Ebene noch einmal die zuvor nachgewiesene hemmende Wirkung von IL-10 auf IL-13.

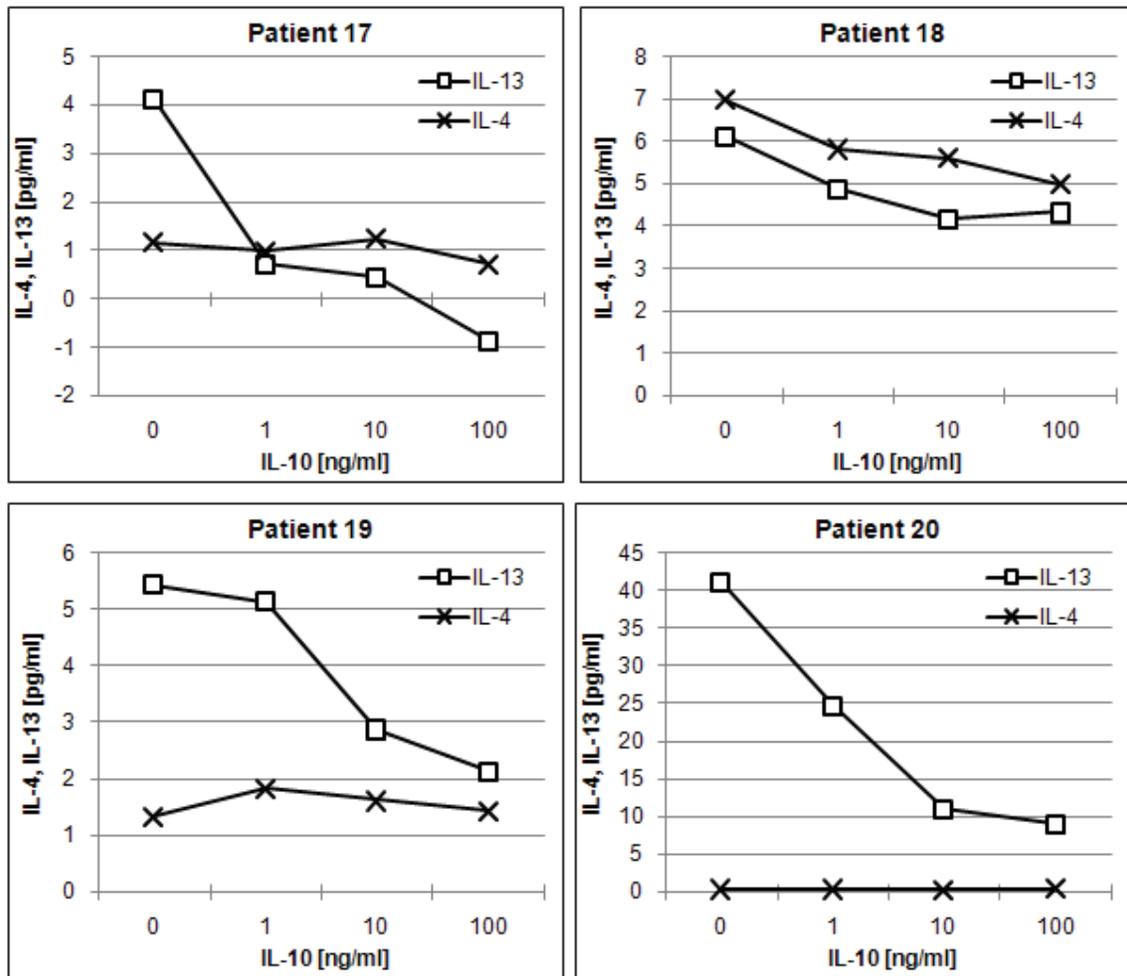
2. Die suppressierende Wirkung von IL-10 auf die IL-4-Freisetzung ist unterdessen nicht bei allen Patienten eindeutig. Das Patientenkollektiv kann hierbei in drei Gruppen unterteilt werden:

- Deutliche Supprimierung (Reduktion > 25%) der IL-4-Freisetzung (Patienten 1, 8, 10, 14, 17, 18)
- Geringe bis keine Supprimierung (Reduktion < 25%) der IL-4 Freisetzung (Patienten 3, 4, 9, 15)
- Erhöhte Freisetzung (Reduktion < 0%) von IL-4 (Patienten 2, 5, 16, 19, 20)









## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Zytokins IL-10 auf die In-vitro-Freisetzung der Interleukine IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten wespengiftallergischer Patienten beschrieben. Ziel der Untersuchungen war, die Zytokin-Sekretion basophiler Granulozyten nach Stimulation mit dem Allergen Wespengift und diversen IL-10-Konzentrationen zu charakterisieren.

Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die signifikante Reduktion der IL-4- und IL-13-Freisetzung aus basophilen Granulozyten auf den supprimierenden Einfluss von IL-10 zurückzuführen ist.

### 5.1 Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus T-Zellen während der spezifischen Immuntherapie

In der Literatur wurde bisher den T-Lymphozyten und der Freisetzung ihrer Zytokine IL-4 und IL-13 während der Immuntherapie besonderes Interesse gewidmet. Hierbei wurde die reduzierte Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus T-Lymphozyten nach spezifischer Immuntherapie mit Insektengift näher untersucht. So beschrieben Akdis und Blaser (5) nach 60 Tagen Immuntherapie mit Bienengift einen signifikanten Abfall von IL-4 und IL-13 in Kultur Phospholipase A2 (PLA) -spezifischer T-Zellen. Es konnte hierbei eine Suppression der spezifischen T-Zell-Proliferation festgestellt werden. Weiter beobachteten sie eine verminderte Sekretion der TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie der TH1-Zytokine IL-2 und INF- $\gamma$ . Ähnlich konnten auch Schuerwegh et al. (92) nach 5-tägiger Rush- Immuntherapie mit Wespengift einen signifikanten Rückgang der IL-4 produzierenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten feststellen. Jutel et al. (38) kamen nach 7-tägiger Ultra-Rush-Therapie zum selben Ergebnis. Somit ist die Suppression der TH2-Zytokine IL-4 und IL-13 für den Erfolg einer spezifischen Immuntherapie ausschlaggebend. Ursache dieser immunologischen Mechanismen waren ihrer Meinung nach eine ansteigende IL-10-Produktion aus T-Zellen und eine daraus resultierende Unterdrückung von Effektorzellen (4, 67). Die Frage, ob diese Beobachtungen jedoch auch für das Verhalten basophiler Granulozyten während der Immuntherapie gilt, blieb offen.

Es ist bekannt, dass bei allergischen Patienten die Konzentrationen der T-Zell-Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  während der spezifischen Immuntherapie innerhalb weniger Tage schnell ansteigen (3, 10, 54, 67). Wie schon in Kapitel 1.5 beschrieben, induziert IL-10 eine spezifische T-Zell-Anergie, die sich in einer verminderten T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion ausdrückt (3, 37). IL-10 stellt eines der entscheidenden regulativen Zytokine im Rahmen der Immuntherapie dar und wird als Inhibitor der allergischen Zytokinproduktion in TH2-Zellen verstanden. Nasser et al. (62) fanden eine vermehrte Expression von IL-10-mRNA sowie Reduktion der IL-4-mRNA in Hautbiopsien von Patienten während einer Immuntherapie mit Wespengift und ordneten IL-10 eine Schlüsselrolle in den Mechanismen der Immuntherapie zu.

In mehreren Studien wurde die immunologische Bedeutung der basophilen Granulozyten näher charakterisiert. So werden sie aufgrund ihrer Eigenschaften zu den Effektorzellen der TH-2-Antwort gezählt. Mehrere Forschungsgruppen beschrieben die Fähigkeit der Basophilen, durch ihre Zytokine einen Isotyp-Switch von IgM-Antikörpern zu IgE und IgG4 auslösen (22, 23, 73). Weiterhin fördert die Gegenwart von IL-4 in naiven T-Zellen, so genannten TH0-Zellen, die Differenzierung zu T-Helferzellen vom Typ 2 (1, 94). Da also IL-10 nachweislich in den zellulären Vorgängen der Immuntherapie eine zentrale regulierende Rolle spielt, scheint auch eine Hemmung der Zytokinfreisetzung aus basophilen Granulozyten wahrscheinlich.

## **5.2 Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten während der spezifischen Immuntherapie**

Bisher konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass nach Allergenstimulation peripherer Blutzellen nicht nur TH2-Zellen, sondern wohl hauptsächlich basophile Granulozyten für die Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-13 verantwortlich sind (42, 76, 86, 90). In einer Untersuchung von Kasaian et al. (42) wurde nach Entfernung der basophilen Granulozyten aus Zellsuspensionen eine Einstellung der IL-4-Produktion beschrieben. Ähnlich berichteten Plewako et al. (68), die ausschließlich an einer basophilen Zellkultur forschten, dass es am 3.Tag einer Rush-Immuntherapie mit Katzenhaaren sowie Gräserpollen

zu einer Suppression der allergeninduzierten IL-4- und IL-13-Freisetzung aus basophilen Granulozyten kam (68). Auch Mc Hugh et al. (54) sahen in einer ihrer Studien eine signifikante Verringerung der IL-4-Konzentration innerhalb der ersten 24 Stunden der Rush-Immuntherapie mit Bienengift. Diese Reduktion schrieben Mc Hugh et al. allerdings eher der „Herrunterregulierung“ der T-Zell-Antwort zu, als der verminderten Freisetzungsbereitschaft der basophilen Granulozyten. Weiterhin ist bekannt, dass die spezifische Immuntherapie mit Insektengift zu einer verminderten Mediatorfreisetzung durch Effektorzellen führt und somit direkten Einfluss auf diese zu besitzen scheint. So beschrieben Pierkes et al. (67) die Sekretion von Histamin und Sulfidoleukotrienen durch periphere Blutleukozyten bei Patienten mit Wespengiftallergie. Nach der Einleitungsphase der Hyposensibilisierung stellten sie bald eine reduzierte allergeninduzierte Freisetzung dieser Mediatoren fest. Sowohl Pierkes et al. (67) als auch Plewako et al. (68) fanden bereits in der Frühphase der Immuntherapie mit Wespengift eine verminderte Anzahl basophiler Granulozyten im Serum der allergischen Patienten. Dies könnte eine Ursache für den schnellen Schutz der Immuntherapie darstellen. Allerdings konnte nicht allein die Reduktion der Basophilen auf die verminderte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zurückgeführt werden, da die Produktion von Histamin und Sulfidoleukotrienen massiver sank, als dass dies durch den alleinigen Rückgang der Anzahl basophiler Granulozyten zu erklären wäre (67). Somit ist deutlich, dass ein bisher unbekannter Faktor der spezifischen Immuntherapie für die Suppression der Basophilen und Hemmung deren Zytokin-Freisetzung verantwortlich sein musste.

### **5.3 Der Einfluss von IL-10 auf die Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten**

Es ist somit durchweg zu vermuten, dass die Induktion der IL-10-Produktion nicht nur mit der allergenspezifischen Hemmung der T-Zell-Antwort eng verknüpft ist (10), sondern auch ähnlichen Einfluss auf basophile Granulozyten besitzen könnte. Wie die Graphiken der vorliegenden Arbeit zeigen, wurde nach Inkubation der peripheren Blutleukozyten mit der maximalen Dosis von 100 ng/ml IL-10 im Vergleich zum IL-10 freien Ansatz signifikant weniger IL-4 ( $p < 0,036$ ) und höchstsignifikant ( $p = 0,000$ ) weniger IL-13 freigesetzt. In den niedrigen IL-10-Konzentrationsstufen von 1 ng/ml und 10 ng/ml ließ sich im Vergleich zum

IL-10 freien Ansatz eine tendentielle Reduktion der IL-4-Freisetzung erkennen, wenn auch keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

Bei Betrachtung der IL-13-Freisetzung konnte unter Stimulation mit allen verwendeten IL-10-Konzentrationsstufen von 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml eine höchstsignifikante Reduktion ( $p = 0,000$ ) des Medians nachgewiesen werden. Somit zeigen die Ergebnisse eindeutig einen supprimierenden Effekt von IL-10 auf die Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-13 in basophilen Granulozyten.

Zu einem ähnlichen Resultat kamen Pierkes et al (67) in ihren Untersuchungen. Dort konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IL-10 einen wichtigen immunmodulatorischen Effekt auf Basophile zu besitzen scheint. In dieser Studie kam man zu dem Ergebnis, dass IL-10 zu einer signifikant geringeren allergeninduzierten Produktion von Histamin und Sulfidoleukotrienen aus peripheren Blutleukozyten führt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Entfernung der T-Zellen oder auch die Neutralisierung von IL-10 und IFN- $\gamma$  die Zytokinproduktion der basophilen Granulozyten wieder ansteigen ließ.

In Abbildung 2 und Abbildung 4 sieht man, dass interindividuell deutlich mehr IL-13 als IL-4 sezerniert wurde. Eine mögliche Erklärung lässt sich in früheren Untersuchungen finden. Hierbei scheint das Zytokin IL-3, das an der Synthese von IL-4 und IL-13 beteiligt ist, eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. Nach Ochsenberger (65), sowie Schroeder et al. (90) ist bekannt, dass die Expression der beiden Zytokine IL-4 und IL-13 IgE-abhängig ist. Dennoch sind basophile Granulozyten in der Lage, maßgeblich IL-13 auch nach IgE-unabhängiger ausschließlicher Stimulation mit IL-3 zu synthetisieren. Im Gegensatz zum synergistischen Effekt bei der IL-4-Produktion, addieren sich die Wirkung von IL-3 und einer IgE-vermittelten Stimulation bei der IL-13-Synthese. Auch andere Zytokine wie IL-5 und GM-CSF sind in der Lage die IgE-vermittelte Stimulation von IL-13 zu forcieren, wobei der Effekt dieser beiden Zytokine deutlich geringer ausgeprägt ist. Rademecker et al. (75) beschrieben den Einfluss dieser Zytokine auf die Freisetzungsbereitschaft basophiler Granulozyten. So fiel nach Vorinkubation der Leukozyten mit IL-3, GM-CSF oder IL-5 eine dosisabhängige Steigerung der allergeninduzierten Basophilen-Histaminfreisetzung auf. IL-3 gilt als wichtiger Proliferations- und Differenzierungsfaktor für basophile Granulozyten. Da in der vorliegenden Untersuchung IL-3 dem Nährmedium zugesetzt wurde, wäre dies als möglicher Grund für die höhere IL-13-Freisetzung denkbar.

Die erzielten Ergebnisse zeigen eine nicht nur große interindividuelle Variabilität der IL-4- und IL-13-Freisetzung, sondern auch eine offensichtlich stärkere Hemmung von IL-13 durch IL-10 als von IL-4. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben in allen drei IL-10-Konzentrationsstufen eine höchstsignifikante Supprimierung ( $p=0,000$ ) der IL-13-Freisetzung, die sich für IL-4 ausschließlich bei einem Konzentrationsniveau von 100 ng/ml IL-10 bestätigen ließ. Somit scheint IL-10 einen effektiveren Einfluss auf IL-13 als auf IL-4 zu besitzen. Da wie oben beschrieben IL-3 eine ausgeprägte und tiefgehende Wirkung auf die IL-13-Synthese hat, könnte dies auch für IL-10 gelten. Ein weiterer möglicher Auslöser der stärkeren Hemmung der IL-13-Freisetzung könnten die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Zytokine IL-4 und IL-13 darstellen. So ist die maximale freigesetzte IL-4-Konzentration aus basophilen Granulozyten bereits nach 4 Stunden (51, 86, 88, 89) Bebrütung erreicht, während das Maximum der IL-13-Sekretion erst nach 20 Stunden (46, 76) zu verzeichnen ist. Demnach könnte die 20stündige Inkubation von IL-13 mit dem Stimulus IL-10 auch mit einer stärkeren Inhibierung der Freisetzung einhergehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der allergeninduzierten Freisetzung von IL-4 und IL-13 und deren Supprimierung durch IL-10 gezeigt. Daher ist anzunehmen, dass durch die spezifische Immuntherapie nicht nur in der Frühphase die Mediatorfreisetzung aus Basophilen inhibiert wird, sondern dass basophile Granulozyten wichtige Zielzellen bei der „Herunter-Regulierung“ der TH2-Immunantwort darstellen.

## **5.4 Ausblick**

Die genauen molekularen Vorgänge der spezifischen Immuntherapie sind bis heute nicht hinreichend geklärt. Welchen Einfluss speziell basophile Granulozyten und ihre Zytokine auf den Mechanismus einer erfolgreichen Immuntherapie besitzen, wurde bis heute noch nicht eingehend genug untersucht. Jedoch rücken die Basophilen mit ihrem Zytokinprofil immer mehr in das Blickfeld immunologischer und allergologischer Forschung. Insbesondere stellt sich die Frage, inwieweit sich die IL-4- und IL-13-Freisetzung aus basophilen Granulozyten bei wespengiftallergischen Patienten nach eingeleiteter Immuntherapie verändern würde.

Auch würde die Einbeziehung weiterer Zytokine in die Untersuchungen zur Freisetzung von IL-4 und IL-13 in der Kurzzeit-Zellkultur vermutlich zu weiteren interessanten Erkenntnissen führen.

## 6 Zusammenfassung

Wespen Giftallergie ist eine klassische IgE-vermittelte allergische Sofortreaktion (Typ-I-Allergie). Die einzige kausale Therapieoption stellt die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Wespen Gift dar. Trotz zahlreicher Studien sind bis heute die molekularen Vorgänge, die für den Erfolg der Hyposensibilisierung verantwortlich sind, nicht vollständig geklärt. Neuere Untersuchungen zeigten, dass die spezifische Immuntherapie zu einem Anstieg der IL-10-Produktion aus T-Zellen und einer veränderten Freisetzung von Mediatoren, darunter IL-4 und IL-13, aus basophilen Granulozyten führt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Stimulus Wespen Gift und des Zytokins IL-10 auf die Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten bei Wespen Giftallergie zu untersuchen.

Für die Untersuchungen wurden periphere Blutleukozyten aus dem Serum von 20 Patienten gewonnen, die anaphylaktische Reaktionen auf einen Wespenstich gezeigt hatten und sich vor Einleitung der spezifischen Immuntherapie befanden. Hierbei wurden für die Analyse von IL-4 15 Patienten sowie für die von IL-13 20 Patienten aus dem Gesamtkollektiv herangezogen. Nach Aufbereitung der Zellen wurden diese in einem mit IL-3 angereicherten Nährmedium kultiviert. Die peripheren Leukozyten wurden entweder nur mit Wespen Gift oder mit einer Kombination aus Wespen Gift und unterschiedlichen IL-10-Verdünnungen in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml stimuliert. Anschließend wurden die Zellen 4 Stunden (IL-4) bzw. 20 Stunden (IL-13) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die in den Kulturüberständen freigesetzten Mediatoren wurden mittels eines IL-4- und IL-13-ELISA bestimmt. Für die statistische Analyse wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest für verbundene Stichproben verwendet. Für die Ermittlung des statistischen Zusammenhangs der Laborergebnisse mit den klinischen Charakteristika der Patienten wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Die Untersuchungen zeigten, dass basophile Granulozyten von Patienten mit Wespen Giftallergie IL-4 und IL-13 nach Stimulation mit dem Allergen produzieren. In den Kulturüberständen zeigten sich nach Inkubation mit Wespen Gift deutlich höhere Konzentrationen an IL-13 als an IL-4, der Median für IL-13 lag bei 7,010 pg/ml bzw. für IL-4 bei 1,359 pg/ml. Dies ist möglicherweise durch den Zusatz von IL-3 im Nährmedium zu

begründen, das als wichtiger Stimulus positiven Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und die Zytokinsekretion basophiler Granulozyten besitzt.

In allen Versuchsreihen führte IL-10 zu einer verminderten allergeninduzierten Freisetzung von IL-4. So konnte durch Stimulation mit den beiden niedrigeren IL-10-Konzentrationsstufen eine tendentielle Reduktion der Mediane der IL-4 Freisetzung gefunden werden (1,182 vs. 1,013 pg/ml bei 1 ng/ml IL-10 sowie von 1,182 vs. 1,111 pg/ml bei 10 ng/ml IL-10). Unter dem Einfluss von IL-10 in der höchsten Konzentration konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion des Medians der IL-4-Freisetzung nachgewiesen werden (1,182 vs. 0,796 pg/ml bei 100 ng/ml IL-10).

Noch deutlicher war der inhibierende Einfluss von IL-10 auf IL-13-Sekretion. So konnte der Median der allergeninduzierten IL-13-Freisetzung durch Stimulation mit allen verwendeten IL-10-Konzentrationen höchstsignifikant ( $p=0,000$ ) reduziert werden (4,962 pg/ml vs. 2,861 pg/ml bei 1 ng/ml IL-10, 4,962 pg/ml vs. 1,282 pg/ml bei 10 ng/ml IL-10 sowie 4,962 pg/ml vs. 0,798 pg/ml bei 100 ng/ml IL-10).

Die Korrelation der in dieser Arbeit gefundenen In-vitro-Ergebnisse mit demographischen und klinischen Daten der Patienten ergab keine signifikanten Zusammenhänge.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IL-10 eine verminderte allergeninduzierte Freisetzung der Zytokine IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten bewirkt. Es ist anzunehmen, dass basophile Granulozyten bei der spezifischen Immuntherapie durch IL-10 in ihrer Aktivität und somit Freisetzung von IL-4 und IL-13 gehemmt werden. Dies könnte für die längerfristige „Herunter-Regulierung“ der TH2-Antwort in Richtung eines „nicht-allergischen“ Milieus mitverantwortlich sein.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abehsira-Amar O, Gillbert M, *et al.* IL-4 plays a dominant role in the different development of TH0 into TH1 and TH2 cells. *J. Immunol.* 1992; 148:3820-3829
2. Akdis CA, Akdis M; Blesken T; Wymann D; Alkan SS, Müller U, Blaser K. Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:1676-1683
3. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 1998; 102:98-106
4. Akdis CA, Blaser K. IL-10 induced anergy in peripheral T-cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy: *FASEB J.* 1999,13: 603-609
5. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2000; 55:522-530
6. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59:897-913
7. Amsen D, Blander JM, Lee GR, *et al.* Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 2004; 117:515-526
8. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen und Medizinischen Fachgesellschaften, Leitlinien der Deutschen Gesellschaft Allergologie und klinische Immunologie. Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. *Allergo J* 2006; 15:56-74
9. Bascom R, Pipkorn U, *et al.* The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. *Am Rev. Respir. Dis.* 1988; 138:406-412
10. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol.* 1997, 27: 1131-1139

11. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunology* 2007; 120:707-713
12. Bousquet J, Braquemond P, Feinberg J, Guerin B, Maasch H, Michel FB. Specific IgE response before and after rush immunotherapy with a standardized allergen or allergoid in grass pollen allergy. *Ann Allergy* 1986; 56:456-9
13. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:558-562
14. Brehler R, Wolf H, Kutting B, Schnitker J, Ludger T. Safety of a twoday ultrarush insect venom immunotherapy protocol in comparison with protocols of longer duration and involving a larger number of injections. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1231-1235
15. Brunner T, Heusser CH, *et al.* Human peripheral blood basophils primed by IL-3 produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 1993; 177:605-611
16. Charlesworth EN, Hood AF, *et al.* Cutaneous late-phase response to allergen. Mediator release and inflammatory cell infiltration. *J. Clin. Invest.* 1989; 83:1519-1526
17. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237-1240
18. Chipps BE, Valentine MD, Kagey-Sobotka A, Schuberth KC, Lichtenstein LM. Diagnosis and treatment of anaphylactic reactions to Hymenoptera stings in children. *J Pediatr* 1980; 97:177-184 22
19. Costa JJ, Weller PF, Gall SJ. The cells of the allergic response. *JAMA* 1997; 278:1815-1822
20. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000; 165:4848-4853
21. Creticos PS, Adkinson NF Jr., Kagey-Sobotka A, *et al.* Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 1985; 76:2247-2253

22. Defrance T, Carayon P, *et al.* Interleukin-13 is a B cell stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1994; 179:135-143
23. De Vries JE, Zurawski G. Immunoregulatory properties of IL-13: Its potential role in atopic disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995; 106:175-179
24. De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, *et al.* Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. *J. Immunol* 1993; 151:6370-6381
25. Dvorak, AM, Saito H, *et al.* Ultrastructure of eosinophils and basophils stimulated to develop in coord blood mononuclear cell cultures containing recombinant human interleukin-5 or interleukin-3. *Lab. Invest.* 1989; 61:116-132
26. Evans R, Pence H, Kaplan H, Rocklin RE: The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hayfever. *J. Clin. Invest.* 1976; 57:1378-85
27. Gibbs B, Haas H *et al.* Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26:2493-2498
28. Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yuninger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:261-71
29. Guo C-B, Liu MC, *et al.* Identification of IgE-bearing cells in the late phase response to antigen in the lung as basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993; 10:384-390
30. Haeberli G, Brönnimann M, Hunziker T, Müller U. Elevated basal serum tryptase and Hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1216-1220
31. Hannaway PJ, Hoppler GDK. Severe anaphylaxis and drug induced beta-blockage. *N Engl J Med* 1983; 308:1536
32. Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L. *Immunologie.* Urban & Fischer Verlag, 1. Auflage 2006

33. Iliopoulos O, Baroody F, *et al.* Histamine containing cells obtained from nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. *J. Immunol.* 1992; 148:2223-2228
34. *Immunologie 2005*, Spektrum Verlag
35. Ingall M, Goldmann G, Page LB. Beta-blockade in stinging insect anaphylaxis. *JAMA* 1984; 251:1432
36. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Müller UR: Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of INF- $\gamma$  secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995; 154:4187-4194
37. Jutel M, Müller UR, Fricker M, Rhis S, Pichler WJ, Dahinden C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin.Exp Allergy* 1996; 26:112-118
38. Jutel M, Dahinden C, Pichler WJ, Müller UR. Untersuchungen zum Mechanismus der Ultra-Rush-Immuntherapie. *Allergo J* 1997, Vol 6, Suppl.1: 55-58
39. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc K, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF- $\beta$ -cooperate in regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33:1205-1214.
40. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Are regulatory T cells the target of venom immunotherapy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005; Vol 5(4):365-369
41. Kaplan AP, Anderson JA, Valentine MD, Lockey RF, Pierson WE, Zweiman B, Kaliner MA, Lichtenstein LM, Lieberman PL, Settipane GA, Sheffer AL, Yunginger JW. Beta-adrenergic blockers, immunotherapy and skin testing. Position statement. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84:129-130
42. Kasaian MT, Clay MJ, Happ MP, Garman RD, Shirish H, Luqman M. IL-4 production by allergen-stimulated primary cultures: identification of basophils as the major IL-4 producing cell type. *Int. Immunol.* 1996, 8: 1287-1297
43. King TP, Spangfort MD. Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:99-106

44. Kirshenbaum A, Goff J, *et al.* Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J. Immunol.* 1992; 148:772-777
45. Levings MK, San Gregorio R, Galbiati F, *et al.* IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunology* 2001; 166:5530-5539
46. Li H, Sim T, *et al.* IL-13 released by and localized in human basophils. *J. Immunol.* 1996; 156:4833-483
47. Lichtenstein LM, Norman P, *et al.* Clinical and in vitro studies on the role of immunotherapy in ragweed hay fever. *Am. J. Med.* 1968; 44:514-524
48. Lockey RF. "ARIA": global guidelines and new forms of allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:497-499
49. Ludolph- Hauser D, Ruëff F, Fries C, Schöpf P, Pryzbilla B. Constitutionally raised serum concentrations of mastcell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet* 2001; 357:361-362
50. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CI, Hammarstrom L, *et al.* Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur. J. Immunol* 1989; 19 :1311-1315
51. MacGlashan DW Jr., White JM, *et al.* Secretion of interleukin-4 from human basophils: The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J. Immunol.* 1994; 152:3006-3016
52. MacGlashan DW Jr., MacKenzie-White J, *et al.* In vitro regulation of FcεRIα expression on human basophils by IgE antibody. *Blood* 1998;91: 1633-1643
53. Marcotte GV, Braun CM, Norman PS, Nicodemus CF, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM. Effects of peptide therapy on ex vivo T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:506-13
54. McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW. 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. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:828-838

55. McKenzie ANJ, Culpepper JA, de Waal Malefyt R, *et al.* Interleukin-13, a novel T cell-derived cytokine that regulates monocyte and B cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90:3735-3739
56. Meiler F, Zimmermann M., Akdis CA, Akdis M. Regulatorische T-Zellen in der normalen Immunantwort und in der allergenspezifischen Immuntherapie. *Allergologie* 2005; 6:230-237
57. Mosbech H, Malling H-J, Biering I, Bøwadt H, Søborg M, Weeke B, *et al.* Immunotherapy with yellow jacket venom. *Allergy* 1986; 41:95-103
58. Müller UR. Insektenstichallergie. Klinik, Diagnostik und Therapie. Stuttgart: G. Fischer, 1988
59. Müller U, Helbing A, Berchtold, E. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:529-535
60. Müller U, Mosbech H (eds) Positions paper 1993: Immunotherapy with Hymenoptera venoms. *Allergy* 48 ( Suppl 14):37-46
61. Müller UR. Kardiovaskuläre Erkrankungen und Insektengiftallergie. *Allergo J* 2005; 14:569-574
62. Nasser SMS, Ying S, Meng Q, Kay AB, Ewan PW. Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 3704-3713
63. Nataf P, Guinépain MT, Herman D. Rush venom immunotherapy: a 3- day programme for hymenoptera sting allergy. *Clin Allergy* 1984; 14:269-275
64. Nusslein HG, Winter M, Trag T, Kalden JR. Interleukin-4-induced IgG subclass and IgE secretion by mononuclear cells from atopic donors. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1991; 95:257-260
65. Ochsenberger B, Daepf G-C, *et al.* Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and independent activation. *Blood* 1996; 88:3028-3037

66. Oelkers W. Systemische Reaktionen auf Wespenstiche bei Patienten unter ACE-Hemmer-Therapie. *Arzneimittelbrief* 1994; 28:39-40
67. Pierkes M, Bellinghausen I, Hultsch T, Metz G, Knop J, Saloga J. Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN- $\gamma$  production of T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; Vol 103:326-332
68. Plewako H, Wosinska K, Arvidsson M, Björkander J, Stahl Skov P, Håkansson L, Rak S. Basophil Interleukin 4 and Interleukin 13 Production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2006, 141:346-353
69. Przybilla B, Ring J, Griebhammer B, Braun-Falco O. Schnellhyposensibilisierung mit Hymenopteregiften. Verträglichkeit und Therapieerfolg. *Dtsch Med Wochenschr* 1987; 112:416-426
70. Przybilla B, Ruëff F. Insektengiftallergie. Urban & Fischer Verlag, ZaeFQ 2003; 97:461-465
71. Przybilla B, Ruëff F., Fuchs T, Pfeiffer C., Rakoski J., Stolz W., Vieluf D. Insektengiftallergie. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie 2003. *Allergo J* 2004; 13:186-190
72. Przybilla B, Müller U, Jarisch R, Ruëff F. Erhöhte basale Serumtryptasekonzentration oder Mastozytose als Risikofaktor der Hymenopteregiftenallergie. Leitlinie der DGAI. *Allergo J* 2004; 13:440-442
73. Punnonen J, Aversa G. Interleukin-13 induces interleukin-4 independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:3730-3734
74. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, de Vries JE. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* 1994; 49:576-586
75. Radermecker M, Louis R, Leclercq M, Weber T, Corhay JL, Bury T. Cytokine modulation of basophil histamine release in wasp-venom allergy. *Allergy* 1994, 49: 641-644.

76. Redrup A, Howard B, *et al.* Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by human basophils: Their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures. *J. Immunol.* 1998; 160:1957-1964
77. Ring J, Messmer K (1977) Incidence and severity of anaphylactic reactions to colloid volume substitutes. *Lancet* I:466-469
78. Ring J. *Angewandte Allergologie.* Urban & Vogel Medien und Medizin, 3.Auflage 2004
79. Rocklin RE, Sheffer A, Greineder DK, Melmon KL. Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitisation. *N Engl J Med* 1980; 302:1213-1219
80. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113:395-400
81. Ruëff F, Pryzbilla B, Müller U, Mosbech H. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. Position paper of the Subcommittee on Insect Venom Allergy of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1996; 51:216-225
82. Ruëff F, Pryzbilla B, Fuchs T, Gall H, Rakoski J, Stolz W, Vieluf D. Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie. *Allergo J* 2000; 9:458-472
83. Ruëff F, Ludolph- Hauser D, Pryzbilla B. Erhöhte basale Serumtryptase als Risikofaktor der Insektengiftallergie. *Allergo J* 2003; 12:32-38
84. Rzany B, Pryzbilla B, Jarisch R, *et al.* Clinical characteristics of immunotherapy with Hymenoptera venoms. A retrospective study. *Allergy* 1991;46:251-254
85. Saloga J, Bellinghausen I, Pierkes M, Knop J. Mechanismen der Insektengifthyposensibilisierung. *Allergologie* 1999, 22; Suppl.2: 69-69
86. Schroeder JT, MacGlashan DW Jr., *et al.* IgE-dependent IL-4 secretion by human basophils: The relationship between cytokine production and histamine release in mixed leukocyte cultures. *J Immunol.* 1994; 153:1808-1818
87. Schroeder J, Kagey-Sobotka A, *et al.* The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* 1995; 50:463-472

88. Schroeder JT, Howard B, *et al.* IL-4 secretion and histamine release by human basophils are differentially regulated by protein kinase C activation. *J. Leukocyte Biol.* 1998; 63:692-698
89. Schroeder JT, MacGlashan Jr. DW, *et al.* The role of basophil-cytokine networks in asthma. In "Asthma and Allergic Diseases: Physiology, Immunopharmacology, and Treatment" (G. Marone, K.F. Austen, S.T. Holgate, A.B. Kay, and L.M. Lichtenstein, eds.). 1998; 75-84, Academic Press, San Diego
90. Schroeder JT, MacGlashan Jr. DW, Lichtenstein LM. Mechanisms and pharmacologic control of basophil-derived IL-4 and IL-13. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999, 118: 87-89
91. Schroeder JT, MacGlashan Jr. DW, Lichtenstein LM. Human Basophils: Mediator Release and Cytokine Production. *Advances In Immunology* 2001; Vol.77:93-122
92. Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Wasp venom immunotherapy induces a shift from IL-4-producing towards interferon-gamma-producing CD4+ and CD8+ T-lymphocytes. *Clin Exp. Allergy* 2001; 31:740-746
93. Sturm G, Kranke B, Rudolph C, Aberer W. Rush Hymenoptera venom immunotherapy: a safe and practical protocol for high-risk patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:928-933
94. Swain S, Weinberg A, *et al.* IL-4 directs the development of TH2-like helper effectors. *J. Immunol.* 1990; 145:3796-3806
95. Schwartz RJ, Sutheimer C, Gauerke MB, Zora JA, Yunginger JW. Venom-specific IgE antibodies in postmortem sera from victims of sudden, unexpected death. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 83:189
96. Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-1034
97. Todesursachenstatistik in Deutschland. Statistisches Bundesamt 2000/1999/1998
98. Tunon-de-Lara JM, Villanueva P, Marcos M, Taytard A. ACE inhibitors and anaphylactoid reactions during venom immunotherapy. *Lancet* 1992; 340:908

99. Valentine MD, Schuberth KG, Kagey-Sobotka A, Graft DF, Kwiterovich KA, Szklo M, Lichtenstein LM. The value of immunotherapy with venom in children with allergy to insect stings. *N Engl J Med* 1990, 323:1601-1603
100. Van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, et al. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* 1999; 163:2944-2952
101. Vercelli D, Geha R. Regulation of IgE synthesis: From the membrane to the genes. *Springer Semin. Immunopathol.* 1993; 15:5-16
102. Wenzel J., Meissner-Kraemer, Bauer R., Bieber T., Gerdson R. Safety of rush insect venom immunotherapy. The results of a retrospective study in 178 patients. *Allergy* 2003; 58:1176-1179

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ACE-Hemmer	„Angiotensin Converting Enzyme“-Hemmer
CAP	„Carrier-Polymer-System“
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
et al.	et altera
FEIA	„Flouoro-Enzyme-Immuno-Assay“
G	Gräserpollen
GM-CSF	„Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor“
HRP	„Horse Radish Peroxidase“
HSA	Humanes Serum Albumin
HSM	Hausstaubmilbe
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
K	Katzenhaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
m	Männlich
min	Minute
mRNA	„Messenger“ RNA
MZT	Mastzelltryptase
n	Anzahl

NL	Naturgummilatex
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
PLA	Phospholipase A2
SIT	Spezifische Immuntherapie
SVP	Standard-Verdünnungspuffer
TMB	Tetramethylbenzidin
TGF- $\beta$	„Transforming growth factor“- $\beta$
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- $\beta$	Tumornekrosefaktor- $\beta$
Treg-Zelle	T-regulatorische Zelle
U	Umdrehung
vs.	Versus
w	Weiblich

## 9 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka und seinem Vorgänger Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig danke ich für die Möglichkeit zur Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Bernhard Przybilla für die Überlassung des Themas und seine stets freundliche, richtungweisende Beratung zum Entstehen der Arbeit.

Für die ausdauernde Betreuung sowie Anleitung zu den laborchemischen Methoden danke ich herzlich Frau Dr. med. Carolyn Krieg.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dipl. Wi.-Ing. Philipp Rappold des Institutes für Unternehmensführung der Universität Karlsruhe (TH) für die unermüdliche Unterstützung bei der Verarbeitung der statistischen Daten.

Weiter danke ich Frau Dr. rer. nat. Nikola Schmidt für das Lektorat meiner Dissertation.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Sonja Gassner, Frau Gabriele Weimer und Frau Anikca Versec, die mir bei meiner Laborarbeit jederzeit äußerst liebenswürdig und aufmunternd zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich in großer Dankbarkeit an den viel zu früh verstorbenen Prof. Dr. med. Michael Dorn erinnern, der mir seit Kindertagen ein väterlicher Freund war und mein Interesse und meine Freude an der Dermatologie weckte.

## 10 Lebenslauf

Name:	Johanna-Julia Walter
Geburtstag:	25.02.1980
Geburtsort:	München
Eltern:	Dr. med. Georg O. Walter, Facharzt für Chirurgie und Gefäßchirurgie Diana Vorbeck-Walter, Apothekerin
Ausbildung:	
1986-1990	Grundschule am Dom-Pedro-Platz, München
1990-1994	Wittelsbacher Gymnasium, München
1994-2000	Derksen Gymnasium, München
Juni 2000	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
August 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2006	Erstes Tertial des Praktischen Jahres in der Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, München
August 2006	Zweites Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin, Klinikum Dritter Orden, München-Nymphenburg
Dezember 2006	Drittes Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie, Klinikum Schwabing, München
Mai 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Juli 2007	Assistenzärztin an der Klinik für Innere Medizin II, Klinikum Dritter Orden, München-Nymphenburg