

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French

Optimierungen der Diagnostik und Therapie der Insektengiftallergie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eva Kristin Stretz

aus
Erlangen
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin:	Prof. Dr. med. Franziska Ruëff
Mitberichterstatler:	Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl Prof. Dr. Markus Ege
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	25.07.2019

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
„Optimierungen der Diagnostik und Therapie der Insektengiftallergie“
selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, den 12.12.2018

Eva Kristin Stretz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Klinische Reaktion und Pathophysiologie eines Insektenstichs	8
1.2. Diagnostik der Hymenopteringiftallergie	9
1.3. Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift	9
1.4. Notwendigkeit rekombinant hergestellter Einzelallergene	10
1.5. Therapie der Insektengiftallergie	12
1.6. Anti-IgE- Anwendung in der Therapie der Insektengiftallergie	13
1.7. Einflussfaktoren der erfolgreichen Hyposensibilisierung	15
2. Zusammenfassung	18
3. Summary	20
4. Originalarbeiten	22
5. Literaturverzeichnis	23
6. Danksagung	26

Abkürzungsverzeichnis

SAR	systemische allergische Reaktion
sIgE-AK	spezifische IgE-Antikörper
sIgE	spezifisches IgE
bST	basale Serumtryptase
CCD	cross-reactive carbohydrates/ kreuz-reagierende Kohlenhydratepitope
SIT	spezifische Immuntherapie

Publikationsliste

Stretz E, Oppel E, Rawer H, Chatelain R, Mastnik S, Przybilla B, Rueff F.
Overcoming severe adverse reactions to venom immunotherapy by using anti-IgE
antibodies in combination with a high maintenance dose.
Clin Exp Allergy 2017;47(12):1631-1639.

Rueff F, Vos B, Oude Elberink J, Bender A, Chatelain R, Dugas-Breit S, Horny HP,
Kuchenhoff H, Linhardt A, Mastnik S, Sotlar K, Stretz E, Vollrath R, Przybilla B, Flaig M.
Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy.
Clin Exp Allergy 2014;44(5):736-46.

Vos B, Köhler J, Müller S, Stretz E, Rueff F, Jakob T.
Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with
allergy to vespula venom.
J Allergy Clin Immunol 2013 Apr;131(4):1225-1227.

1. Einleitung

1.1. Klinische Reaktion und Pathophysiologie eines Insektenstichs

Klinische Reaktionen auf einen Insektenstich werden in Lokalreaktion sowie systemische allergische Reaktion (SAR) eingeteilt. Während die Lokalreaktion mit einer Schwellung der Einstichstelle auf die Haut beschränkt ist, können bei der SAR neben der Haut der Gastrointestinaltrakt wie auch das respiratorische und kardiovaskuläre System betroffen sein. Es ist davon auszugehen, dass eine sehr schnell auftretende Reaktion besonders gravierend ausfällt [1,8].

Einer anaphylaktischen Reaktion liegt die Bindung des Allergens an den spezifischen IgE-Antikörper (sIgE-AK) zu Grunde. Dieser Allergen-Antikörper-Komplex dockt an zwei oder mehreren hochaffinen FcεRI Rezeptoren an. Diese Vernetzung führt zur Akkumulation der FcεRI Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und von Basophilen, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird, welche schließlich zur Degranulierung der Mastzellen führt. Mit der Degranulierung werden präformierte Mediatoren, Zytokine und Enzyme freigesetzt, darunter Histamin, Tryptase sowie der Tumor-Nekrose-Faktor α. Die Mediatoren wirken direkt auf verschiedene Gewebearten und aktivieren weitere, zusätzlich inflammatorisch wirkende Zellen, die die Pathophysiologie der anaphylaktischen Reaktion verstärken [2,8,19,20]. Histamin steigert die Vasodilatation und Gefäßpermeabilität. Herzfrequenz und kardiale Kontraktion nehmen zu. Es kommt zur gesteigerten Drüsensekretion. Prostaglandin D2 steigert die periphere Vasodilatation, jedoch auch gleichzeitig pulmonale, koronare und Bronchokonstriktion. Weiter werden im Rahmen der Mastzellenaktivierung mehrere Mediatoren neu synthetisiert.

Das klinische Erscheinungsbild der resultierenden SAR kann vielfältig ausfallen [2,8,20,21]. Als Risikofaktoren einer schweren Reaktion gelten vergangene schwere Stichreaktionen, höheres Alter, eine erhöhte basale Serumtryptase (bST; $\geq 11,4\mu\text{g/l}$), welche mit den vorhergehenden Stichereignissen positiv korreliert, sowie Erkrankungen der Atemwege und des Herz-Kreislaufsystems. Der Stich einer Wespe gilt als riskanter als der einer Biene. Patienten unter Medikation von ACE-Hemmern gelten vermutlich aufgrund der Interaktion mit der Kininase ebenfalls als besonders gefährdet [13,14,16]. Das Krankheitsbild der Mastozytose muss als weiterer entscheidender Risikofaktor genannt werden. Sie zählt zu den myeloproliferativen Neoplasien des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes und ist durch atypische Proliferation und Akkumulation von abnormen Mastzellen in verschiedenen Gewebearten, vorwiegend der Haut und dem Knochenmark gekennzeichnet [13,23]. Durch eine hohe Prävalenz von Mastzellen und durch die massiv gesteigerte Mediatorfreisetzung kann es bei diesen Patienten zu besonders gravierenden SAR kommen [15,21,22,24].

Da mit der Insektengift-Hyposensibilisierung (syn. spezifische Immuntherapie; SIT) eine sehr sichere und wirksame Therapie zur Verfügung steht, ist eine korrekte Diagnose mit der Festlegung auf das Krankheits-ursächliche Gift sehr wichtig.

1.2. Diagnostik der Hymenopterenengiftallergie

Hauttestung

Zunächst wird der Pricktest mit einer Anfangskonzentration von 1,0µg Insektengift/ml auf der Innenseite des Unterarms durchgeführt. Nach 15 Minuten Wartezeit wird das Ergebnis abgelesen. Sollte keine Reaktion aufgetreten sein, wird die Dosis erst auf 10µg/ml und dann nach gleicher Wartezeit auf 100µg/ml gesteigert, bis ein ablesbares Ergebnis vorliegt. Sollte sich keine Reaktion zeigen, wird ein Intradermaltest angewandt [4,25,26,27].

In-vitro-Testung

SIgE-AK gegen Bienen- und Wespengesamtgiftextrakt können mit automatisierten Sandwich-ELISAs (enzyme linked immunoabsorbent assays) bestimmt werden. In der allergologischen Ambulanz der LMU wird hierfür das Gerät ImmunoCAP mit Bienen-Immuno CAP i1 sowie Wespen-Immuno CAP i3 (Thermo Fisher Scientific) verwendet [7]. Die Sensitivität der In-vitro-Verfahren wird für Bienengesamtgift mit 98–100%, für Wespengesamtgift zwischen 83% und 93% angegeben [25]. Falls mit Standardmethoden keine Sensibilisierung nachweisbar ist, kann diese durch Anwendung von zellulären Stimulationstests (Basophilenaktivierungs-, Leukotrienfreisetzungs-, Histaminfreisetzungstest) festgestellt werden [25,26,28].

Ergänzend sollte die Tryptase erfasst werden. Gegenüber einem bST-Wert von 4,25µg/l ist bei einer hochnormwertigen Konzentration von 11,4µg/l die Gefahr einer gravierenden Anaphylaxie auf einen Insektenstich bereits verdoppelt [16].

1.3. Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift

Proteine, Peptide, biogene Amine und niedermolekulare Stoffe bilden die Gruppe der Allergene. Peptide und Phospholipasen besitzen zyto- sowie neurotoxische Wirkung, Hyaluronidasen und biogene Amine können das Gift weiter im Körper verteilen [3,4]. Als Majorallergen gilt ein Allergen, welches bei mindestens 50% der als allergisch diagnostizierten Patienten eine Reaktion mit dem IgE-Molekül bei einem Stich des verursachenden Insekts hervorruft [3].

Allergen	Biochemische Bezeichnung	Major	Sequenzhomologie mit weiterem Allergen (%)	MW kDa
Biene				
Api m1	Phospholipase A ₂	Major	Ves v1	17
Api m2	Hyaluronidase	Major	Ves v2 40,6- 51,9%	45
Api m3	Saure Phosphatase	Major	Api m10, Ves v5	49
Api m4	Melittin			3
Api m5	Dipeptidylpeptidase	Major	Ves v3 54,1%	100
Api m6	Proteaseinhibitor			8
Api m7	CUB Serinprotease			39
Api m8	Carboxylesterase			70
Api m9	Carboxypeptidase			60
Api m10	Icarpin	Major	Api m3, Ves v5	55
Api m11.0101	MRJP 8			65
Api m11.0201	MRJP 9			60
Api m12	Vitellogenin		Ves v6 39,9%	200
Wespe				
Ves v1	Phospholipase A1	Major		35
Ves v2	Hyaluronidase		Api m2 40,6- 51,9%	45
Ves v3	Dipeptidylpeptidase IV		Api m5 54,1%	100
Ves v5	Antigen 5	Major	Api m3, Api m10	25
Ves v6	Vitellogenin		Api m12 39,9%	200

Tab.1. Allergene des Bienen- und Wespengifts (EA= Einzelallergen; MW= Molekulargewicht; kDa= Kilodalton) [5,16,25,35,36]

1.4. Notwendigkeit rekombinant hergestellter Insektengiftallergene

Bei 45–50% der Patienten ist serologisch eine Sensibilisierung auf beide Insektengifte nachweisbar. Dafür kann es unterschiedliche Gründe geben. Zunächst eine echte Doppelsensibilisierung, die dann vorliegt, wenn sIgE-AK gegen Bienen- und Wespengift gebildet worden sind, nachdem der Patient tatsächlich von beiden Insekten gestochen worden ist. Des Weiteren kann eine Kreuzreaktion auf in beiden Insektengiften vorkommende, verwandte Allergene (Hyaluronidase / Dipeptidylpeptidase / Vitellogenin) vorliegen. Die Sequenzen der Hyaluronidasen (Api m2 der Biene, Ves v2 der Wespe) gelten zu circa 40-50% als homolog (s.Tab.1). Letztlich, und dies trifft in den meisten Fällen zu, können kreuzreaktive Kohlenhydratepitope (engl.: cross reactive carbohydrates; CCDs) dafür verantwortlich sein, dass es zu einem doppelt positiven Ergebnis kommt. Hier findet eine Kreuzreaktion von sIgE-AK auf Zuckerepitope der glykosilierten Allergene statt. CCDs sind in pflanzlichen Nahrungsmitteln und Pollen weit verbreitet, kommen jedoch nicht in Säugetieren vor [3,4,5,16,25]. Personen mit atopischer Veranlagung und Sensibilisierung gegen CCDs reagieren bei In-vitro-Untersuchungen oft mit zahlreichen CCD-haltigen Allergenen, ohne dass dieser Sensibilisierung irgendeine klinische Relevanz zukommt.

Durch Verwendung rekombinant hergestellter nicht glykosilierter Einzelallergene, wie den Majorallergenen rVes v1 und rVes v5 der Wespe wie auch rApi m1 der Biene konnte die Diagnostik verbessert werden [16,29]. Die rekombinant hergestellten CCD- freien Allergene bieten die Möglichkeit, falsch positive Ergebnisse auszuschließen, die auf der Reaktivität der sIgE-AK mit CCDs basieren [16]. Für die Diagnostik der Wespengiftallergie wird bei Verwendung beider Einzelallergene rVes v1 (i211) und rVes v5 (i209) in Kombination die Sensitivität mit 92–96% beschrieben [17].

Durch routinemäßigen Einsatz der rekombinant hergestellten Wespengiftallergene konnte festgestellt werden, dass in einigen Fällen eine höhere IgE-Reaktivität auf das Einzelallergen rVes v5 im Vergleich zu dem Gesamtgift i3 detektierbar war. Zusätzlich war bei anderen Patienten spezifisches IgE (sIgE) lediglich auf rVes v5, aber nicht auf Gesamtgift i3 nachweisbar. Daher wurde vermutet, dass das Einzelallergen rVes v5 im Gesamtgift i3 möglicherweise unterrepräsentiert war [17].

Rückstellseren von 308 Patienten wurden unter eigener Beteiligung in den Allergiezentren der Universitätskliniken München und Freiburg näher untersucht. Gegen eine retrospektive Auswertung von Daten werden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU München keine Einwände erhoben, sofern der Datenschutz beachtet wird.

Bei allen Patienten wurde basierend auf Stichanamnese, Hauttestung und In-vitro-Verfahren die Diagnose einer Wespengiftallergie gestellt. Bei 235 Patienten basierte die Diagnosestellung auf zurückliegenden Stichereignissen, positivem Hauttestergebnis und nachweisbarem sIgE auf das Gesamtgift i3. 22 Patienten hatten sowohl eine positive Stichanamnese und nachweisbares sIgE (Hauttest nicht durchgeführt/ negativ ausgefallen); bei 47 Patienten lagen positive Anamnese sowie Hauttestergebnisse vor, aber keine Sensibilisierung im Serum. In einem Fall (kein Sensibilisierungsnachweis im Hauttest oder in der Serologie) wurde die Sensibilisierung mittels Anamnese und Basophilen-Aktivierungs-Test festgestellt. Bei drei Patienten basierte die Diagnostik alleine auf positiver Stichanamnese. In 122 Fällen lag eine Doppelsensibilisierung gegen beide Gifte vor, die übrigen Patienten waren nur gegen die Wespe sensibilisiert.

Bei der Kohorte (n=308) wurde nun die Reaktion des sIgEs auf das Gesamtgift i3, die rekombinanten Allergene rVes v1 (i211), rVes v5 (i209) und zusätzlich auf ein neu entwickeltes „gespiktes“, d.h. mit rVes v5 angereichertes Gesamtgift untersucht. Eine Sensibilisierung auf das konventionelle Gesamtgift i3 lag bei 83,4% der Patienten vor. 44,2% waren gegen rVes v1, 89,9% gegen rVes v5 sensibilisiert und bei 96,1% der Patienten konnte entweder eine Sensibilisierung auf rVes v1, rVes v5 oder auf beide Allergene nachgewiesen werden. Nur ein Patient reagierte positiv auf das Einzelgift rVes v1 ohne gleichzeitigen Nachweis einer Sensibilisierung auf das Gesamtgift i3. 84,4% der

Patienten waren jedoch nachweislich gegen rVes v5 und i3 sensibilisiert.

Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass sich ein großer Anteil der IgE-Reaktivität nicht gegen rVes v1 richtet. Andererseits konnte spezifisches IgE gegen rVes v5 häufiger als gegen das Gesamtgift i3 nachgewiesen werden. Mit dem routinemäßigen Einsatz des gespikten Gesamtgifts sollte nun anschließend überprüft werden, ob die Detektion einer Sensibilisierung gegen Wespengift durch dessen Verwendung erhöht werden kann. Die Seren, die bereits eine Sensibilisierung gegen rVes v5 vorwiesen, zeigten bei Verwendung des gespikten Gesamtgifts eine erhöhte Reaktivität. Patienten ohne Sensibilisierungsnachweis gegen rVes v5 zeigten auch keine geänderte Reaktion auf das gespikte Gesamtgift. Vergleicht man die Gesamtgifte, so konnte durch Nutzung des gespikten CAPs in 298 Fällen eine Sensibilisierung nachgewiesen werden, bei herkömmlichem Gift i3 in 257 Fällen. Somit ergibt sich eine Sensitivitätssteigerung von 83,4 auf 96,8% [17]. Auch war die Konzentration der sIgE-AK gegen den Bestandteil rVes v5 insgesamt höher als gegen das Gesamtwespengift. Bei 301 der 308 Patienten wurde zusätzlich ein Hauttest durchgeführt. Wurden Intrakutan- und Pricktest kombiniert, so konnte bei 93,7% der Fälle eine Sensibilisierung nachgewiesen werden. Bei 19 Patienten fiel der Hauttest negativ aus. In 18 dieser 19 Fälle konnte sIgE im gespikten Immuno CAP detektiert werden. Durch Anwendung von Hauttest und Serologie mittels rVes v5 gespiktem ImmunoCAP beläuft sich hiermit die Detektierbarkeit einer Sensibilisierung auf Wespengift auf 99,7% (300 der 301 Patienten, bei welchen ein Hauttest Verwendung fand) [17].

1.5. Therapie der Insektengiftallergie

Nach abgeschlossener Diagnostik ist die spezifische Immuntherapie (SIT) indiziert, und zwar sowohl ab einer SAR vom Schweregrad II (leichte Systemreaktion) wie auch bei einer Reaktion vom Schweregrad I (auf das Hauptorgan beschränkte systemische Reaktion), die mit Risikofaktoren einhergeht und/oder bei herabgesetzter Lebensqualität; weiter ist ein Sensibilisierungsnachweis gegen das relevante Insektengift (nachgewiesen im Hauttest oder serologisch) erforderlich [32].

Sollte eine Allergie gegen Biene und Wespe bestätigt sein, dann sollte die SIT mit beiden Giften durchgeführt werden [4]. Die Einnahme von ACE-Hemmern und β -Blockern gilt als Risiko-erhöhend während einer SIT, ist aber nicht als absolute Kontraindikation zu sehen. Zudem gelten beispielsweise schwere Autoimmunerkrankungen und maligne Neoplasien als relative Kontraindikationen [6,32]. Die Einleitungsphase kann stationär innerhalb von Stunden (ultra rush), Tagen (rush), sowie ambulant innerhalb mehrerer Wochen bis Monate (konventionell) durchgeführt werden. Hierfür kommen wässrige oder mittels Aluminiumhydroxid aufbereitete Depot-Präparate zum Einsatz.

Die meisten Patienten vertragen diese Behandlungsphase gut; eine Lokalreaktion an der Einstichstelle ist möglich. H1-blockierende Antihistaminika können örtliche Reaktionen oder leichte systemische Reaktionen abmildern [32]. Nach dem Erreichen der Erhaltungsdosis wird dann in regelmäßigen Abständen eine Injektion des Insektengifts verabreicht. Die Standarddosis beträgt 100µg, bei Bienengiftallergie und dem Vorliegen von Risikofaktoren für bzw. im Falle von Therapieversagen sind auch 200µg zugelassen. Eine Behandlungsdauer von drei bis fünf Jahren ist anzuraten, da eine kürzere Behandlungszeit von einem bis zwei Jahren in 22–27% der Fälle zu einem Rückfall nach Absetzen führen kann [32].

Zwar vertragen die meisten Patienten die Hyposensibilisierung gut, doch können bei bis zu 14% der Patienten so schwere systemische Reaktionen auftreten, dass ein Abbruch der weiteren SIT die Folge ist [31]. Eine Stichprovokation sollte zur Überprüfung des Therapieerfolgs 6–18 Monate nach dem Erreichen der Erhaltungsdosis erfolgen. Bei wiederholten SAR während der SIT ist es möglich, die Erhaltungsdosis weiter zu erhöhen und dem Patienten damit fast immer Schutz zu bieten [4]. Wenn der Patient die Stichprovokation gut vertragen hat, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass der Patient zumindest bei fortgesetzter SIT weiter gegen Stiche geschützt ist.

1.6. Anti-IgE- Anwendung während der spezifischen Immuntherapie

Muss die SIT aufgrund wiederkehrender systemischer Reaktionen abgebrochen werden, bedeutet dies für die betroffenen Patienten eine massive Einschränkung ihrer Lebensqualität, da sie unter einem besonders hohen Risiko leiden, durch weitere Insektenstiche erneut in akute Lebensgefahr zu geraten [34]. In diesen Fällen kann über den off-label use des IgE-Antikörpers Omalizumab nachgedacht werden. Ursprünglich für die Behandlung von Asthma zugelassen, hat das Medikament nach erfolgreichen Studien eine Zulassungserweiterung für die Therapie der chronischen spontanen Urtikaria erhalten [9,31]. Bis heute ist nicht ganz klar, wie dieses Präparat bei Urtikaria wirkt, da man von ausgeht, dass die chronische spontanen Urtikaria nicht IgE-vermittelt ist [37].

Die Wirkung von Omalizumab (Handelsname Xolair, Novartis), einem humanisierten, monoklonalen Anti-IgE Antikörper basiert auf einer spezifischen Blockade des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI durch Bindung an die nahegelegene Cε3 Domäne auf dem IgE-Molekül [31]. Es ist möglich, die Bindung von freiem IgE an Basophile und Mastzellen zu unterbrechen und die weitere Reaktivität auf Allergene herabzusetzen. Daraus ergibt sich erstens eine Reduktion von freiem Serum-IgE sowie zweitens eine

Herunterregulation der FcεRI-Rezeptoren der Basophilen und im weiteren Verlauf auch der Mastzellen [10,11,12].

An der Allergieambulanz der LMU München wurde zwischen 2006 und 2011 für insgesamt 15 Patienten ein Off-label Einsatz von Omalizumab wegen wiederholter und teilweise schwerer systemischer Nebenwirkungen während der SIT beantragt (klinische Daten siehe Tab. 2). Bei ihnen hatte sich die zusätzliche Gabe von H1-blockierenden Antihistaminika während der Immuntherapie als wirkungslos erwiesen, oder es bestand ein individuelles Risiko, bedingt durch hohe Exposition, unter einer erneuten schweren Stichreaktion zu leiden. Die Patienten hatten unter vorausgehenden besonders schweren Reaktionen (≥ Grad III Anaphylaxie) gelitten und/ oder es lag ergänzend eine Mastozytose-Erkrankung vor. Bei acht der oben genannten 15 Patienten wurden die entstandenen Kosten übernommen, zwei Patienten trugen die anfallenden Kosten selbst. Insgesamt wurden 10 Patienten mit Omalizumab behandelt, und fünf weitere dienten als Kontrollgruppe. Fast alle Patienten wiesen eine erhöhte Exposition gegenüber Insekten auf, beruflich oder privat.

In einer retrospektiven Auswertung wurden die Daten der klinischen Versorgung dieser Patienten analysiert. Die Ethikkommission der LMU München hatte keine Einwände gegen die anonyme Auswertung von Patientendaten, da die Anforderungen des Datenschutzes gewährleistet wurden.

Die Dosierung von Omalizumab richtete sich nach den Empfehlungen für die Indikation Asthma unter Berücksichtigung des Gesamt-IgE-Spiegels und des Körpergewichts des Patienten. Das Medikament wurde dann jeweils fünf, drei und eine Woche vor erneutem Beginn der SIT unter Anwendung des Rush- bzw. Ultra-rush-Protokolls verabreicht. Die neue Erhaltungsdosis wurde dann so gewählt, dass sie 100µg über der bisherigen lag, und wurde auch nach Absetzen von Omalizumab von allen Patienten problemlos ohne SAR vertragen. Das Absetzen erfolgte zwischen vier und sechs Monaten nach Erreichen der Zieldosis der Insektengift-SIT.

Lediglich ein Patient, der unter systemischer Mastozytose litt, entwickelte circa zwei Jahre nach Absetzen von Omalizumab eine systemische Reaktion auf mehrere Feldstiche. Zusätzlich war der Patient zu diesem Zeitpunkt durch einen grippalen Infekt geschwächt [34] und er hatte zuvor vertragene Feldstiche, die eine Re-Sensibilisierung ausgelöst haben könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Omalizumab in Verbindung mit einer erhöhten Erhaltungsdosis sehr effektiv sein kann, um eine dauerhafte Verträglichkeit der Insektengift-SIT herbeizuführen. Alle fünf Patienten der Kontrollgruppe, die kein Omalizumab erhielten, mussten die SIT aufgrund wiederkehrender SAR abbrechen. In anderen Fallberichten konnte Omalizumab keine

dauerhafte Verträglichkeit der Insektengift-SIT bewirken; allerdings wurde hier nicht der Versuch einer Erhöhung der Zieldosis Insektengift vorgenommen [30]. Weitere Fallberichte konnten belegen, dass die adjuvante Gabe von Omalizumab zum erfolgreichen Schutz vor erneuten schweren Stichreaktionen führen kann [9,18,31,33]. Die adjuvante Therapie mit Omalizumab während der SIT gegen Insektengift basiert auf der Annahme, dass wiederkehrende systemische Reaktionen während der SIT ein Therapieversagen anzeigen.

Kontrollierte prospektive Studien, um den Nutzen von Omalizumab bei Anaphylaxie bestätigen zu können, wären sehr wünschenswert, sind allerdings bei einer sehr seltenen Indikation schon wegen geringer Fallzahlen kaum realisierbar und aus Sicht der pharmazeutischen Industrie nachrangig.

Pat Nr.	SIT B/W	Nicht vertragene SIT	SG SAR vor SIT	bST (µ/L)	Form Mast	Om (w)	Tolerierte Dosis (µg)	Zeitraum Absetzen Om ⇒ SP (w)	SG SAR SP	Dauer SIT (a)
1	B/W	B	III	7,6	-	21	300	6	0	9,9
2	B/W	W	III	21,2	ISM	23	200	27	0	9,3
3	B	B	III	3	-	21	200	10	0	8,3
4	B	B	III	15,5	-	15	200	39	0	6,5
5	B/W	B	III	127	ISM	13	300	13	0	1,9
6	B/W	B	II	6,7	-	26	300	14	0	3,9
7	B	B	III	6,4	-	26	300	9	0	5,8
8	B	B	III	18,6	ISM	27	300	k.A.	k.A.	2,1
9	W	W	III	43,1	ISM	36	200	k.A.	k.A.	2,9
10	B	B	III	14,1	MIS	21	200	18	0	5,7

Tab.2. Daten der Patienten aus der Omalizumab Gruppe (SIT= spezifische Immuntherapie; B= Biene; W= Wespe; SG= Schweregrad; SAR= systemische allergische Reaktion; bST= basale Serumtryptase; Mast= Mastozytose; Om= Omalizumab; w= Wochen; SG= Schweregrad; SP= Stichprovokation; ISM= indolente systemische Mastozytose; MIS= kutane Mastozytose; a= Jahre) [34]

1.7. Einflussfaktoren der erfolgreichen Hyposensibilisierung

In einer von der Ethikkommission geprüften, retrospektiven Studie mit positivem Votum (153-13) wurden an der allergologischen Ambulanz der LMU München zwischen 1998 und 2011 anhand von 1609 Patientenfällen Einflussfaktoren untersucht, die den Erfolg der Hyposensibilisierungsbehandlung maßgeblich beeinflussen.

Den Mastzellerkrankungen wurde in diesem Zusammenhang besondere Aufmerksamkeit gewidmet [6].

Bei der gesamten Kohorte wurde vor der Einleitungsphase und vor der stationär durchgeführten Stichprovokation die Konzentration der bST bestimmt. Eine klinische Untersuchung auf mögliche Anzeichen einer Mastozytose der Haut war vor Therapiebeginn erfolgt. Alle eingeschlossenen Patienten waren nach einer SAR als Bienen- oder Wespengiftallergiker diagnostiziert worden und hatten eine Immuntherapie mit einer Erhaltungsdosis von 100µg beziehungsweise bei Vorliegen von Risikofaktoren eine erhöhte Dosis von 200µg Gift erhalten. Zu Risikofaktoren, die eine Behandlung mit erhöhter Erhaltungsdosis begründeten, zählten eine bST-Konzentration von über 20µg/l und/oder das Vorliegen einer kutanen Mastozytose, eine vorausgegangene Stichreaktion vom Schweregrad III oder höher, die Einnahme von β -Blockern oder ACE-Hemmern, Bienengiftallergie sowie wiederholt auftretende systemische Reaktionen während der Einleitungsphase.

Von insgesamt 1532 Patienten hatten 3,6% einen bST-Wert von über 20µg, bei 6,2% der Kohorte lag die bST zwischen 11,4-20 µg und 1382 Patienten hatten einen Tryptase-Wert \leq 11,4µg/l. Bei 98 Patienten (6,4%) bestanden Anhaltspunkte für eine systemische Mastozytose, da entweder eine kutane Mastozytose oder eine bST von über 20µg/l vorlagen. 20,8% der Patienten hatten vor Therapieeinleitung unter einer Stichreaktion vom Schweregrad III (anaphylaktischer Schock) oder IV (reanimationsbedürftige Anaphylaxie) gelitten. 9,4% der Patienten litten unter mehreren SAR während der Einleitungs- oder Erhaltungstherapie. 10,6% der Patienten erhielten eine erhöhte Erhaltungsdosis von 200µg, welcher sie vor Therapiebeginn schriftlich zugestimmt hatten. 14,4% der Patienten standen unter Medikation von Antihypertensiva, davon nahmen 1,1% β -Blocker und 1,9% ACE-Hemmer ein.

Bei 104 von insgesamt 1609 durchgeführten Stichprovokationen (6,5%) kam es zum Auftreten von systemischen Reaktionen. Ein Therapieversagen wurde signifikant häufiger festgestellt bei Patienten, die eine SIT gegen Bienengift erhielten, ACE-Hemmer während der Stichprovokation einnahmen wie auch bei Patienten mit einer bST \geq 20µg/l und/oder bei Vorliegen der kutanen Mastozytose. Ebenfalls war das Risiko, ein Therapieversagen zu erleiden, höher, wenn die Hyposensibilisierungsbehandlung zuvor von SAR begleitet worden war. Dagegen waren Patienten, die eine höhere Erhaltungsdosis oder auch eine Doppelsensibilisierung mit Bienen- und Wespengift erhielten, besser geschützt. Auch mit zunehmender Dauer der Erhaltungstherapie nahm das Risiko eines Therapieversagens ab. Eine bST-Konzentration \leq 20µg/l ohne gleichzeitiges Vorliegen einer kutanen Mastozytose stellt kein Risiko eines Therapieversagens dar [6].

Trotz erheblicher klinischer Relevanz gibt es nur wenige Studien zum Zusammenhang systemischer Mastozytose und Insektengiftallergie. Von allen Patienten mit einem bST-Wert über 11,4µg/l konnten 65,8% ausgemacht werden, die höchstwahrscheinlich unter einer systemischen Mastozytose leiden, da entweder eine kutane Mastozytose und/oder ein bST-Wert von über 20µg/l vorlag. Für die definitive Diagnosestellung einer systemischen Mastozytose ist jedoch sowohl eine Knochenmarksbiopsie wie auch eine hämatologische Untersuchung unabdingbar [6].

Variable	P-Wert	Odds ratio	Risiko
ACE-Hemmer	< 0,001	5,24	
SIT gegen Biene	< 0,001	5,09	
SAR während der SIT	< 0,001	3,07	
MIS/ MZT > 20µg/l	0	2,74	
Dauer der SIT	0,02	0,68	
Dosis > 100µg	0,08	0,58	
SIT gegen Bienen- und Wespengift	0,03	0,51	

Tab.3. Einflussfaktoren für die Wirksamkeit der der SIT [6]

2. Zusammenfassung

Serologische In-vitro-Verfahren, die neben Stichanamnese und Hauttestung zur Diagnostik der Insektengiftallergie zählen, beinhalten standardmäßig die Bestimmung der Serumtryptase (bST) und den Nachweis spezifischer IgE-Antikörper (sIgE-AK) auf Bienen- und Wespengesamtgift. Rekombinant hergestellte Einzelallergene bieten den Vorteil, frei von kreuz-reagierenden Kohlenhydratpeptiden (CCDs) zu sein und falsch-positive Ergebnisse in der Diagnostik zu reduzieren. Durch Routineeinsatz von rekombinanten Allergenen konnte festgestellt werden, dass in dem früher für Diagnostik und zur Feststellung einer Wespengiftallergie verwendeten Gesamtgift das Einzelallergen (Ves v5) in zu geringer Menge enthalten war und damit die Sensitivität der Diagnostik eingeschränkt war. Durch routinemäßige Verwendung von mit Ves v5 angereichertem („gespiktem“) Wespengesamtgift konnte anhand der Proben von 308 Patienten nachgewiesen werden, dass im Vergleich zu dem bis dahin gängigen Nachweisverfahren die Sensitivität des so verbesserten Wespengesamtgifts von 83,4 auf 96,8% erhöht werden kann. Wurde zusätzlich zur Serologie ein Hauttest durchgeführt (301/308 Patienten), so erhöhte sich die Sensitivität auf 99,7%.

Besteht die Anamnese einer weitreichenden systemischen Stichreaktion und konnte eine Insektengiftsensibilisierung nachgewiesen werden, so wird eine spezifische Immuntherapie (SIT) empfohlen. Obwohl diese überwiegend gut verträglich ist, können bei einzelnen Patienten vor allem während der Steigerungsphase schwere systemische Reaktionen auftreten. Wenn ergänzende Therapieoptionen (H1-blockierende Antihistaminika) ausgeschöpft sind und die systemischen Reaktionen besonders gravierend ausfallen, muss die Behandlung meist abgebrochen werden. Da diese Patienten für spätere schwere Stichreaktionen besonders gefährdet sind und in dieser Konstellation häufig Risikofaktoren für tödlich verlaufende Stichreaktionen vorliegen, wie das Bestehen einer Mastozytose, ist in der klinischen Behandlungssituation dringend gefordert, eine Verträglichkeit der Therapie und dadurch einen Schutz des Patienten herzustellen.

Retrospektiv wurde der Erfolg der adjuvanten Gabe des Anti-IgE-Antikörpers Omalizumab ausgewertet. Zehn Patienten konnten identifiziert werden, bei denen nach Abbruch bzw. Dosisreduktion einer SIT vor und einige Monate nach Neueinleitung der SIT Omalizumab verabreicht wurde. Es konnte hierdurch sowohl eine gute Verträglichkeit der spezifischen Immuntherapie in erhöhter Erhaltungsdosis als auch nach Absetzen von Omalizumab Schutz vor erneuten Stichreaktionen ermöglicht werden. Lediglich ein Patient erlitt etwa zwei Jahre nach Absetzen der Anti-IgE-Therapie eine systemische Reaktion auf mehrere Feldstiche und entwickelte anschließend erneut systemische allergische Reaktionen auf die SIT.

Insgesamt ist die SIT mit Insektengift hochwirksam. Um Risikofaktoren für Therapieversagen zu identifizieren, wurden 1609 diagnostische Stichprovokationen bei 1532 Patienten während laufender Insektengifthyposensibilisierung retrospektiv untersucht. Als Gefahren für Therapieversagen erwiesen sich in der multivariaten Analyse die Anwendung von ACE-Hemmern, schlechte Verträglichkeit der Hyposensibilisierung, Bienengift- versus Wespengiftallergie und erhöhte Tryptasekonzentration ($>20\mu\text{g/l}$) und/oder Vorliegen einer Mastozytose der Haut. Mit einem besseren Schutz bei Stichprovokation assoziiert waren eine höhere Erhaltungsdosis, eine längere Therapiedauer und eine Doppelhyposensibilisierung mit Bienen- und Wespengift. Bei Insektengift-allergischen Patienten mit Risikofaktoren sollten daher wenn möglich ACE-Hemmer abgesetzt und eine höhere Erhaltungsdosis erwogen werden.

3. Summary

Diagnostic workup after a systemic reaction to an insect sting is based on clinical history, skin test and serological in vitro tests. Testing the level of serum baseline tryptase concentration (BTC) and reactivity of specific IgE to whole bee and wasp venom is considered standard of care. Cross-reactive carbohydrate determinant-free recombinant hymenoptera venom (HV) allergens show the benefit of reducing false positive test results. Routine use of recombinant allergens indicated that the whole wasp venom used for diagnostics and identification of wasp allergy revealed a shortage of rves v5 and so curtails the sensitivity of this diagnostic test.

Routine use of spiked whole wasp venom (with enhanced ves v5) in 308 patients led to an increased sensitivity of in vitro testing from 83.4% to 96.8%. If serological testing is accompanied by a skin test (301 of 308 patients), detecting sensitivity to wasp venom is considered as high as 99.7%.

Specific immunotherapy (SIT) should be recommended to patients with a positive history of one or more severe sting events and whose test results confirm an IgE-mediated allergy. Even if SIT is predominantly successful, systemic reactions can occur mostly during the build-up phase, and indicate treatment failure or may even require treatment termination if additional medication (H1-blocker antihistamines) have been explored. Since these patients are especially at risk for future insect stings and some have additional risk factors for a lethal anaphylactic reaction, such as mastocytosis, protection of the patient by ensuring tolerance of treatment is warranted.

In a retrospective study, we analysed the benefit of adjuvant therapy with the anti IgE antibody Omalizumab. Ten patients received complimentary Omalizumab before and during their second SIT after the first therapy had to be stopped or dose had to be reduced. Patients tolerated immunotherapy well at a higher dose and additionally received protection against future stings.

Only one patient suffered from a systemic reaction following multiple field stings about two years after anti-IgE therapy had been stopped, and from systemic reactions during the following SIT. In summary, SIT performed with hymenoptera venom (HV) is highly successful. In order to identify risk factors for treatment failure, 1609 diagnostic sting challenges tests performed in 1532 patients were evaluated retrospectively during HV-SIT. In the multivariate study, higher treatment failure was associated with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor use, poor tolerance of HV-SIT, bee versus wasp allergy, an elevated BTC (>20µg/l) and/ or mastocytosis of the skin. Elevated maintenance dose, longer duration of treatment as well as double HV SIT against wasp and bee showed a higher correlation with treatment success.

Consequently, in HV allergic patients with risk factors, elevated maintenance dose should be considered, and ACE inhibitors should, if possible, be discontinued.

4. Originalarbeiten

Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to vespula venom

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23006544>

Overcoming severe adverse reactions to venom immunotherapy using anti- IgE antibodies in combination with a high maintenance dose

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28802075>

Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24447114>

5. Literaturverzeichnis

1. Biló MB, Bonifazi F. The natural history and epidemiology of insect venom allergy: clinical implications. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(10):1467-76.
2. Peavy RD, Metcalfe DD. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(4):310-15.
3. Müller UR. Insect venoms. *Chem Immunol Allergy*. 2010;95:141-56.
4. Przybilla B, Ruëff F. Hymenoptera venom allergy. *J Deutsch Dermatolog Ges*. 2010;8(2):114-27.
5. Biló BM, Ruëff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink J. EAACI Interest Group of Venom Hypersensitivity Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005;60(11):1339-49.
6. Ruëff F, Vos B, Oude Elberink J et al. Predictors of clinical effectiveness of Hymenoptera venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5):736-46.
7. <http://www.phadia.com/de/4/Produkte/Tests/1/Testprinzip-ImmunoCAP-Specific-IgE/> 26.11.2018; 10:15
8. Przybilla B, Ring J, Ruëff F. Anaphylaxis. Clinical manifestations and diagnosis. *Hautarzt*. 2007;58(12):1025-31.
9. Wiczorek D, Kapp A, Wedi B. Intolerance of specific immunotherapy with Hymenoptera venom: jumping the hurdle with omalizumab. *Hautarzt*. 2014;65(9):791-95.
10. Beck LA, Marcotte GV, MacGlashan D, Togias A, Saini S. Omalizumab-induced reductions in mast cell FcεR1 expression and function. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(3):527-30.
11. Lowe PJ, Renard D. Omalizumab decreases IgE production in patients with allergic (IgE-mediated) asthma; PKPD analysis of a biomarker, total IgE. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(2):306-20.
12. Yalcin AD. An overview of the effects of anti-IgE therapies. *Med Sci Monit*. 2014;20:1691-99.
13. Biló MB. Anaphylaxis caused by Hymenoptera stings: from epidemiology to treatment. *Allergy*. 2011;66(95):35-37.
14. Ruëff F, Przybilla B, Biló MB, Müller U et al. Predictors of severe systemic anaphylactic reactions in patients with Hymenoptera venom allergy: importance of baseline serum tryptase- a study of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(5):1047-54.
15. Brockow W, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy*. 2008;63:226-32.
16. Müller S, Radei-Shamsabadi D, Jakob T. Tricky cases in in-vitro diagnostics of hymenoptera venom allergy. *Hautarzt*. 2014;65(9):780-1,784-90.

17. Vos B, Köhler J, Müller S, Stretz E, Ruëff F, Jakob T. Spiking venom with rVes v 5 improves sensitivity of IgE detection in patients with allergy to Vespula venom. *Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1225-27.
18. Galera S, Soohun N, Zankar N, Caimmi S, Gallen C, Demoly P. Severe anaphylaxis to bee venom immunotherapy: efficacy of pretreatment and concurrent treatment with omalizumab. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2009;19(3):225-29.
19. Muñoz-Cano R, Picado C, Valero A, Bartra J. Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016;26(2):73-82.
20. Metcalfe DD, Peavy RD, Gilfillan AM. Mechanism of mast cell signaling in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(4):639-46.
21. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2016;6:620.
22. Bonadonna P, Bonifacio M, Lombardo C, Zanotti R. Hymenoptera Allergy and Mast Cell Activation Syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(1):5.
23. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2011 update on diagnosis, risk stratification, and management. *American Journal of Hematology.* 2011;86(4):362-71.
24. Bonadonna P, Lombardo C, Zanotti R. Mastocytosis and allergic diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2014;24(5):288-97.
25. Jakob T, Rafei- Shamsabadi D, Spillner E, Müller S. Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo J Int.* 2017;26:93-105.
26. Przybilla B, Ruëff F, Walker A, Råwer HC, Aberer W et al. Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin (DGKJ) in Zusammenarbeit mit der Österreichischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (ÖGAI) und der Schweizerischen Gesellschaft für Allergologie und Immunologie (SGAI) *Allergo J.* 2011;20:318-39.
27. Ruëff F, Bergmann KC, Brockow K, Fuchs T et al. Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttypreaktionen. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) in Abstimmung mit dem Ärzteverband Deutscher Allergologen (ÄDA), dem Berufsverband Deutscher Dermatologen (BVDD), der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG), der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und Kopf- und Hals-Chirurgie (DGHNOKHC), der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) und der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA). *Allergo J.* 2010;19:402-15.
28. Neis M, Merk H. Value of component-based diagnostics in IgE- mediated hymenoptera sting reactions. *Cutaneous and ocular toxicology.* 2012;31(2):117-23.

29. Hofmann S, Pfender N, Weckesser S, Huss-Marp J, Jakob T. Added value of IgE detection to rApi m 1 and rVes v 5 in patients with hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):265-67.
30. Jandus P, Hausmann O, Haeberli G et al. Unpredicted adverse reaction to omalizumab. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011;21(7):563-66.
31. Ricciardi L. Omalizumab: A useful tool for inducing tolerance to bee venom immunotherapy. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016;29(4):726-28.
32. Sturm GJ, Varga EM, Roberts G, Mosbech H et al. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2017 Jul 27.
33. Da Silva EN, Randall KL. Omalizumab mitigates anaphylaxis during ultrarush honeybee venom immunotherapy in monoclonal mast cell activation syndrome. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(6):687-88.
34. Stretz E, Oppel EM, R awer HC, Chatelain R, Mastnik S, Przybilla B, Ru eff F. Overcoming severe adverse reactions to venom immunotherapy by using anti-IgE antibodies in combination with a high maintenance dose. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(12):1631-39. Epub 2017 Sep 28.
35. Schiener M, Graessel A, Ollert M, Schmidt-Weber CB, Blank S. Allergen specific immunotherapy of Hymenoptera venom allergy – also a matter of diagnosis. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(10):2467-81.
36. Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to Insect Venom allergens: Role of Molecular Diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;15(5):26.
37. Kaplan A, Ledford D, Ashby M, Canvin J et al. Omalizumab in patients with symptomatic chronic idiopathic/spontaneous urticaria despite standard combination therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):101-09.

6. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Franziska Ruëff, die mich an die Thematik der Hymenoptereingiftallergie herangeführt sowie meine Neugierde dafür geweckt hat. Die Möglichkeit, im Rahmen meiner Dissertation veröffentlichen zu können, rechne ich ihr hoch an.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Gassner und dem Team des Allergologie-Labors bedanken. Sie haben mir viel Hilfestellung nicht nur bei der Anwendung und Auswertung der In-vitro Verfahren, sondern auch bei logistischen sowie organisatorischen Fragen gegeben und durch ihre Menschlichkeit das Arbeiten sehr angenehm gemacht.

Allen Ko-Autoren, die bei den Veröffentlichungen beteiligt waren, bin ich für die Zusammenarbeit, Mühen sowie ihren individuellen Arbeitseinsatz zu großem Dank verpflichtet.

Zuletzt gilt meine Dankbarkeit meiner Familie, von der ich mir keine bessere Unterstützung hätte wünschen können.