

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie mit  
Asthmapoliklinik der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Phänotypische und funktionelle  
Charakterisierung peripherer B-Zellen  
während Wespengiftimmuntherapie**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Anne Constanze Röver  
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter:       1. Frau Prof. Dr. B. M. Henz  
                      2. Herr Prof. Dr. U. Wahn  
                      3. Herr Priv. Doz. Dr. J Grabbe

Datum der Promotion: 25.05.2001

**Meinen Eltern  
und  
meiner Großmutter**

## **Abstract**

Die Wespengiftallergie stellt eine typische allergische Sofortreaktion dar. Für diese IgE-vermittelten, pathologischen Immunreaktionen ist die spezifische Immuntherapie (IT) die einzige zur Zeit zur Verfügung stehende kausale Therapie. Die Wirkmechanismen sind trotz intensiver Bemühungen weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Als wichtigste These wird zur Zeit eine Verlagerung des pathologischen, TH2-dominierten Zytokinmilieus in Richtung "normales" TH1-Milieu diskutiert. Es wurde auch eine reduzierte Mediatorfreisetzung von Effektorzellen, eine verminderte Leukozytenproliferation, eine verminderte Endorganantwort und charakteristische Ig-Titer-Veränderungen mit initialem Anstieg und längerfristigem Abfall des sIgE und Anstieg des sIgG4 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der IT auf periphere B-Zellen hinsichtlich ihrer Ig-Produktion und ihres Phänotyps untersucht.

15 Patienten mit systemischen Reaktionen nach Wespenstich, Nachweis von spezifischem IgE und positivem Hauttest, bei denen eine Schnell-Immuntherapie eingeleitet wurde, wurden vor Beginn der Therapie (Tag 1), am Tag ihrer Entlassung (Tag 6), also einen Tag, nachdem die Erhaltungsdosis von 100 µg erreicht wurde, und vor der 2. ambulanten Allergeninjektion am 26. Tag untersucht. Die Expression von CD5, CD23, CD32, CD40, CD54, CD86, CD95, HLA-I-ABC und HLA-II-DR wurde auf peripheren mononukleären Blutzellen durchflußzytometrisch bestimmt. Anti-CD19 FITC wurde als spezifischer B-Zellmarker benutzt. Die Serum-Titer des Gesamt-IgE, Wespengift-spezifischen IgE und Wespengift-spezifischen IgG4 wurden mittels ELISA bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Test für nicht-parametrische, verbundene Daten benutzt.

Die Expression von CD54, CD5, CD32 und HLA-II-DR wurde durch die IT signifikant und die von CD23 tendenziell modifiziert. So war die Expression dieser Moleküle auf der Oberfläche peripherer B-Zellen am Tag 6 im Vergleich zum Ausgangswert vom Tag 1 reduziert. Am 26. Tag wurden wieder Werte auf der Höhe der Ausgangswerte vom Tag 1 gemessen. Dagegen veränderte sich die Expression von CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC während der untersuchten Zeitpunkte nicht. Die Ig-Titer veränderten sich in der für die IT charakteristischen Weise. So stieg nach 3 Wochen der Gesamt-IgE-, sIgE- und sIgG4-Titer hochsignifikant an.

Die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle ist als Indikator für Veränderungen der Aktivationslage und des funktionellen Status der Zellen während der IT zu interpretieren. So spricht die Reduktion der Expression von CD32, CD54 und HLA-II für eine verminderte Aktivierungslage der peripheren B-Zellen. Ferner deutet die Reduktion von CD5 und CD32 auf eine Anergie der B-Zellen hin. Durch die reduzierte Expression von CD23 und CD54 könnte die T-B-Zell-Interaktion verschlechtert werden, die für die Effektorfunktionen beider Zellen bedeutsam ist. Einen wesentlichen Beitrag zur Wirksamkeit der IT könnte auch die verminderte Expression des HLA-II leisten, da HLA-II für die Ag-Präsentation essentiell ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die spezifische Immuntherapie einen Einfluß nicht nur auf die Ig-Produktion der B-Zellen hat, sondern auch auf deren Phänotyp. Dies könnte Hinweise auf bisher nicht bekannte Mechanismen bieten, die an der Wirksamkeit der IT beteiligt sind.

## **Schlagworte**

Wespengiftallergie, B-Zellen, Immuntherapie, Hyposensibilisierung, Antigenpräsentation

## **Abstract**

Wasp-venom allergy is a typical IgE-mediated allergic reaction. Specific immunotherapy (IT) is the only currently available causal therapy for IgE-mediated allergies. The mechanisms responsible for the efficacy of IT are still not fully understood. So far, the main focus of research has been on changes of T-helper cell (TH) cytokine production with a shift from TH2 to TH1 cytokines. Reduced mediator secretion from effector cells of allergic reactions, decreased leukocyte proliferation, lowered responsiveness of end organs and changes in immunoglobulin levels have been reported as well. The purpose of this study was to investigate the influence of IT on phenotype and Ig-production of B-lymphocytes.

15 venom allergic patients with a history of systemic reactions after a wasp sting and venom-specific skin test reactivity as well as serum IgE were investigated before VIT (day 1), one day after reaching maintenance dose of 100 µg (day 6) during inpatient rush VIT, and again on day 26 during continued outpatient maintenance therapy. Changes in the serum levels of total IgE, allergen-specific IgE (sIgE) and sIgG4 were measured by ELISA. Expression of CD5, CD23, CD32, CD40, CD54, CD86, CD95, HLA-I-ABC and HLA-II-DR on double labeled B cells was studied by flow cytometry of peripheral blood mononuclear cells.

On day 6, cell surface expression of CD54, CD5, CD32 and HLA-II-DR was decreased significantly in intensity and numbers of positive cells, compared to day 1, while on day 26, expression of these molecules approached again baseline levels. Furthermore, a trend to decreased CD23 was noted on day 6. No changes were observed for CD40, CD86, CD95 and HLA-I-ABC. Levels of total IgE, sIgE and sIgG4 showed a significant increase after 26 days of VIT.

These data show that initiation of rush VIT has profound effects on B-cell phenotype and Ig-production. Reduced expression of surface molecules can be interpreted as a reduction of activation status of B-cells as well as reduced ability to present antigen and to costimulate other leukocytes. B cells may thus be additional direct or indirect targets of high dose antigen therapy and contribute to the efficacy of IT.

## **Key words**

wasp venom allergy, B cell phenotype, venom immunotherapy, antigen presentation

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Die allergische Typ-I-Reaktion</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>B-Zellen</b>	<b>11</b>
2.2.1	Herkunft und Reifung von B-Zellen	11
2.2.2	Die Produktion von Immunglobulinen	11
2.2.2.1	Antigenpräsentation von B-Zellen	11
2.2.2.2	Die Struktur von Immunglobulinen	12
2.2.2.3	Antikörperklassenwechsel zum IgE	13
<b>2.3</b>	<b>Wespengiftallergie</b>	<b>15</b>
2.3.1	Entomologie (Insektenkunde)	15
2.3.1.1	Systematische Einteilung der Hymenopteren	15
2.3.1.2	Zusammensetzung des Wespengiftes	16
2.3.2	Epidemiologie	17
2.3.2.1	Prävalenz	17
2.3.2.2	Mortalität	18
2.3.3	Klinik der Wespengiftallergie	18
2.3.3.1	Reaktionsformen auf Hymenopterenstiche	18
2.3.3.2	Erscheinungsbild der Wespengiftallergie	18
2.3.4	Diagnostik der Wespengiftallergie	19
2.3.4.1	Anamnese	19
2.3.4.2	Hauttest	19
2.3.4.3	Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper	20
2.3.5	Notfalltherapie	20
<b>2.4</b>	<b>Spezifische Immuntherapie</b>	<b>21</b>
2.4.1	Klinische Aspekte der spezifischen Immuntherapie	21
2.4.1.1	Therapieprinzip	21
2.4.1.2	Wirksamkeit	22
2.4.1.3	Nebenwirkungen	22
2.4.1.4	Indikation	22
2.4.2	Immunologische Parameter im Verlauf der IT	23
2.4.2.1	Effektorzellen und Mediatorsekretion	23
2.4.2.2	Proliferationshemmung von peripheren mononukleären Blutzellen	23
2.4.2.3	Effekte der VIT auf T-Zellen	23
2.4.2.4	Veränderungen der Ig-Spiegel während der IT	25
2.4.2.5	Phänotypische Veränderungen	25
<b>2.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten</b>	<b>27</b>
3.1.1	Auswahlkriterien	27
3.1.2	Therapieprotokoll	29
3.1.3	Studienprotokoll	30
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>30</b>
3.2.1	Aufreinigung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	30
3.2.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen	30

3.2.2.1	Färbung der Oberflächenantigene	30
3.2.2.2	Analyse am Durchflußzytometer	31
3.2.3	Serumparameter	34
3.2.3.1	Gesamt-IgE	34
3.2.3.2	Spezifisches IgE	35
3.2.3.3	Spezifisches IgG4	35
3.2.4	Statistische Methoden	35
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Phänotypische Veränderungen von peripheren B-Zellen während der VIT</b>	<b>36</b>
4.1.1	Die CD5 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT	37
4.1.2	Die CD32 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT	39
4.1.3	Die CD54 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT	41
4.1.4	Die CD23 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT	43
4.1.5	Die HLA-II-DR Expression auf B-Zellen vor und während der VIT	45
4.1.6	Die Expression von CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC auf B-Zellen vor und während der VIT	47
<b>4.2</b>	<b>Funktionelle Veränderungen von peripheren B-Zellen während der VIT</b>	<b>48</b>
4.2.1	Gesamt-IgE-Spiegel vor und während der VIT	48
4.2.2	Wespen-spezifische IgE-Titer vor und während der VIT	49
4.2.3	Spezifisches IgG4 im Verlauf der VIT	50
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Mögliche Ursachen für die beobachteten Effekte</b>	<b>52</b>
5.1.1	Veränderungen der T-Helferzell-Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$	52
5.1.2	Erhöhung des IL-10-Spiegel	52
5.1.3	T-Zell-Anergie	53
5.1.4	Direkte Wirkung des Allergens	53
<b>5.2</b>	<b>Wirkmechanismus oder Epiphänomen?</b>	<b>54</b>
5.2.1	Allergenunspezifische Reduzierung des Aktivierungsniveaus peripherer B-Zellen	54
5.2.2	Einflüsse auf die IgE-Regulation	54
5.2.3	Reduzierte CD32-Expression	55
5.2.4	Reduzierte Antigen Präsentation von B-Zellen	56
5.2.5	Zeitverlauf der Veränderungen der immunologischen Parameter	56
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>68</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis	68
8.2	Tabellenverzeichnis	68
8.3	Materialliste	69
8.4	Lebenslauf	71
8.5	Danksagung	72

## Abkürzungen

Ag	Antigen
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	bovine serum albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
Dpt	Dermatophagoides pteronyssinus
ε-GLT	ε-Germline-Transcript
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FITC	fluoresceinisothiocyanat
Ig	Immunglobulin
IT	spezifische Immuntherapie
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
RAST	radio allergo sorbent test
SAR	systemische anaphylaktische Reaktion
sIgE	spezifische IgE-Antikörper
sIgG4	spezifische IgG4-Antikörper
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
VIT	venom immunotherapy (Insektengiftimmuntherapie)

# 1 Einleitung

Allergische Reaktionen gegenüber Insektengift, in Deutschland v.a. nach Bienen- oder Wespenstichen, treten bei 0,3 – 5% der deutschen Bevölkerung auf (25,96). Die allergische Reaktion kann von rein kutanen Reaktionen bis zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock reichen. Die Insektengiftallergie ist eine typische IgE-vermittelte Immunreaktion und gehört zur Typ-I-Reaktion (Soforttyp-Reaktion) der Einteilung nach Coombs und Gell (29).

Die einzige kausale Therapie für IgE-vermittelte Allergien ist bis heute die spezifische Immuntherapie (IT), bei der in steigender Dosierung das spezifische Allergen appliziert wird. Obwohl die IT seit Anfang des 20. Jahrhunderts erfolgreich durchgeführt wird, sind die Mechanismen, die die Wirksamkeit der IT begründen, noch nicht hinreichend verstanden.

Die zur Zeit am meisten diskutierte Theorie stützt sich auf Untersuchungen, die zeigen, daß das Zytokinmilieu der T-Helferzellen (TH-Zellen) durch die IT moduliert wird. So wird weniger IL-4, IL-5 und IL-13 sezerniert (8,15), die zu den sog. TH2-Zytokinen gehören. Ein Anstieg der TH1-Zytokine ist noch nicht hinreichend belegt. Außerdem wird durch die IT die Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 gesteigert (4). Da TH2-Zellen durch ihre Zytokine eher eine IgE-vermittelte Immunantwort auslösen, wird die während der IT beobachtete Verlagerung des Zytokinmilieus zu Ungunsten der TH2 als Ursache für die Effizienz diskutiert.

Es sind weitere Veränderungen immunologischer Parameter beschrieben worden, hierzu gehört eine verminderte Leukozytenproliferation (3,8,15,74,91), eine verminderte Endorganantwort (33) und eine verminderte Mediatorfreisetzung aus Effektorzellen (103). Auch eine Veränderung der Serum-Immunglobulinspiegel wurde während der IT beobachtet. So tritt zuerst ein Anstieg des spezifischen IgE (sIgE) auf, mit nachfolgendem Abfallen über Jahre der IT; oft ist nach 3-5 Jahren Therapie kein sIgE mehr nachweisbar (83). Das spezifische IgG (sIgG) dagegen steigt während der IT an und zwar v.a. der Subtyp IgG4. Das IgG4 kann kaum Komplement fixieren und bindet nur schwach an Fc-Rezeptoren, so daß IgG4 kaum immunologische Reaktionen bewirkt. Da es mit sIgE direkt kompetitiv um die Allergenbindung konkurriert, wird als eine Theorie des Wirkmechanismus der IT die blockierende Wirkung dieser Antikörperklasse diskutiert.

Neben ihrer Hauptfunktion der Ig-Produktion fungieren B-Zellen auch als antigenpräsentierende Zellen (APZ) und sind in der Interaktion mit T-Zellen als Kostimulatoren für TH-Zellen sehr wichtig. Während die charakteristischen Veränderungen der Ig-Spiegel im Verlauf der IT gut untersucht sind, sind andere mögliche Effekte auf B-Zellen kaum beforscht. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb neben den Ig-Spiegeln Oberflächenmoleküle peripherer B-Zellen vor und während der Wespengift-IT untersucht, um mögliche Einflüsse der IT auf den Aktivitätszustand, die T-B-Zellinteraktion und die Antigenpräsentation von peripheren B-Zellen zu analysieren.

## 2 Einführung in die Thematik

### 2.1 Die allergische Typ-I-Reaktion<sup>1</sup>

Der Begriff *Allergie* wurde 1906 von dem Pädater von Pirquet eingeführt, er beschrieb damit die veränderte Reaktion eines Organismus nach Kontakt mit einem Fremdstoff. Heute wird der Begriff synonym mit dem Wort Überempfindlichkeit benutzt und beschreibt die übersteigerte Immunreaktion eines Organismus auf ein von sich aus nicht krankheitsauslösendes Antigen.

Coombs und Gell teilten 1963 die Überempfindlichkeitsreaktionen aufgrund ihrer unterschiedlichen immunologischen Mechanismen in vier Typen ein (29). Typ I bis III sind Antikörper-vermittelte Reaktionen, Typ IV ist eine T-Zell-vermittelte Immunantwort. Diese Klassifikation sollte jedoch lediglich als Modell angesehen werden, die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge der Überempfindlichkeitsreaktionen zu verstehen. Bei den klinischen Manifestationen zeigen sich nämlich Überschneidungen der einzelnen Typen, so besitzt z.B. die atopische Dermatitis sowohl Charakteristika der IgE-vermittelten Typ-I-Reaktion als auch der T-Zell-vermittelten Typ-IV-Reaktion. Die Insektengiftallergie gilt als klassisches Beispiel für eine allergische Typ-I-Reaktion, es soll in dieser Arbeit deshalb nur auf die Typ-I-Reaktion eingegangen werden.

Die Immunantwort beginnt mit der Aufnahme des Antigens in den Organismus. Antigene, die allergische Reaktionen auslösen können, nennt man Allergene. Der erste Allergenkontakt führt zur Sensibilisierung des Individuums. Antigene (Ag) gelangen über die Haut bzw. Schleimhäute, bei Insektengiftallergikern durch intraepidermale Injektion in den Körper und werden von APZ aufgenommen. Zu den APZ zählen die Makrophagen, die aus den im Blut zirkulierenden Monozyten hervorgehen, die dendritischen Zellen, die Langerhanszellen der Haut und die B-Lymphozyten (111). Sind die Antigene internalisiert, werden sie in den Lysosomen degradiert. Kleine Antigenfragmente werden intrazytoplasmatisch an Moleküle des Histokompatibilitäts-Komplexes-II (MHC-II = major histocompatibility complex, bzw. HLA-II = humanes Leukozyten-Antigen) gebunden und komplexgebunden an die Zelloberfläche gebracht. Nun können spezifische TH-Zellen das Antigen auf der Zelloberfläche mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) erkennen. Das Binden des TZR an den Peptid-MHC-II-Komplex bildet das erste Signal zur Aktivierung der ruhenden T-Helfer-Zelle. Zur vollständigen Aktivierung benötigt die T-Zelle aber noch kostimulatorische Signale, z.B. durch Interaktion von CD28 auf den T-Zellen mit der B-7-Molekül-Familie (CD80, CD86) auf den APZ.

Die aktivierten TH-Zellen können nun Immunglobuline (Ig) induzieren, einschließlich IgE. Das von der TH2-Zelle sezernierte IL-4 bewirkt, daß die B-Zelle einen Isotypenklassenwechsel unternimmt und später zu IgE umschaltet. Das zweite Signal ist die Interaktion zwischen CD40 auf den B-Zellen und CD40L (CD40-Ligand) auf den TH2-Zellen, welches bewirkt, daß die B-Zelle IgE produziert. Das IgE bindet nun an Fcε-Rezeptoren, wobei der hochaffine FcεRI von Mastzellen, Basophilen und Langerhanszellen und der niedrigaffine FcεRII (CD23) von Monozyten, Eosinophilen, Thrombozyten, dendritischen Zellen und Lymphozyten exprimiert wird.

Bei erneutem Allergenkontakt bindet das Allergen an die z.B. auf Mastzellen gebundenen IgE-Moleküle und kreuzvernetzt diese. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Mastzelle, was einerseits zur Sekretion von präformierten Mediatoren (v.a. Histamin, Serotonin, Proteasen) und andererseits zur Synthese von weiteren Substanzen (Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine) führt (55). Diese Mediatoren verursachen durch Vasodilatation, Erhöhung der Vasopermeabilität, bronchiale Muskelkontraktion, erhöhte Schleimsekretion und Chemotaxis von weiteren Entzündungszellen die Früh- und Spätreaktionen der Typ-I-Reaktion, mit den bekannten klinischen Folgen der atopischen Erkrankungen (z.B. Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, Urticaria) und der Anaphylaxie (z.B. Insektengiftallergie).

---

<sup>1</sup> Quellen für Abschnitt 2.1. sind, soweit nicht anders angegeben: (59,111,131,134)

## 2.2 B-Zellen

### 2.2.1 Herkunft und Reifung von B-Zellen<sup>2</sup>

Die wichtigsten Abwehrzellen der spezifischen, humoralen Immunantwort sind die B-Zellen, die auf die Produktion von Immunglobulinen spezialisiert sind. B-Zellen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Die Entwicklung der B-Zellreihe beginnt im menschlichen Fötus ab der 8. bis 9. Schwangerschaftswoche in dem hämatopoetischen Gewebe der Leber und verlagert sich ab der 20. Schwangerschaftswoche zunehmend ins hämatopoetische Knochenmark, wo auch die postnatale Reifung von B-Zellen lokalisiert ist. Die Entwicklung der B-Zellen läßt sich anhand unterschiedlich exprimierter Oberflächenmarker und Umordnungen in der Keimbahn in Stadien einteilen. Man unterscheidet vereinfachend Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen, unreife B-Zellen und naive reife B-Zellen. Die Entwicklung der B-Zellen endet in den B-Gedächtniszellen und den Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die Keimbahnumordnung beginnt bei den Genen der schweren (H-)Kette mit einer fertigen  $\mu$ -Kette im Zytoplasma im Stadium der Prä-B-Zelle. Das Rearrangement der leichten (L-)Kette beginnt erst im Stadium der Prä-B-Zelle, so daß ein fertiges oberflächenständiges IgM-Molekül Kennzeichen der unreifen B-Zelle ist. Die reife B-Zelle zeichnet sich durch IgM oder IgD auf ihrer Oberfläche aus.

Parallel zu der Umordnung der Keimbahn kann man den einzelnen Entwicklungsstadien die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle zuordnen. So wird MHC-II schon auf den Stammzellen exprimiert. CD19 ist ein Molekül, was nur von B-Zellen exprimiert wird und zwar vom Stadium der Pro-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle und der B-Gedächtniszelle, nur Plasmazellen exprimieren kein CD19. Auch CD20 zeichnet sich dadurch aus, daß es nur von B-Zellen (in den gleichen Stadien wie CD19) exprimiert wird. CD19 und CD20 können demnach als B-Zell-spezifische Marker zur Identifizierung von peripheren B-Zellen benutzt werden.

CD40 findet man ab dem Stadium der Prä-B-Zelle und CD23 ab dem Stadium der unreifen B-Zelle. Die Plasmazelle ist charakterisiert durch die Expression von CD38 und PCA-1 (Plasma cell antigen 1), sie kann aber auch durch ihr typisches Radspeichenmuster mikroskopisch identifiziert werden.

### 2.2.2 Die Produktion von Immunglobulinen

Für die Produktion von Immunglobulinen gegenüber dem überwiegenden Teil von Antigenen benötigen B-Zellen die Hilfe von TH-Zellen, es gibt jedoch auch T-Zell-unabhängige Antigene (111), auf die hier nicht eingegangen werden soll, da Allergene in der Regel T-Zell-abhängig sind.

Damit TH-Zellen ihre Aufgabe erfüllen können und effizient Signale an die B-Zellen leiten können, müssen sie initial von APZ aktiviert werden. Sobald die T-Zelle aktiviert ist, kann sie die B-Lymphozyten zur Produktion von Ig stimulieren. Diese Hilfe wird zum einen über zelluläre Interaktion, zum anderen über Zytokine vermittelt. Die zelluläre Interaktion verläuft über die spezifische Bindung des TZR an den MHC-II-Ag-Fragment-Komplex als notwendiges Signal und über die Interaktion einer Reihe kostimulatorischer Moleküle, z.B. CD80/CD86 - CD28, CD40 - CD40L, CD54 - LFA-1, LFA-3 - CD2 (27). Diese T-Zell-Hilfe führt zur Proliferation der spezifischen B-Zelle und zur Ausreifung zu Ig-produzierenden Plasmazellen bzw. zu Gedächtniszellen. In diesem Kapitel soll die Rolle der B-Zelle als APZ, die Struktur von Immunglobulinen und der Klassenwechsel zum IgE abgehandelt werden.

#### 2.2.2.1 Antigenpräsentation von B-Zellen

Die Antigenpräsentation der B-Zellen beginnt mit der spezifischen Bindung eines Ag an das membranständige Ig-Molekül, welches einen Teil des BZR darstellt (12,60). Hier liegt ein sehr wichtiger Unterschied zu den anderen professionellen APZ, denn während B-Zellen nur das Ag präsentieren können, was für sie spezifisch ist, phagozytieren die anderen APZ unspezifisch Ag und können demnach viele verschiedene Ag präsentieren. Die spezifische Bindung des Ag an

---

<sup>2</sup> Quellen für Abschnitt 2.2.1. sind, soweit nicht anders angegeben: (59,111,131).

den BZR führt zu einer Internalisierung des Ag-Rezeptor-Komplexes. Nach endosomaler Prozessierung des Ag (119) werden Ag-Fragmente gebunden an HLA-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert und somit den TH präsentiert.

Der BZR besteht aus dem membranständigen IgM oder IgD (mIgM, mIgD) für die spezifische Bindung und den Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  (CD79) Heterodimeren, die über ihren intrazytoplasmatischen Anteil die Signaltransduktion vermitteln (12,31,119).

Von den in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmolekülen sind CD19, CD5 und CD32 mit dem BZR assoziiert (35,48,102). CD19 ist ein transmembranes Protein der Ig-Superfamilie. Es gehört zum Ko-Rezeptorkomplex des BZR. Der intrazytoplasmatische Anteil von CD19 wird nach Kreuzvernetzung des BZR durch Ag schnell phosphoryliert und trägt somit zur Signaltransduktion bei (31). CD19 interagiert u.a. mit dem Komplementkomponent-Rezeptor CD21, die Funktionen des CD19 sind aber noch nicht vollständig verstanden.

CD5 und CD32 scheinen bei der Regulation der BZR-Signaltransduktion inhibitorisch wirksam zu sein (35,48). CD5 (67kDa) ist ein monomeres, Typ I Membranglykoprotein. Es wird auf T-Zellen und konstitutiv auf einem Subtyp der B-Zellen, den sog. B1-Zellen exprimiert (118,121). Auf den CD5-negativen B2-Zellen kann es durch anti-IgM-Stimulation induziert werden (28). Im Zusammenhang mit der Pathophysiologie von allergischen Erkrankungen wurde CD5 noch nicht hinreichend untersucht.

Auch CD32 ist mit dem BZR assoziiert. CD32 (Fc $\gamma$ R-II) ist als niedrig affiner Fc-Rezeptor für IgG der einzige Fc $\gamma$ -Rezeptor, der auf B-Lymphozyten exprimiert wird (50). Es ist ein monomeres, transmembranes Protein mit einem Molekulgewicht von 40 kDa und gehört wie alle Fc-Rezeptoren bis auf CD23 (niedrig affiner IgE-Rezeptor) zur Immunglobulinsuperfamilie.

Neben dem BZR ist HLA-II das wichtigste Molekül für die Ag-Präsentation, da die Antigenfragmente an HLA-II gebunden werden und so auf der Oberfläche präsentiert werden. Es wird auf allen APZ reichlich exprimiert, auf B-Zellen wird es durch IL-4 und IL-5 weiter hochreguliert (60). HLA-II ist ein Heterodimer aus einer schweren  $\alpha$ -Kette (30-34 kDa) und einer leichten  $\beta$ -Kette (26-29 kDa) (51). Die hochvariable Grube für die Peptidbindung wird sowohl von der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -Kette gebildet. Im Gegensatz zu HLA-I ist diese Grube relativ offen, so daß die Ag-Fragmente mit 12 – 24 Aminosäuren etwas größer sind, als diejenigen die auf HLA-I gebunden präsentiert werden.

Die TH-Zellen erkennen mit ihrem TZR spezifisch das Ag-Fragment und werden im Zusammenspiel von Ko-Rezeptoren aktiviert (27), was zur Freisetzung von Zytokinen und Hochregulierung von Oberflächenmolekülen wie z.B. CD40L führt. Nun kann die aktivierte TH-Zelle die für die Ig-Produktion notwendigen Signale den B-Zellen übermitteln.

### **2.2.2.2 Die Struktur von Immunglobulinen<sup>3</sup>**

Die Funktion von Antikörpern liegt in der Erkennung von Antigenen; Antikörper sind damit die eigentlichen Effektormoleküle der spezifischen humoralen Immunantwort.

Immunglobuline (Ig) existieren als B-Zellmembran gebundene Moleküle mit der Funktion des spezifischen B-Zellrezeptors und als in alle Körperflüssigkeiten sezernierte Moleküle. Sie bestehen aus zwei schweren (H-)Ketten mit einem Gewicht von 50-77 kDa und aus zwei leichten (L-)Ketten mit einem Gewicht von ca. 25 kDa.

Immunglobuline sind bifunktional, was sich auch in ihrer Molekülstruktur spiegelt. Der hochvariable N-terminale Abschnitt bildet die Antigen-Bindungsstelle, der C-terminale Abschnitt besitzt eine konstante Aminosäuresequenz, die die Effektorfunktionen des Ig-Moleküls bestimmen, wie z.B. die Interaktion mit Immunzellen und mit Komponenten des Komplementsystems.

Im menschlichen Immunsystem gibt es 5 verschiedene Klassen von Immunglobulinen, nämlich

---

<sup>3</sup> Die Quellen für den Abschnitt 2.2.2.2. sind, soweit nicht anders bezeichnet: (111,131,134).

IgM, IgD, IgG, IgA und IgE und einige Unterklassen (IgG1-4, IgA1,2). Im Hauptinteresse der Allergologen steht das IgE als verantwortliches Immunglobulin der Typ-I-Allergie.

Ramirez (1919) und Prausnitz, Küstner (1921) konnten nachweisen, daß allergische Reaktionen durch Blut bzw. Serum übertragen werden können. Prausnitz und Küstner nannten den vermeintlich verantwortlichen Faktor Reagin. Erst 1966 durch Ishizaka (65) und 1968 durch Johansson (71) konnte dieses Reagin als Ig identifiziert werden und wurde IgE genannt, da es nach Lokalapplikation ein Erythem der Haut bewirkt. IgE ist bei Normalpersonen nur in Spuren vorhanden (<0,001% des gesamten Ig im Serum) (111). Das IgE-Molekül besteht aus 2 leichten und 2 schweren Ketten, das Molekulargewicht beträgt 190 kDa. Die schwere Kette des IgE zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Ig durch eine zusätzliche konstante Domäne (C $\epsilon$ 4) aus (111). Über seinen Fc-Anteil mit der Domäne C $\epsilon$ 3 bindet das IgE an spezifische Rezeptoren. Die Halbwertszeit von IgE im Serum beträgt nur ca. 2-5 Tage, gebunden an seine Rezeptoren kann es aber auch noch Monate auf Mastzellen und Basophilen nachgewiesen werden. Die physiologische Rolle des IgE ist immer noch umstritten. Patienten mit Parasiteninfektionen zeigen aber einen erhöhten IgE-Spiegel, was zeigt, daß IgE in der Abwehr von parasitären Infektionen eine Rolle spielt (64).

Für diese Arbeit ist außerdem noch das IgG4-Molekül von großer Relevanz, denn ihm wird eine protektive Rolle gegen IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen zugesprochen. Dies schließt man aus der Tatsache, daß bei Patienten mit parasitären Infektionen trotz hohem IgE-Titer allergische Reaktionen selten sind (64). Bei diesen Patienten wurde nämlich ein hoher sIgG4-Spiegel bestimmt (50-95% des IgG, Normwert <4% des IgG), was zu der Hypothese der „blockierenden Antikörper“ geführt hat. Durch Entfernen von IgG4-Molekülen wurde die blockierende Eigenschaft der Seren (gemessen durch Histamin-Freisetzungs-Assays) von Patienten mit Filariasis aufgehoben (2,64,110,129). Die blockierende Eigenschaft des IgG4 kommt durch direkte Konkurrenz um die Ag-Bindung mit den Fc $\epsilon$ R-I-ständigen IgE-Molekülen zustande (110). IgG4 kann fast keine Komplementfaktoren fixieren und bindet nur mit schwacher Affinität an Fc-Rezeptoren, so daß Ag-Bindung an IgG4 keine potentiell gefährlichen Reaktionen bewirkt (2). Die These der blockierenden Antikörper wird auch als möglicher Wirkmechanismus der IT diskutiert, denn im Verlauf einer IT steigt der sIgG4-Spiegel kontinuierlich an (siehe 2.4.2.4.). Die physiologische Rolle des IgG4 ist noch nicht hinreichend verstanden, eine mögliche Funktion liegt aber, wie dargelegt, in der Regulation IgE-vermittelter Immunantworten.

### 2.2.2.3 Antikörperklassenwechsel zum IgE

Naive, reife B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche IgM- oder IgD-Moleküle. Ihre Ag-Spezifität wurde durch somatische Rekombination der VJ-Gensegmente der schweren Kette während der Reifung festgelegt. Im Laufe einer Immunantwort werden jedoch nicht mehr IgM- bzw. IgD-Antikörper gebildet, sondern Antikörper eines anderen Isotyps. Die B-Zelle muß also einen sogenannten Antikörperklassenwechsel (Isotypen-Switch) vornehmen. Dies erfolgt wiederum durch somatische Rekombination, wobei die Ag-Spezifität erhalten bleibt.

Die Gene für die konstanten Regionen (C-Region) der H-Kette liegen 3' von den VDJ-Segmenten auf dem Chromosom 14 in der Reihenfolge C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 1, C $\psi\epsilon$  (Pseudogen), C $\alpha$ 1, C $\psi\gamma$ , C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 4, C $\epsilon$ , C $\alpha$ 2 (13). Die Regionen sind in Abbildung 1 dargestellt.

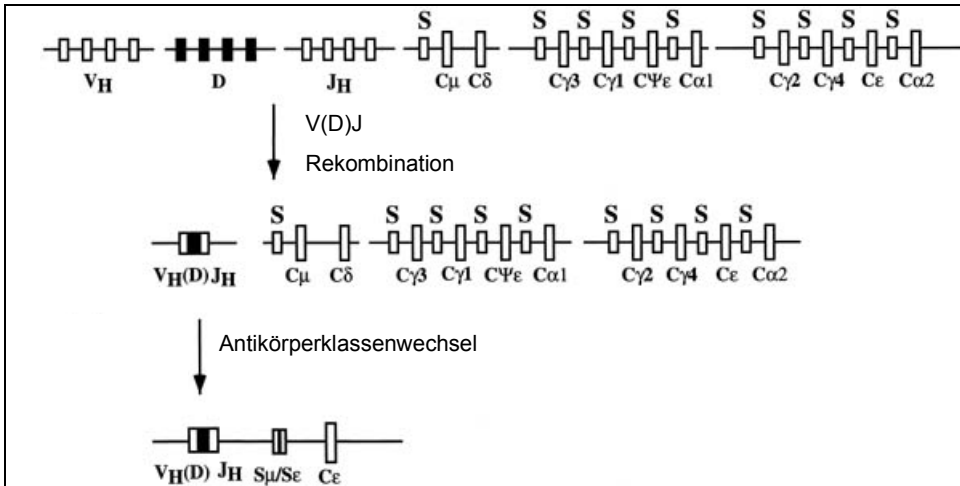


Abbildung 1: Die Gene der konstanten Regionen der Immunglobuline nach (12).

5' von diesen Regionen liegen GC-reiche Introns, sog. Switch-(S) Regionen. Eine Ausnahme bildet  $C_{\delta}$ , vor dem es keine Switch-Region gibt, denn IgD entsteht durch alternatives Spleißen des  $C_{\mu}$ - $C_{\delta}$ -Transkripts. Nach Aktivierung des Rekombinationssystems findet eine „looping-out“-Deletion statt – z.B. für einen Klassenwechsel von IgM zu IgE durch Anlagerung von  $S_{\mu}$  an  $S_{\epsilon}$  (13,108). Der Klassenwechsel kann auch sequentiell erfolgen, also z.B. von IgM über IgG4 zu IgE, wobei immer nur zu Isotypen gewechselt werden kann, deren C-Regionen 3' von den zur Zeit translatierten C-Regionen liegen.

Für den Klassenwechsel zum IgE wird derzeit ein 2-Signal-Modell diskutiert (12), wobei eine Vielzahl weiterer Faktoren, die noch nicht im einzelnen identifiziert wurden, eine Rolle spielen. Die Signale werden von den TH-Zellen den B-Zellen übermittelt. Die Interaktion des spezifischen TZR mit dem MHC-II-Ag-Komplex führt zur Sekretion von Interleukinen und zur Heraufregulation von Oberflächenmolekülen, u.a. von CD40L. Im Falle des IgE bildet das von TH2-Zellen sezernierte IL-4 bzw. IL-13 das 1. Signal zum Klassenwechsel (105,130). IL-4 bindet an den IL-4-Rezeptor, was über mehrere Phosphorylierungsschritte durch Januskinasen dazu führt, daß STAT6 (*signal transducer and activator of transcription*) einen Homodimer bildet und in den Kern gelangt (13,84). Im Kern bindet STAT6 an spezifische DNA-Sequenzen in der Promoterregion der durch IL-4-regulierbaren Gene. STAT6 bindet stromaufwärts von  $S_{\epsilon}$ , vor einer sog.  $I_{\epsilon}$ -Region und bewirkt die Transkription von den Segmenten  $I_{\epsilon}$  bis  $C_{\epsilon}$ . Nach dem Spleißen von Introns wird dieses Transkript  $\epsilon$ -Keimbahn-Transkript bzw.  $\epsilon$ -Germline-Transkript (im folgenden  $\epsilon$ -GLT) genannt. Die  $I_{\epsilon}$ -Region besitzt Stop-Codons, so daß das  $\epsilon$ -GLT nicht translatiert wird, es wird deshalb auch steriles Transkript genannt. Die genaue Wirkungsweise des  $\epsilon$ -GLT ist noch nicht bekannt, aber es könnte einen Teil des Umschalt-Rekombinasesystems bilden (13).

Das 2. Signal zur IgE-Umschaltung wird durch CD40-CD40L-Interaktion vermittelt. CD40 (45-50 kDa) ist ein Membran-Glykoprotein der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie. Es wird konstitutiv auf B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Der physiologische Ligand von CD40 ist CD40L, das auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird (27,31). Die CD40-CD40L-Interaktion bewirkt neben einer Heraufregulation verschiedener B-Zellrezeptoren die Deletion der DNA-Region zwischen  $S_{\mu}$  und  $S_{\epsilon}$  durch „loop-out“-Deletion. Somit gelangt das VDJ-Segment in die Nähe des  $C_{\epsilon}$ -Segmentes. Nach Transkription und Spleißen entsteht das reife DNA-Transkript, was nun translatiert werden kann (13).

Neben den beiden Hauptsignalen zur Umschaltung zu IgE, der CD40-CD40L-Interaktion und IL-4 bzw. IL-13, spielen eine Reihe kostimulatorischer Moleküle u.a. CD23, CD54 und CD86 eine wichtige Rolle bei der IgE-Regulation (11,67,76). CD23 ( $Fc_{\epsilon}$ -RII) gehört als einziger Fc-Rezeptor nicht zur Immunglobulinsuperfamilie, sondern ist ein transmembranes Glykoprotein und ist Mitglied der Lectin-Familie der Adhäsionsmoleküle (19). Es wird von Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten exprimiert. Auf B-Lymphozyten wird es durch IL-4 induziert und durch  $IFN-\gamma$  inhibiert (18,78). Neben der membrangebundenen Form (mCD23) kommt es auch

in löslicher Form (sCD23) vor (132). CD23 ist nicht nur ein IgE-Rezeptor, sondern hat weitere physiologische Liganden (CD21, Mac-1 (CD11b/CD18) und p150,95 (CD11c/CD18)), was seine vielfältigen immunmodulatorischen Effekte erklärt (19). Die Wirkung des CD23 auf die IgE-Synthese ist komplex (24,30,113,132); sowohl fördernde (11,18) als auch inhibitorische Effekte (26) wurden beschrieben.

Als weiteres Oberflächenmolekül scheint CD86 eine Rolle bei der IgE-Regulation zu spielen (67). CD86 (B7.2), ein transmembranes Protein der Immunglobulin-Superfamilie, ist als Ligand von CD28 und CTLA-4 ein wichtiges kostimulatorisches Molekül für die T-Zellaktivierung (27,100,137). CD86 wird auf professionellen APZ konstitutiv exprimiert, auf ruhenden B-Zellen nur schwach; nach Aktivierung wird es aber schnell hochreguliert. Es wurde ein agonistischer anti-CD86-Antikörper beschrieben, der die IL-4/CD40 induzierte IgE- und IgG4-Synthese verstärkt (67). Die Bindung des anti-CD86 führte zu einer gesteigerten B-Zellproliferation, einer vermehrten CD23-Expression und einem leichten Anstieg der CD54-Expression. Die gesteigerte IgE- und IgG4-Produktion durch anti-CD86 wurde durch blockierende anti-CD23-AK dosisabhängig gehemmt und weist darauf hin, daß der Effekt des CD86 auf einer Steigerung der CD23-Expression beruht (67).

Auch das Adhäsionsmolekül CD54 scheint einen Einfluß auf die IgE-Produktion zu haben. CD54 oder *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert (128). Die Hauptfunktion des CD54 liegt in der Vermittlung von reversiblen, spezifischen Zell-Zell-Bindungen. CD54 wird sehr zellspezifisch reguliert, auf Monozyten z.B. wird die Expression u.a. von IFN- $\gamma$  induziert und von IL-10 inhibiert (13,133). Auf B-Lymphozyten wird es u.a. durch IL-4 und nach CD40-CD40L-Interaktion induziert (42). Auf APZ, so auch B-Zellen, wird CD54 in Assoziation mit MHC-II exprimiert und wirkt als kostimulatorisches Molekül bei TH-Aktivierung, z.B. durch Induktion von weiteren Kostimulatoren (B7, Interleukin-Rezeptoren) (60). Durch anti-CD54-AK wurde die durch IL-4 und anti-CD40-AK induzierte IgE-Produktion gefördert und zwar durch erhöhte Konzentration des  $\epsilon$ -Keimbahn-Transskripts (76).

Das wachsende Wissen über die molekularen Prozesse der IgE-Regulation kann dazu beitragen, neue therapeutische Ansätze für IgE-vermittelte Erkrankungen zu entwickeln (siehe hierzu: (14)).

## **2.3 Wespengiftallergie**

### **2.3.1 Entomologie (Insektenkunde)**

#### **2.3.1.1 Systematische Einteilung der Hymenopteren**

Durch Stiche vieler Insektenarten werden beim Menschen Reaktionen hervorgerufen. Die toxische Wirkung von Insektengiften ist lokal begrenzt und führt nur in Ausnahmefällen zu ernst zu nehmenden, gesundheitsgefährdenden Situationen. Medizinisch viel bedeutsamer sind allergische Reaktionen gegenüber bestimmten Bestandteilen von Insektengiften.

In unseren Breitengraden sind v.a. Vertreter der Familien *Vespidae* und *Apidae* Auslöser von Allergien, sie gehören zur Ordnung der Hymenopteren (Hautflügler). Die wichtigste Rolle unter den Vespidae spielen dabei die Arten *Vespula germanica* (deutsche Wespe) und *V. vulgaris* (gemeine Wespe), die im folgenden als Wespen bezeichnet werden (124).

Die Artenverteilung zeigt weltweit regionale Unterschiede, so werden im Süden der USA ein großer Anteil der allergischen Reaktionen durch stechende Ameisen verursacht, die in Europa nicht heimisch sind und demzufolge bei uns auch keine medizinische Bedeutung haben (104).

Ein Überblick über die Systematik der Hymenopteren gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Systematische Stellung einiger Hymenopteren (nach Przybilla (104) und Storch (124)).

Familie	Unterfamilie	Gattung	Art
Apidae		Apis	A. mellifera (Honigbiene)
		Bombus (Hummel)	B. spp
Vespidae (Faltenwespe)	Vespinae	Vespa (Papierwespe)	V. crabro (Hornisse)
		Vespula (Kurzkopfwespe)	V. germanica V. vulgaris
		Dolichovespula (Langkopfwespe)	D. spp
	Polistinae	Polistes (Feldwespe)	P. spp
Formicidae (Ameisen)	Myrmicinae	Solenopsis (Feuerameise)	S. spp
		Pogonomyrmex	P. spp

### 2.3.1.2 Zusammensetzung des Wespengiftes

Hymenopterengifte sind komplex zusammengesetzt, sie bestehen aus biogenen Aminen, Peptiden und Proteinen, von denen die meisten enzymatisch wirksam sind (41,61,62). Einige Inhaltsstoffe sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die übertragende Menge Gift pro Stich schwankt bei Wespen stark und ist abhängig vom Alter des Insekts, der Jahreszeit, der Dauer des Stichs und dem zeitlichen Abstand zum letzten Stich. Wespen können auch ihr Gift bei Gefahr in die Luft sprühen. Diese Faktoren sind Unsicherheitsfaktoren bei Stichprovokationen und könnten die selteneren systemischen Reaktionen nach Wespenstichprovokationen im Vergleich zu Bienenstichprovokationen erklären (92).

Da Wespengift überwiegend aus Proteinen besteht, wird es durch die Angabe des Eiweißstickstoffgewichts in  $\mu\text{g}$  quantifiziert. Die Angaben pro Stich schwanken von 1,7-3,1  $\mu\text{g}$ /Stich (62) bis 3-10  $\mu\text{g}$ /Stich (104), liegen aber weit unter der Giftmenge von Bienen (59  $\mu\text{g}$  Hoffman, 50-100  $\mu\text{g}$  Przybilla).

Zur Herstellung der Wespengiftextrakte für Diagnostik und Therapie wird das Gift aus den Giftsäcken der Wespen isoliert und gereinigt. Die Präparate werden im Hinblick auf den Gehalt an Allergenen und ihre biologische Gesamtaktivität standardisiert (96).

Die Allergene werden in Major - und Minorallergene nach der Häufigkeit eingeteilt, mit der in Patientenserum IgE-Antikörper gegen die entsprechenden Allergene gefunden werden. Zu den Majorallergenen des Wespengifts gehören die Phospholipase A und B, das Antigen 5 und Antigen 24-25, zu den Minorallergenen die Saure Phosphatase, Hyaluronidase und die Proteasen (96).

Für die toxischen Effekte des Wespengiftes sind v.a. die Peptide und biogenen Amine verantwortlich; z.B. das Histamin, das immerhin 4% des Trockengewichts ausmacht, welches bekanntlich gefäßerweiternd wirkt und dadurch Ödem und Schmerz verursacht.

Tabelle 2: Wespengiftbestandteile und einige Eigenschaften nach (34,41)

Bestandteile	Prozent des Trockengewichts	Molekulargewicht (Dalton)	Eigenschaften
Hyaluronidase	2	45000	Proteolyse
Phospholipase A	0,4	35000	Zytolyse
Phospholipase B			
Saure Phosphatase			
Alkalische Phosphatase			
Proteasen			
Antigen 5	15	25000	
Hämolytische Bestandteile		~6000	Zytolyse
Wespenkinin 1,2		~2000	Vasodilatation, gesteigerte Vasopermeabilität
Histamin	4	111	Vasodilatation, Bronchokonstriktion
Serotonin		176	
Dopamin		153	
LTB <sub>4</sub>		336	Leukozytenchemotaxin
LTC <sub>4</sub>		625	Bronchokonstriktion, Mukussekretion, Vasodilatation

## 2.3.2 Epidemiologie

### 2.3.2.1 Prävalenz

Die Ermittlung der Prävalenz der Insektengiftallergie kann auf anamnestischen Angaben oder diagnostischen Tests beruhen. Bei beiden Möglichkeiten gibt es viele Unsicherheitsfaktoren, die zu berücksichtigen sind. So sind Anamnesen immer subjektiv und vom Fragebogen bzw. dem Untersucher abhängig, diagnostische Tests dagegen zeigen lediglich die Sensibilisierung von Personen, nicht aber ihre klinische Relevanz auf. Aus diesen Gründen gibt es starke Schwankungen bezüglich der Angaben über die Prävalenz.

Die Häufigkeit eines positiven Testergebnisses (detektierbares Insektengift-spezifisches IgE, positiver Hauttest) liegt zwischen 12-18% (25,96), bei einer Studie in einem ländlichen Gebiet im Südosten Spaniens waren 20,4% der unselektierten Stichprobe RAST positiv (44).

Die Prävalenz der Insektengiftallergie liegt nach anamnestischen Angaben über systemische Reaktionen nach Insektenstichen zwischen 0,35-5% (25,96), je nach Population und Befragungsart. Diese Unterschiede sind teilweise bedingt durch methodische Differenzen und das Expositionsrisiko, was u.a. von der Insektdichte (in Mittel- und Südeuropa höher als in Großbritannien und Skandinavien, in ländlichen Gegenden höher als in der Stadt) abhängt.

### **2.3.2.2 Mortalität**

Die Mortalität der Insektengiftallergie ist gering, sie liegt zwischen 0,09-0,45 Todesfälle pro Million Einwohner und Jahr (96). Ca. 95% dieser Todesfälle erfolgen nach einem oder wenigen Stichen, die große Mehrheit ist also allergisch bedingt. Die meisten Todesfälle treten im höheren Lebensalter auf (nach Müller 71% der Todesfälle bei über 40 jährigen Patienten (96)), obwohl das Expositionsrisiko bei Kindern höher ist. Dies ist u.a. auf die höhere Wahrscheinlichkeit zurückzuführen, an kardiovaskulären oder pulmonalen Grunderkrankungen zu leiden. Die überwiegenden Stiche mit tödlichem Ausgang geschehen im Kopf- Halsbereich, wobei hier auch ein nicht-allergischer Pathomechanismus mitbeteiligt sein kann. Die Dunkelziffer insektengiftallergisch bedingter Todesfälle scheint recht hoch zu sein; so wurde in mehreren Studien ein im Vergleich zur Normalbevölkerung hoher Grad an Sensibilisierung gegen Insektengift bei unerwarteten Todesfällen ermittelt (25,96). Die Mastozytose als prädisponierender Faktor kann ebenfalls zu tödlichen Reaktionen auf Hymenopterenstiche führen. Dabei muß nicht notwendigerweise eine Allergie vorliegen, sondern die massive Mastzellmediator-Freisetzung aufgrund der in den Giften enthaltenen unspezifischen Mastzellliberatoren kann allein verantwortlich sein (46,94,97).

### **2.3.3 Klinik der Wespengiftallergie**

#### **2.3.3.1 Reaktionsformen auf Hymenopterenstiche**

Hymenopterenstiche lösen beim Menschen Reaktionen aus, die lokal begrenzt sein können oder sich systemisch ausbreiten. Die physiologische Stichreaktion ist eine Lokalreaktion, die aus einer auf die Stichstelle begrenzten juckenden, schmerzhaften, erythematösen Schwellung besteht, hervorgerufen durch die obligat toxischen Substanzen aus dem Gift. Große Lokalreaktionen können auch eine gesamte Extremität einbeziehen, breiten sich aber von der Stichstelle her aus. Systemische Reaktionen sind von der Stichstelle entfernte Reaktionen, z.B. Lidödem bei einem Stich in den Arm oder Allgemeinreaktionen wie generalisierte Urtikaria, Übelkeit bis hin zum Schock (43,104,138).

Diesen Reaktionen liegen verschiedene Pathomechanismen zugrunde. Die Lokalreaktionen werden durch zytotoxische und neurotoxische Substanzen des Giftes ausgelöst. Bei besonders ungünstiger Lokalisation, v.a. in den oberen Luftwegen, können die Toxine eines einzelnen Stiches zu lebensgefährlichen Situationen führen, wie z.B. ein Larynxödem bei Stich in den Mund. Bei besonders vielen Stichen kann die Toxinwirkung aber auch zu gefährlichen Allgemeinreaktionen wie Rhabdomyolyse und Hämolyse führen, die eine Niereninsuffizienz auslösen können (104). Auch Leberparenchymschäden mit Ikterus und Gerinnungsstörungen sind beschrieben worden. Systemische Reaktionen sind allerdings fast immer durch eine Typ-I-allergische Reaktion bedingt (96).

#### **2.3.3.2 Erscheinungsbild der Wespengiftallergie**

Die klinische Symptomatik der systemischen anaphylaktischen Reaktion (SAR) ist vielfältig. Die Manifestationsorte sind die Haut (generalisierte Urticaria, Pruritus, Angioödem, Flush), der Gastrointestinaltrakt (Übelkeit, Erbrechen), das respiratorische System (Atemnot, Larynxödem, allergisches Lungenödem) und das kardiovaskuläre System (Blutdruckabfall, Schwindel, Herzrhythmusstörungen, Bewußtlosigkeit). Die Symptome beginnen meist innerhalb weniger Minuten nach dem Stich und können nach Abklingen wenige Stunden später noch einmal auftreten.

Die Ausprägung der Symptome reicht von milden Allgemeinreaktionen bis zum Vollbild des anaphylaktischen Schocks, der ohne sofortige intensivmedizinische Intervention zum Tod führen kann. Die Einteilung nach dem Schweregrad der SAR kann nach verschiedenen Skalensystemen erfolgen, in unserer Klinik wird eine modifizierte Klassifikation nach Müller angewandt (123).

Tabelle 3: Einteilung des Schweregrads der SAR modifiziert nach Müller (123).

Müller Grad	Reaktion
0	Starke Lokalreaktion (>10 cm, Dauer >24 h)
I	generalisierte Urticaria, Pruritus, Übelkeit
II	Beliebige Symptome aus I und: Angioödem, Engegefühl, Erbrechen, Durchfall, Schwindel
III	Beliebige Symptome aus I-II und: Atemnot, Giemen, Stridor, Dysphagie, Dysarthrie, Heiserkeit, Schwäche, Benommenheit, Todesangst
IV	Beliebige Symptome aus I-IV und: Blutdruckabfall, Kollaps, Bewußtlosigkeit, Inkontinenz, Zyanose, Atem-, Kreislaufstillstand

### 2.3.4 Diagnostik der Wespengiftallergie

Die Diagnose einer Wespengiftallergie wird aufgrund der Anamnese, der Hauttests und der *in vitro* Bestimmung des Wespengift-spezifischen IgE gestellt.

#### 2.3.4.1 Anamnese

In der Anamnese sollte soweit möglich das krankheitsverursachende Insekt identifiziert werden. Die Angabe, das der Stachel in der Haut steckte, erhöht zwar die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um einen Bienenstich handelte, ist aber keineswegs ein sicherer Hinweis. Deshalb sollte man u.a. den Zeitpunkt des Stiches (Frühling/Frühsummer eher Biene, Spätsommer/Herbst eher Wespe) und den Ort (ländliche Gebiete eher Biene, Stadt eher Wespe) mitberücksichtigen.

Ein weiteres Ziel der Anamnese sollte die Klassifizierung der Reaktion sein. Hierzu müssen die Symptome genau beschrieben werden und mit Hilfe einer Klassifizierungsskala z.B. nach Müller (123) eingeteilt werden. Des weiteren sollten Reaktionen auf frühere Stiche, das Expositionsrisiko (Imker, Bäcker, Gartenarbeit etc.), die psychische Belastung (Angst vor erneutem Stich) und andere allergische Erkrankungen (Atopiestatus) erfragt werden. In der allgemeinen Anamnese müssen Faktoren, die systemische Reaktionen beeinflussen können, herausgearbeitet werden, so ev. bestehende kardiovaskuläre oder respiratorische Grunderkrankungen, und Einnahme von Medikamenten wie ACE-Hemmer oder  $\beta$ -Blocker (96,104,138). Da Patienten sich einer Mastozytose nicht immer bewußt sind, sollte neben der entsprechenden Anamnese auch eine Inspektion der Haut erfolgen.

#### 2.3.4.2 Hauttest

Zur weiteren Abklärung einer allergischen Reaktion sollte ein Hauttest durchgeführt werden. Der Hauttest zeigt die Sensibilisierung des Patienten auf das entsprechende Allergen, durch Titrierung wird auch eine Quantifizierung der Sensibilisierung möglich. Die Testung sollte nicht früher als 2 Wochen nach dem Stichereignis erfolgen, da die Hautmastzellen nach einer Allgemeinreaktion Zeit zur Regeneration benötigen, und möglichst innerhalb eines Jahres, da die Hauttestempfindlichkeit mit zunehmendem Abstand zum Stichereignis abnimmt (96).

Es eignet sich sowohl ein Intrakutantest als auch ein Pricktest, wobei beim Pricktest eine höhere Gifkonzentration benutzt werden muß. In unserer Klinik wird ein Pricktest mit Endpunkttitration benutzt, wobei in 20-minütigen Intervallen eine Pricktestung mit 1, 10, 100 und 300  $\mu$ g Giftextrakt durchgeführt wird. Eine Quaddel  $\geq$  5mm Durchmesser wird als positiv bewertet. Falsch-negative Testergebnisse können durch einen schlecht gewählten Zeitpunkt der Untersuchung oder durch Medikamente, die die Hauttestempfindlichkeit herabsetzen (Antihistaminika, einige Neuroleptika) bedingt sein (96). Die Auswahl des falschen Giftes

aufgrund falscher bzw. fehlender Identifizierung des Insektes ist auch eine häufige Fehlerquelle.

Falsch-positive Werte ergeben sich je nach Studie bei 20-46% der Normalpersonen (96), wobei zu berücksichtigen ist, daß sich „Normalpersonen“ beim letzten reaktionslos vertragenen Stich sensibilisiert haben könnten.

#### **2.3.4.3 Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper**

Die nächste Säule der Diagnostik der Insektengiftallergie sind *in vitro*-Tests und zwar v.a. die Bestimmung Insektengift-spezifischer IgE-Antikörper (sIgE) im Serum.

Bisher wurde der RAST (radio allerge sorbent test) verwendet, es konnte allerdings eine höhere Sensitivität des CAP-Tests nachgewiesen werden (69), so daß sich dieser Test in der Routine durchgesetzt hat.

Wie die Hauttestreaktionen sind auch die sIgE-Werte zeitabhängig; so werden kurz nach der allergischen Allgemeinreaktion niedrige IgE-Spiegel gemessen (96). Es wird angenommen, daß das IgE in der Allgemeinreaktion verbraucht wird. Nach ca. 2-3 Wochen sind wieder hohe IgE-Titer detektierbar, die im Laufe von Monaten bis Jahren wieder abfallen. Rieger-Ziegler et al (109) haben bei 12 von 13 Bienengiftallergikern und 14 von 18 Wespengiftallergikern schon in den ersten 2 Wochen nach der Reaktion sIgE detektiert, bei den Wespengiftallergikern stieg das sIgE bei einer ca. 5 Wochen späteren erneuten Bestimmung signifikant an. Man kann also die sIgE-Bestimmung schon früh nach der allergischen Reaktion durchführen, sollte sie aber bei Test-negativen Personen nach einigen Wochen wiederholen.

Zusammenfassend ist zu den diagnostischen Tests zu bemerken, daß die Tests zwar gut zwischen Patienten mit positiver Anamnese und Normalpersonen unterscheiden, ihr prädiktiver Wert allerdings unbefriedigend ist. So reagierten nur 20-50% der Testpositiven bei späteren Stichen wieder systemisch (96). Bei Hauttest und IgE-Bestimmung konnte keine Korrelation zwischen Hauttestschwelle bzw. Höhe des sIgE-Titers und dem Schweregrad der systemischen Reaktion gefunden werden. Abschließend zur Diagnostik der Insektengiftallergie ist zu bemerken, daß eine Insektengiftallergie nur besteht bei einer allergischen Reaktion nach einem Stich und Nachweis der Sensibilisierung entweder im Hauttest oder durch Nachweis des spezifischen IgE.

#### **2.3.5 Notfalltherapie**

Die Behandlung des durch einen Insektenstich ausgelösten anaphylaktischen Schocks richtet sich nach dem Schweregrad der anaphylaktischen Reaktion. Neben den Allgemeinmaßnahmen beim Schock (Lagerung, Überwachung der Vitalfunktionen, i.v.-Zugang) sind folgende Maßnahmen gemäß der Tabelle indiziert:

Tabelle 4: Notfallmaßnahmen zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen nach (57).

Grad	Klinik	Therapie
I	Ödeme, Erythem Juckreiz	Allergenexposition stoppen Antihistaminika Kreislaufüberwachung bis zur Besserung
II	Zusätzlich: Übelkeit, Erbrechen, Bronchospastik, Tachykardie, Blutdruckabfall	Zusätzlich: O <sub>2</sub> -Gabe Volumensubstitution Glukokortikoide Bei Bronchospastik: inhalativ $\beta$ 2-Mimetika
III	Zusätzlich: Schock, schwere Bronchospastik, Koma	Adrenalin
IV	Kreislauf- und Atemstillstand	Kardiopulmonale Reanimation

Patienten mit systemischen Reaktionen sollten während der Flugphase der Insekten immer ein Notfallset bestehend aus oralem Antihistaminikum, oralem Glukokortikoid und Adrenalinaerosol oder –Injekt bei sich tragen. Sie sollten einer weiterführenden Diagnostik zugeführt werden und bei gesicherter Insektengiftallergie über die Möglichkeit der spezifischen Immuntherapie aufgeklärt werden.

## 2.4 Spezifische Immuntherapie

### 2.4.1 Klinische Aspekte der spezifischen Immuntherapie

#### 2.4.1.1 Therapieprinzip

Die spezifische Immuntherapie (IT) ist die einzige kausale Therapie zur Behandlung IgE-vermittelter Allergien. 1911 wurde die Therapie von Noon und Freeman für die Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis eingeführt. Das Prinzip der IT, im deutschen Sprachgebrauch auch Hyposensibilisierungstherapie genannt, ist seit ihrer Einführung gleich geblieben: aufsteigende Dosen des Allergenextrakts werden subkutan injiziert. In den 20-30er Jahren wurde die Immuntherapie auch für Insektengiftallergiker etabliert. Allerdings wurden bis in die 70er Jahre Ganzkörperinsektenextrakte benutzt, bis die Überlegenheit von Giftextrakten bewiesen wurde (63).

Es gibt verschiedene Therapieschemata zur Einleitung einer IT. Bei dem konventionellen Therapieschema wird die Erhaltungsdosis von 100  $\mu$ g erst nach ca. 3-4 Monaten erreicht, bei den Schnellhyposensibilisierungen wird sie je nach Schema innerhalb von 2 Tagen (22) bis 4 Tagen (96), in unserer Klinik nach 5 Tagen erreicht. Die Einleitungsbehandlung erfolgt stationär, da systemische Reaktionen nicht auszuschließen sind und auch mit Spätreaktionen (>6h) zu rechnen ist. Durch die Schnell-IT-Schemata ist schon nach kurzer Zeit ein Schutz vor allergischen Reaktionen vorhanden (89), was insbesondere bei besonders exponierten Personen (z.B. Imker, Bäcker, Kinder) und während der Flugphase der Insekten im Sommer wünschenswert ist. Nach der Einleitungsphase folgt die Erhaltungsphase, in der über 3-5 Jahre monatliche Injektionen von 100  $\mu$ g verabreicht werden.

### 2.4.1.2 Wirksamkeit

Die Wirksamkeit einer Behandlungsmethode muß anhand klinischer Parameter ermittelt werden, wobei im Falle der IT bei z.B. Rhinitikern ein Symptomenscore während der Saison und die Menge an benötigten Medikamenten benutzt wird (88). Bei der Insektengiftallergie ist die Verbesserung der klinischen Symptomatik schwer zu ermitteln, so daß in den vorhandenen Studien die Reaktionen entweder nach sog. Feldstich oder nach Stichprovokation untersucht wurden. Beide Möglichkeiten ziehen Probleme nach sich, so ist z.B. die sichere Identifikation des stechenden Insekts eine mögliche Fehlerquelle bei Feldstichen. Auch die Stichprovokationen sind insbesondere bei Wespenstichen problematisch, da die Giftmenge pro Stich stark schwankt (92). Dennoch wurde übereinstimmend in zahlreichen Studien eine hohe Effizienz der Insektengiftimmuntherapie ermittelt, meist zwischen 80-95% (52,56,83,95). Dabei scheinen Wespengiftallergiker durch Wespengift IT besser geschützt zu werden (>90%) als Bienengiftallergiker durch Bienengift IT (75-80%) (52,83,92).

### 2.4.1.3 Nebenwirkungen

Der einzigen wirksamen Prophylaxe vor lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen nach Insektenstichen stehen die Risiken einer Immuntherapie gegenüber, v.a. die Möglichkeit einer wiederum lebensbedrohlichen systemischen Reaktion nach der Injektion. Deshalb wurde in vielen Studien das Auftreten von systemischen Reaktionen während der IT untersucht. In einer Studie von Golden et al (54) hatten 16 Prozent der Patienten systemische Reaktionen. In der sehr umfangreichen „*Hymenoptera Venom Study*“ (85), die 1979 von dem „*Committee on Insects of the American Academy of Allergy and Immunology*“ begonnen wurde, traten in 12% der 1410 Patienten, die eine IT erhielten, systemische Reaktionen auf. Von diesen systemischen Reaktionen waren 59% mild entsprechend Grad I, 32% Grad II und nur 9% schwere systemische Reaktionen. Neben diesen sehr ernst zu nehmenden systemischen Reaktionen sind die häufigsten Nebenwirkungen der IT ausgeprägte Lokalreaktionen, die bei 30-50% der Patienten auftreten (54,135). Sie bedürfen in der Regel keiner Dosisminderung oder Unterbrechung der Therapie und können durch orale Antihistaminika und/oder Kälteapplikation therapiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Kopplung der Allergene an Aluminiumhydroxid die Nebenwirkungsrate vermindert (135). Durch die verbesserte Standardisierung der Allergenextrakte (seit dem WHO Position Paper von 1998 (20) auch Allergenvakzine genannt) konnte die Sicherheit der Therapie erhöht werden.

### 2.4.1.4 Indikation

Die spezifische IT sollte nur nach strenger Prüfung der Indikationsstellung begonnen werden. Das Risiko, bei erneutem Stich wieder systemisch zu reagieren, korreliert positiv mit der Schwere der allergischen Reaktion und mit dem Alter. So beträgt es bei erwachsenen Patienten mit schweren SAR 50-60%, bei Patienten mit leichten SAR 15-30% und bei Patienten mit großen Lokalreaktionen nur weniger als 5% (95). In dem Positionspapier der EAACI gilt als absolute Indikation der IT nur die Kombination aus schweren SAR und positivem diagnostischen Test (95). Eine IT bei Patienten mit leichteren SAR wird nur empfohlen bei erhöhter Exposition und bei Patienten, die sich durch die Angst vor erneutem Stich stark in ihrer Lebensqualität eingeschränkt fühlen.

Da Kinder weniger gefährdet sind, erneut systemisch zu reagieren, sollte die Indikation noch strenger geprüft werden. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß Kinder durch ihr Verhalten einem erhöhten Expositionsrisiko unterliegen und die Benutzung des Notfallsets nicht immer gewährleistet ist.

Eine Indikationsstellung zur IT ist nicht gegeben, wenn die IgE-Abhängigkeit nicht bewiesen wurde, sowie bei Patienten, die ausschließlich mit ausgeprägten lokalen oder atypischen Reaktionen (Vaskulitis, Fieber) auf einen Stich reagiert haben.

Abschließend ist zu bemerken, daß die IT die einzige kausale Therapie einer potentiell vitalbedrohlichen allergischen Reaktion ist. Die Indikation zu dieser Therapie ist sorgfältig abzuwägen und individuelle Faktoren wie Alter, Compliance, Expositionsrisiko und Einschränkung der Lebensqualität sind zu berücksichtigen.

## **2.4.2 Immunologische Parameter im Verlauf der IT**

Obwohl die Wirksamkeit der IT bei Insektengiftallergikern in zahlreichen Studien hinreichend belegt ist, sind die Mechanismen, die zu der Hyposensibilisierung der Patienten gegen das spezifische Allergen führt, trotz intensiver Bemühungen noch nicht vollständig verstanden. Die IT bietet ein sehr gutes Modell, immunologische Mechanismen beim Menschen *in vivo* zu erforschen, denn die Allergenvakzine ist bestmöglich standardisiert, und auch das Patientengut wird nach strengen Indikationen selektioniert. So bietet die IT die Möglichkeit, Grundlagenwissen der Immunologie und Allergologie *in vivo* zu generieren und auf dieser Basis die Therapie weiter zu verbessern. In zahlreichen Studien sind verschiedene immunologische Parameter im Verlauf der IT untersucht worden.

### **2.4.2.1 Effektorzellen und Mediatorsekretion**

Die Auswirkungen der IT auf die Endorganantwort wurde v.a. bei atopischen Patienten umfassend untersucht. So wurde eine verminderte bronchiale und nasale Reaktion nach Provokationstest mit den entsprechenden Allergenen festgestellt (33); dies kann sowohl durch eine verminderte Mediatorfreisetzung (33,81) als auch durch eine reduzierte Migration von Effektorzellen in das allergisch entzündliche Gewebe (zusammengefaßt in (39)) bedingt sein. Auch bei Insektengiftallergikern wurde eine verminderte Mediatorsekretion durch Effektorzellen beschrieben. Pierkes et al (103) haben die Sekretion von Histamin und Sulfidoleukotrienen durch periphere Blutleukozyten von Wespengiftallergikern nach Einleitungsphase einer Schnell-VIT (VIT: venom IT = Insektengift IT) untersucht und konnten eine verminderte Allergen-induzierte Freisetzung feststellen.

Die Zellinfiltration während der VIT in Hautareale der Lokalreaktionen am Applikationsort, die bei vielen Patienten auftreten, wurde von Jung et al (72) untersucht. Es wurde in Hautbiopsien von Patienten mit mindestens 2 Jahren VIT eine verringerte Zellinfiltration von CD4+-, CD23+-Zellen und aktivierten Eosinophilen beobachtet.

### **2.4.2.2 Proliferationshemmung von peripheren mononukleären Blutzellen**

Die Proliferation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach Allergenstimulation nimmt im Laufe der IT ab. Dies wurde sowohl bei Insektengiftallergikern (3,15,74,91), als auch bei Patienten mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises (40,82) gezeigt. Besonders elegant wurde die Allergenspezifität der IT von Lack et al (82) untersucht. In dieser Studie wurde an Kindern, die sowohl gegen Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Dpt) als auch gegen Katzenepithelien sensibilisiert waren, eine IT ausschließlich mit Dpt-Extrakten durchgeführt. Die Proliferation der PBMC nach Dpt-Stimulation war nach Erreichen der Erhaltungsdosis stark verringert, im Gegensatz zu Katzenallergenextraktstimulation.

Segura et al (117) haben dagegen eine allergenunspezifische T-Zellinaktivierung nach VIT festgestellt. In dieser Studie wurde allerdings nicht die Proliferation sondern die Expression von CD69, einem T-Zellaktivierungsmarker, auf der Oberfläche PLA-depletierter, also allergenunspezifischer T-Zellen gemessen und nach 5 Tagen VIT eine deutlich reduzierte CD69-Expression ermittelt.

### **2.4.2.3 Effekte der VIT auf T-Zellen**

In den letzten Jahren konzentrierten sich viele Studien auf die funktionellen Veränderungen der T-Lymphozyten während der IT, da die Bedeutung der regulatorischen Funktionen der TH-Zellen auf die Trias der allergischen Effektorzellen – IgE-produzierende B-Zellen, Mastzellen / Basophile und Eosinophile – immer besser verstanden wurde (101).

T-Lymphozyten lassen sich anhand von Oberflächenmolekülen in CD4+-T-Helferzellen und CD8+-T-zytotoxische-Zellen einteilen. Die CD4+-TH-Zellen lassen sich weiter anhand von Zytokinmustern, die sie sezernieren, in TH1-Zellen und TH2-Zellen unterteilen. Das TH1/TH2-Modell wurde von Befunden an Mäusen abgeleitet und ist nur mit Einschränkungen auf den Menschen übertragbar (zusammengefaßt in (86,101)). TH1-Zellen produzieren v.a. IL-2, TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  und sind für die Phagozyten-vermittelte Abwehr von intrazellulären Erregern zuständig. TH2-Zellen dagegen produzieren v.a. IL-4, IL-5 und IL-13. IL-4 und IL-13 sind - wie

oben erläutert - für die Produktion von IgE und IgG4 notwendig und IL-5 bewirkt die Aktivierung und verlängerte Lebenszeit von Eosinophilen. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Zytokine der TH1- bzw. TH2-Immunantwort.

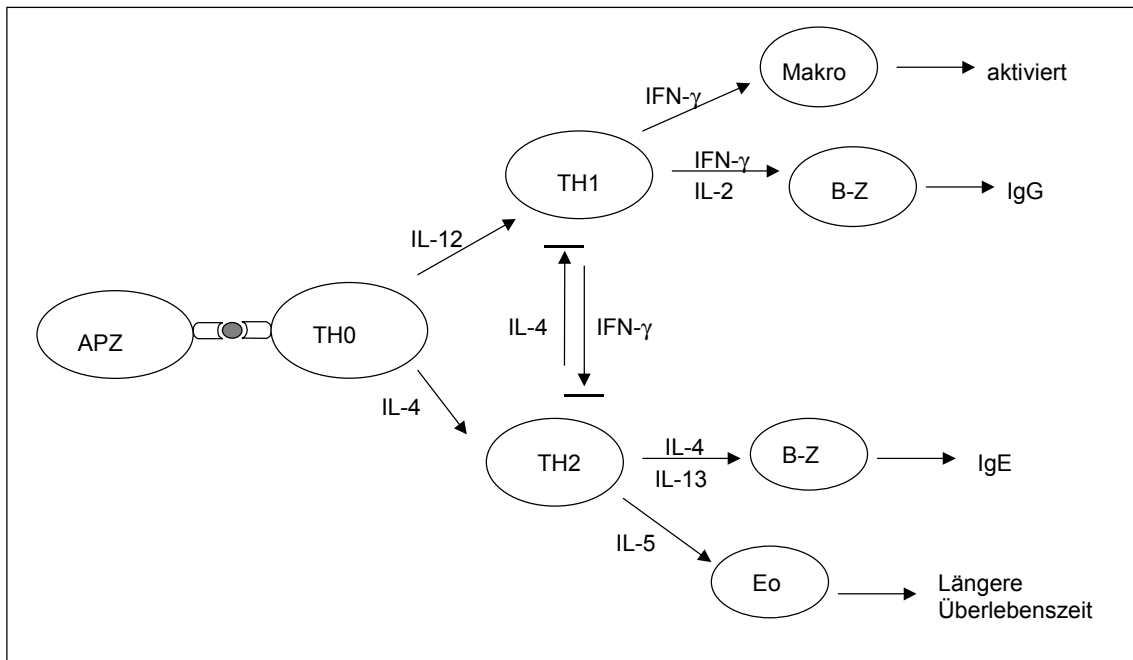


Abbildung 2: Dichotomie der TH-Antwort. (B-Z: B-Zelle, Eo: Eosinophiler Granulozyt, Makro: Makrophage)

Die physiologische Bedeutung der TH2-Antwort liegt v.a. in der Abwehr von parasitären Erkrankungen, aber auch während der Schwangerschaft stellt ein Überwiegen von TH2-Zellen die gewünschte physiologische Situation dar, um eine mögliche zytotoxische Reaktion gegen die Plazenta zu unterdrücken (131). Da in der westlichen Welt parasitäre Infektionen selten geworden sind, ist die TH2-dominierte Immunantwort v.a. in der Allergologie relevant.

Einer der zentralen Mechanismen der IT scheint die Verschiebung der allergenspezifischen TH2-Antwort in Richtung TH1-Antwort zu sein. Während eine reduzierte Sekretion von TH2-Zytokinen recht einheitlich in der Literatur beschrieben wird, gibt es bezüglich der TH1-Zytokine widersprüchliche Ergebnisse. So wurde sowohl ein Anstieg von IFN- $\gamma$  (8,15,74) als auch eine Reduktion (3,91,117) während der IT gemessen.

Bei Bienengiftallergikern wurde nach einer Woche Schnell-VIT eine reduzierte IL-4- und IL-5-Sekretion und eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Allergenstimulation auf Proteinebene ermittelt (74). Auf mRNA-Ebene wurde eine reduzierte Anzahl IL-4-positiver T-Zellen nach 15 und 90 Tagen einer Schnell-VIT und eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -mRNA-positiven Zellen nach 90 Tagen gemessen (8). Bellinghausen et al (15) haben auch eine erhöhte TH1-Zytokinsekretion und eine verminderte TH2-Sekretion beschrieben. In ihrer Studie an Bienen- und Wespengiftallergikern wurde eine reduzierte IL-4-Spontanssekretion nach einer Woche Schnell-VIT im Vergleich zur Spontanssekretion vor Einleitung der IT gemessen, parallel verringerte sich auch die IL-4-Sekretion nach Allergenstimulation. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion war nach der ersten Woche VIT signifikant erhöht, sowohl in unstimulierten als auch in allergenstimulierten PBMC-Kulturen, und bei intrazellulären durchflußzytometrischen Bestimmungen wurde eine größere Anzahl der IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen gemessen.

In dieser Studie (15) wurde auch die IL-10-Sekretion gemessen. IL-10 scheint eine wichtige Rolle bei der Hyposensibilisierung der Patienten zu spielen. So war die IL-10-Sekretion nach einer Woche stark erhöht. Auch auf mRNA-Ebene konnte mittels RT-PCR eine erhöhte IL-10-Produktion ermittelt werden. Mittels Durchflußzytometrie (FACS) wurde gezeigt, daß CD4+-TH

IL-10 produzierten, und zwar zu einem kleinen Teil auch von IFN- $\gamma$ -produzierenden TH-Zellen. Die Zuordnung von IL-10 zu den TH2-Zytokinen, zu denen es bei der Maus gezählt wird, scheint demnach für den Menschen nicht zuzutreffen. Das humane IL-10 gilt deshalb eher als allgemein antiinflammatorisches Zytokin. Es hat verschiedene Effekte auf T-Zellen. So hemmt es die antigenspezifische T-Zellproliferation und die Synthese der Zytokine IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF und IFN- $\gamma$  (37,122,133). IL-10 hemmt im Menschen sowohl die Proliferation von TH1- als auch von TH2-Klonen (37). Man kann diese verringerte T-Zell-Aktivität als Anergie bezeichnen. Anergie ist ein Zustand, in dem Lymphozyten, obwohl sie optimal stimuliert werden, nicht auf ein Antigen reagieren (115). Die durch IL-10 induzierte Anergie ist von APZ abhängig (37,45,122,133); so wird die Fähigkeit von Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, Ag-spezifische T-Zellproliferation zu vermitteln, durch IL-10 inhibiert. Die Expression von MHC-II auf Monozyten und dendritischen Zellen wird durch IL-10 herunterreguliert. Interessanterweise scheint die APZ-Funktion von B-Zellen durch IL-10 nicht beeinflusst zu werden. Der erhöhte IL-10-Spiegel, der bei der IT beschrieben wird, kann also für eine T-Zell-Anergie verantwortlich gemacht werden (4).

Akdis et al (6) haben nach 7 und 28 Tagen Schnell-VIT erniedrigte IFN- $\gamma$ , IL-5-, IL-4- und IL-13-Level gemessen, die IL-10-Konzentration dagegen war stark erhöht. Durch Zugabe von anti-IL-10-AK wurde sowohl die Proliferationshemmung als auch der Abfall von IL-5, IL-4 und IL-13 verhindert. In intrazellulären FACS-Messungen wurden nach 7 Tagen VIT zuerst CD4+CD25+ aktive T-Zellen als IL-10-Produzenten identifiziert. Nach 28 Tagen VIT produzieren auch Monozyten und B-Zellen IL-10.

Auch die beschriebene Reduktion von Histamin und Leukotrienen (103) kann teilweise durch eine erhöhte IL-10-Produktion erklärt werden. So wurden durch Zugabe von anti-IL-10 Histamin und Leukotriene wieder vermehrt gemessen. Auch anti-IFN- $\gamma$  hatte diesen Effekt, so daß diese beiden Zytokine hier synergistisch wirken.

#### **2.4.2.4 Veränderungen der Ig-Spiegel während der IT**

Die Ig-Spiegel verändern sich in charakteristischer Weise während der IT. Das IgE steigt initial an (3,39,74,81,95), um im Verlauf der Therapie abzufallen, bei einigen Patienten sogar unter die Nachweisgrenze (83). Der IgG-Spiegel steigt ebenfalls schon nach kurzer Zeit an und betrifft v.a. den IgG4-Subtyp, bleibt aber während der Therapie auf diesen erhöhten Werten (38,127).

Eine ältere Hypothese zum Wirkmechanismus der IT, nämlich die der „blockierenden Antikörper“, wurde aufgrund dieser Ig-Titer-Veränderungen aufgestellt. Wie unter 2.2.2. dargelegt, besitzen IgG4-Antikörper, wie bei Patienten mit Filariasis gezeigt wurde, blockierende Eigenschaften in Bezug auf die Mastzelldegranulation, in dem sie direkt kompetitiv mit den IgE um die Ag-Bindung konkurrieren. Diese Theorie wird weiter dadurch unterstützt, daß erfolgreich passive Immunisierungen mit  $\gamma$ -Globulinen von nicht-allergischen Imkern durchgeführt wurden (siehe: (95)). Einige Autoren beschreiben auch einen prädiktiven Wert des IgG- bzw. IgG4-Titers für die Wirksamkeit der IT (53), dies ist allerdings stark umstritten (siehe hierzu auch: (1,83,93,95)).

Nicht nur Veränderungen der Ig-Titer treten während der VIT auf, sondern auch veränderte Epitopspezifitäten der Antikörper (89,90). Es wurde gezeigt, daß allergische Patienten ein verändertes Spektrum an Antikörper-Spezifitäten aufweisen im Vergleich zu nicht-allergischen Patienten, und daß die IT dies zumindest partiell aufhebt. Ob dieses Phänomen zur Wirksamkeit der IT beiträgt, ist allerdings noch nicht hinreichend bewiesen.

#### **2.4.2.5 Phänotypische Veränderungen**

Die Expression von Oberflächenmolekülen kann Hinweise auf das Aktivitätsniveau und den Funktionszustand von Zellen geben, deshalb können mögliche phänotypische Veränderungen im Verlauf der IT weiteren Aufschluß über den Wirkmechanismus der IT liefern.

Die CD23-Expression wurde bereits von einigen Gruppen untersucht, allerdings v.a. bei atopischen Patienten. So wurde gezeigt, daß der saisonale Anstieg der CD23-Expression, der bei nur symptomatisch behandelten Pollenallergikern auftritt, durch die IT vermindert ist (58,73).

Bei asthmatischen Kindern mit Hausstaubmilbenallergie wurde nach 6 Wochen IT eine verringerte Prozentzahl von CD23-positiven B-Zellen ermittelt (47).

Eine verminderte Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen wurde nach einem Jahr IT bei Grass-Pollen sensibilisierten Asthmatikern beobachtet. Die Expression von CD25 und HLA-DR auf CD4+- und CD8+-T-Zellen war signifikant reduziert (87).

Bei Wespengiftallergikern haben Bellinghausen et al (15) nach einer Woche Schnell-IT eine reduzierte Expression von IL-4R, CD23, CD40 und CD40L gemessen, andere Oberflächenmoleküle wie IL-2Ra, IL-12R, CD3, CD4, CD8, CD45 und HLA-DR blieben konstant. Allerdings hat diese Gruppe die Expression auf PBMC ermittelt, so daß die erniedrigte Expression nicht einer bestimmten Zell-Population zugeordnet werden kann.

## **2.5 Fragestellung**

Der Einfluß der IT auf periphere B-Zellen ist nur im Hinblick auf die Produktion von Ig eingehend untersucht worden. Ob die IT auch andere Funktionen von B-Zellen, wie die Antigenpräsentation und die Interaktion zwischen B- und T-Zellen, und das Aktivationsniveau der B-Lymphozyten beeinflusst, ist bisher weitestgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb neben den Ig-Spiegeln der Phänotyp von B-Zellen vor und während einer Schnell-VIT mit Wespengiftextrakten mittels Durchflußzytometrie untersucht. Hierzu wurden Oberflächenmoleküle analysiert, die als Indikatoren für den Aktivations- und Funktionszustand von peripheren B-Zellen dienen können.

Als notwendiges Molekül für die Antigenpräsentation wurde die Expression von HLA-II untersucht. CD23, CD40, CD54 und CD86 haben einen Einfluß auf die IgE-Regulation, sind deshalb in die Pathophysiologie der Typ-I-Allergie involviert und wurden aus diesen Gründen untersucht. CD5 und CD32 scheinen regulatorische Einflüsse auf den B-Zellrezeptor zu haben und wurden aufgrund ihrer Assoziation mit dem BZR ausgewählt. Da Apoptose als ein möglicher Wirkmechanismus der IT diskutiert wird, wurde CD95 untersucht. Aufschlüsse über das Aktivitätslevel können CD32, CD54, CD86 und HLA-II als Aktivierungsmarker geben. Die vorliegende Arbeit hat also zum Ziel, funktionelle und phänotypische Modulationen von peripheren B-Lymphozyten durch die spezifische IT am Beispiel der Wespengiftallergie darzulegen.

## **3 Patienten und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Im Rahmen dieser im Zeitraum von Oktober 1998 bis Februar 1999 durchgeführten Studie wurden 15 Wespengiftallergiker vor und während einer spezifischen Immuntherapie untersucht. Die Indikationsstellung zur spezifischen Immuntherapie, die stationäre Einleitungsphase und die ersten ambulanten Injektionen wurden im Bereich Allergologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Berlin durchgeführt.

#### **3.1.1 Auswahlkriterien**

Die Patienten wurden für die Studie ausgewählt, wenn folgende Kriterien zutreffend waren:

- Systemische Reaktion nach einem Wespenstich
- Anhand der anamnestischen Angaben wurde der Schweregrad der systemischen Reaktionen nach einem Wespenstich gemäß der Klassifizierung nach Müller (123) eingeteilt.
- Nachweis von spezifischem IgE
- Das wespenspezifische IgE wurde im IgE-Labor der Hautklinik mittels dem Pharmacia-CAP-ELISA-System bestimmt. Es wurden nur Patienten mit einem sIgE-Titer der CAP-Klasse  $\geq 2$  in die Studie einbezogen.
- Positiver Pricktest mit Wespengift
- Es wurde ein titrierter Haut-Pricktest mit 1  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  und 300  $\mu\text{g}$  Wespengiftextrakt durchgeführt.

Des Weiteren wurden eigenanamnestische Angaben zu Erkrankungen des atopischen Formenkreises erhoben.

Tabelle 5: Patientendaten.

Patient	Alter	Geschlecht	Müller- Grad	Spez. IgE (kU/ml)	CAP- Klasse (kU/ml)	Prick- Schwelle (µg/ml)	Gesamt IgE (kU/ml)	Atopie
B. C.	33	w	1	20,6	4	100	51,4	-
K. M.	47	w	4	3,14	2	10	65,3	-
H. S.	43	m	2	3,78	3	100	50,1	-
B. N.	15	m	2	6,25	3	100	227	-
H. A.	39	M	2	11,9	3	100	60,1	-
P. E.	66	w	2	3,07	2	100	22,5	-
R. H.	39	w	3	2,11	2	100	87	-
M. E.	42	w	3	3,43	2	100	19,6	-
D. G.	65	w	2	2,64	2	100	109	-
Z. T.	27	m	2	7,84	3	100	299	-
U. H.	27	m	2	4,76	3	100	135	-
S. K.	61	w	4	10,6	3	1	59,2	-
W. R.	54	m	4	2,17	2	100	40,5	+
W. S.	37	w	2	5,3	3	300	33,6	-
Z. M.	19	w	4	2,18	2	100	13,9	+

### 3.1.2 Therapieprotokoll

Die spezifische Immuntherapie wurde als Schnellhyposensibilisierung mit einem wässrigen Allergenextrakt (ALK-lyophilisiert SQ) begonnen. Für die Einleitungsphase wurden die Patienten 6 Tage stationär aufgenommen, die streng subkutanen Injektionen wurden alternierend in die Oberarmstreckseiten nach dem Schema, das in Tabelle 6 dargestellt ist, verabreicht. Die Fortsetzungsbehandlung mit 100 µg eines an Aluminiumhydroxid-adsorbierten Allergenextrakts (ALK-depot SQ), was dadurch langsamer freigesetzt wird (20), erfolgte ambulant nach 1 Woche, nach 2 Wochen und dann in monatlichen Abständen.

Tabelle 6: Therapieprotokoll der Einleitungsphase.

<b>Tag</b>	<b>Konzentration (µg/ml)</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Dosis (µg)</b>
1	0,01	0,1	0,001
		0,3	0,003
		0,6	0,006
	0,1	0,1	0,01
		0,2	0,02
2	0,1	0,3	0,03
		0,6	0,06
		0,8	0,08
	1	0,1	0,1
		0,2	0,2
3	1	0,3	0,3
		0,6	0,6
		0,8	0,8
	10	0,1	1
		0,2	2
4	10	0,2	2
		0,4	4
		0,6	6
		0,8	8
	100	0,1	10
5	100	0,2	20
		0,4	40
		0,6	60
		0,8	80
		1,0	100

### 3.1.3 Studienprotokoll

Die Patienten wurden am Tag ihrer stationären Aufnahme (Tag 1), am Tag ihrer Entlassung, also einen Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis von 100 µg Allergenextrakt (Tag 2), und an dem Tag ihrer zweiten ambulanten Allergen-Injektion, also nach knapp 4 Wochen (Tag 3) untersucht. Nach einem Aufklärungsgespräch und Unterzeichnung einer Einverständniserklärung wurde den Patienten 30-36 ml heparinisertes Blut und 9 ml Blut für Serumuntersuchungen abgenommen. Die Ethik-Kommision der Charité hat der Durchführung der Untersuchung zugestimmt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Aufreinigung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Die PBMC wurden mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut separiert. Dazu wurden 30-36 ml heparinisertes Vollblut auf 80 ml Endvolumen mit PBS verdünnt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden je 15 ml Ficoll mit 35 ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet und 30 Minuten bei 400g, 20° C (ohne Zentrifugenbremsung) zentrifugiert. Die Dichte von Erythrozyten und Granulozyten ist größer als die Dichte von Ficoll, die Dichte der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) dagegen geringer, so daß sich durch die Zentrifugation eine Schicht mononukleärer Zellen oberhalb des Ficolls bildet. Diese Schicht wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und dreimal in 50 ml PBS gewaschen (Zentrifugation je 10 min bei 4° C und zuerst bei 300g und dann bei 200g). Die Zellen wurden im Casy®1-Zellzähler gezählt. Casy®1 ist ein Gerät zur Volumenbestimmung und Zellzählung, das auf dem Prinzip der Widerstandsmessung basiert. Je nach Spender ergaben sich  $1-4 \times 10^7$  PBMC.

### 3.2.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen spezifischen Antikörpern lassen sich am Durchflußzytometer auf Einzelzellebene Oberflächenrezeptoren analysieren.

#### 3.2.2.1 Färbung der Oberflächenantigene

Es wurden  $10^5-10^6$  Zellen in 2 ml FACS-Waschpuffer (PBS mit 0,2% BSA) gewaschen (10 Minuten bei 200g und 4° C). Die Zellen wurden in 50 µl FACS-Färbepuffer (PBS mit 2% BSA und 0,1% Natriumazid) resuspendiert und zuerst mit 10 µl des fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Antikörpers 30 Minuten auf Eis lichtgeschützt inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Waschpuffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden wiederum in 50 µl FACS-Färbepuffer resuspendiert und im zweiten Färbeschritt mit 10 µl des - Phycoerythrin (PE)-konjugierten Antikörpers 30 Minuten auf Eis lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurden die markierten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, in PBS mit 2% Paraformaldehyd fixiert und am Durchflußzytometer analysiert. Folgende Antikörper wurden verwendet:

anti-CD19-FITC:	spezifischer B-Zellmarker
anti-CD5-PE:	T-Zellen und B-Zellsubtyp
anti-CD23-PE:	niedrig affiner IgE-Rezeptor, = FcεRII
anti-CD32-PE:	niedrig affiner IgG-Rezeptor, = FcγRII
anti-CD40-PE:	B-Zellaktivierungsmarker
anti-CD54-PE:	Adhäsionsmolekül, = ICAM-1

anti-CD86-PE:	B-Zellaktivierungsmarker, = B7-2
anti-CD95-PE:	Apoptosesignal, = Fas
anti-HLA-I-ABC-PE	Humanes Lymphozyten Antigen I, = MHC-I
anti-HLA-II-DR-PE	Humanes Lymphozyten Antigen II, = MHC-II
anti-IgG1-FITC, anti-IgG1-PE, anti-IgG2a-PE, anti-IgG2b-PE:	Isotypkontrollen

### 3.2.2.2 Analyse am Durchflußzytometer

Zur Einstellung des Zytometers und um einen Referenzwert zu generieren, wurde zu Beginn mit ungefärbten Zellen und mit Zellen, die mit sogenannten Isotypkontrollantikörpern gefärbt waren, gemessen. Isotypkontrollantikörper sind Antikörper ohne spezifische Antigenität, jedoch mit dem gleichen Isotyp wie die der zu untersuchenden Antikörper. Auf diese Weise wird das Ausmaß der unspezifischen Bindung bestimmt. Die Verstärkung der Fluoreszenzkanäle wurde so eingestellt, daß die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) beider Farbstoffe bei der Isotypkontrolle 0,25 (+/- 0,05) betrug. Die Kompensation wurde mit Einzelfärbungen bestimmt. Der *Threshold* wurde so gewählt, daß noch vorhandene Erythrozyten am äußersten linken Rand im Vorwärts-Seitwärts-Scatter-Plot dargestellt wurden.

Dann wurde anhand der unterschiedlichen Scatter-Eigenschaften von Lymphozyten und Monozyten ein Lymphozytengate erstellt (siehe Abbildung 3). Der weiteren Analyse wurden nur Zellen des Lymphozytengates unterzogen.

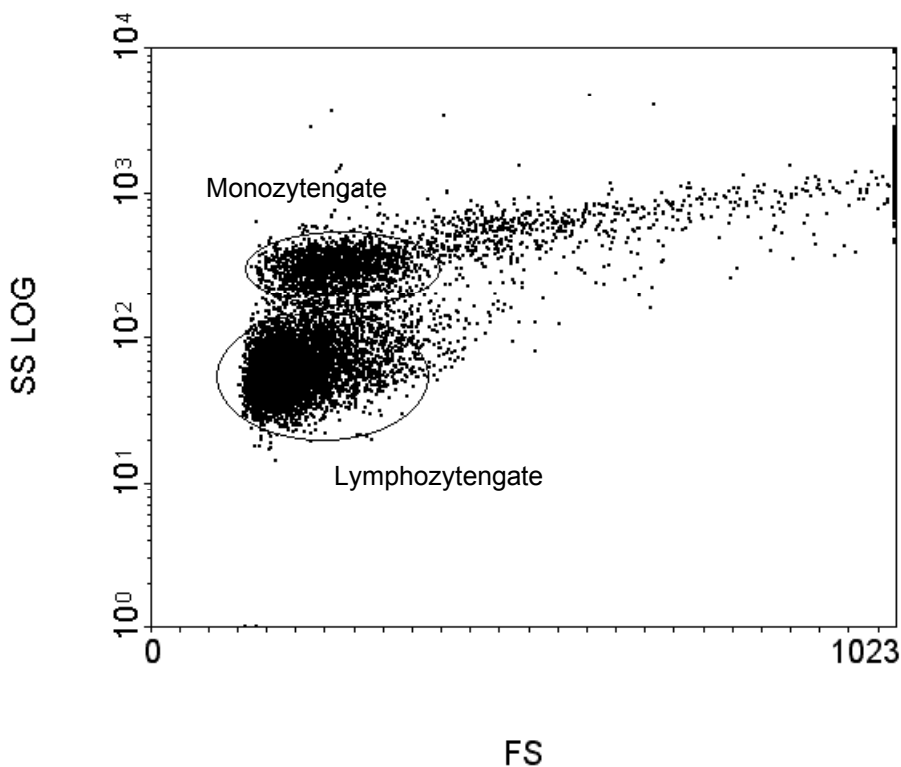
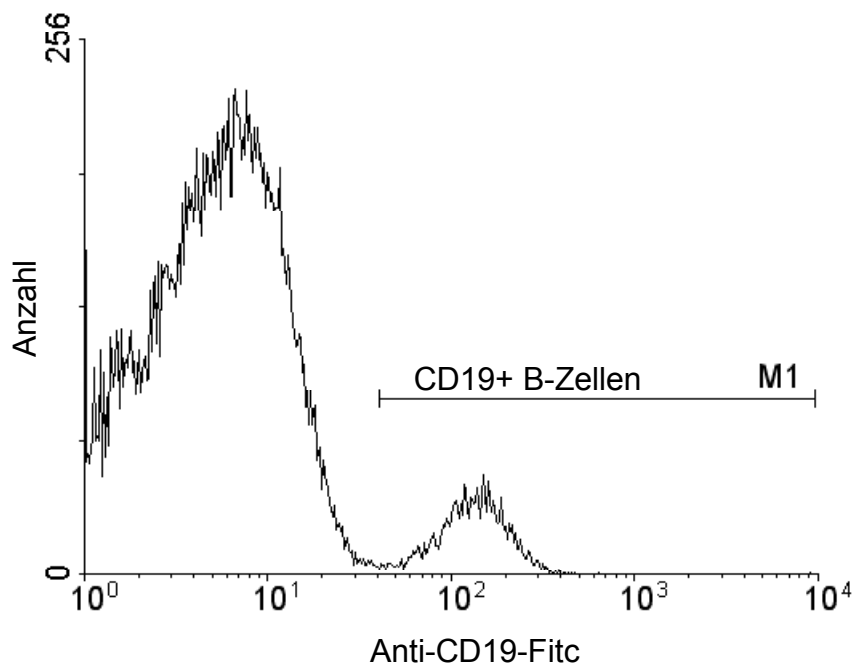


Abbildung 3: Beispiel für den Vorwärts-Seitwärts-Scatter-Dotplot. Auf der X-Achse ist der Vorwärts-Scatter, auf der Y-Achse der Seitwärts-Scatter abgebildet. Die Monozyten sind etwas größer und v.a. stärker granuliert als die Lymphozyten.

Da die mit anti-CD19-FITC markierten B-Lymphozyten im Fluoreszenz-1-Histogramm (FITC) eine eindeutig abzugrenzende Population bilden, konnte hier ein Gate für B-Zellen gemäß der *zero-differentiation-method* (106) gebildet werden (Abbildung 4). Das Gate wurde so gesetzt, daß sich nur CD19+ Zellen in diesem B-Lymphozyten-Gate befanden.



*Abbildung 4:* Beispiel eines Histogramms der Fluoreszenz 1 mit anti-CD19-FITC-markierten Antikörpern. M1 bildet das B-Lymphozytengate. Es sind nur Zellen aus dem Lymphozytengate abgebildet.

Im Fluoreszenz-2-Histogramm (PE) wurde ein Gate (Positiv-Gate) so gesetzt, daß 99,5% (+/- 0,4%) der mit dem Isotypkontrollantikörper markierten Zellen nicht in diesem Gate waren (Abbildung 5).

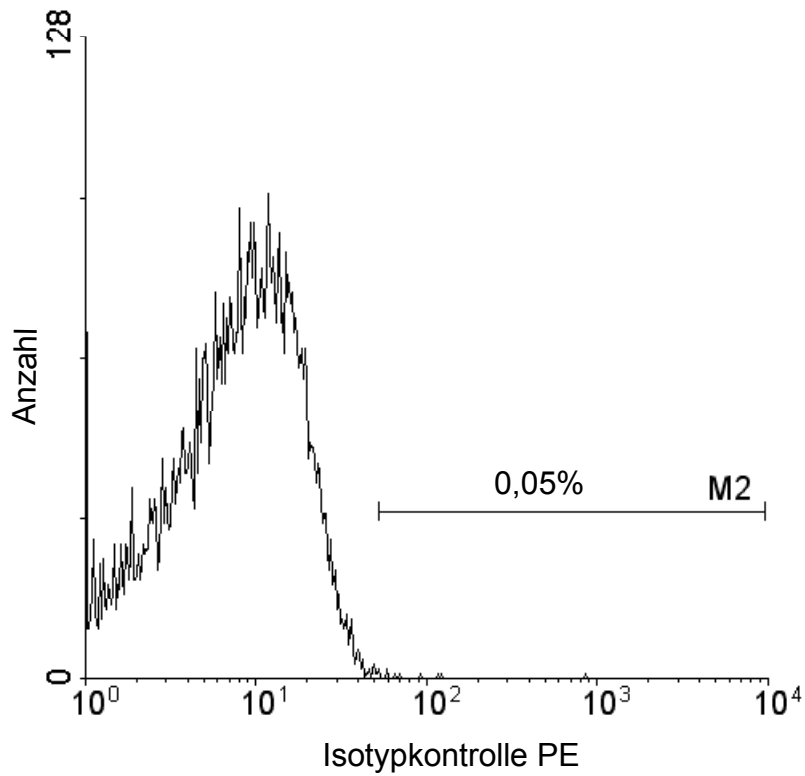
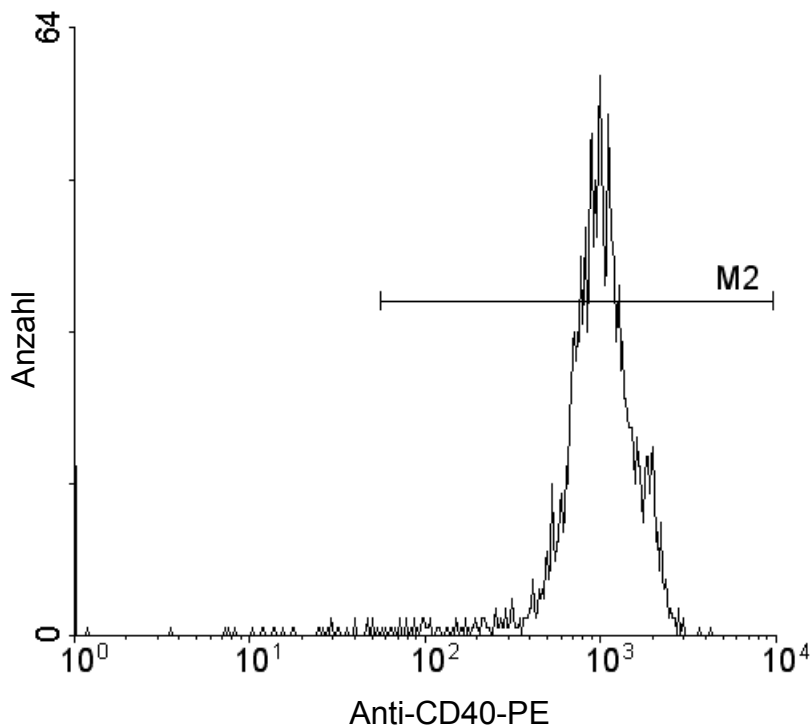


Abbildung 5: Histogramm der Fluoreszenz 2 mit PE-markierten Kontrollantikörpern. M2 ist das Positivgate, in dem sich hier beispielhaft 0,05% der Zellen befinden.

Die Prozentzahl im Positivgate der Kontrolle wurde von der Prozentzahl der zu untersuchenden positiven Zellen subtrahiert. In einem zweiten Fluoreszenz-2-Histogramm (Abb. 6) mit dem gleichen Positivgate (M2) wurden nur die Zellen aus dem B-Lymphozytengate (M1) dargestellt. Aus diesem Histogramm wurden die Werte der Prozentzahlen der positiven (also doppeltpositiven) Zellen und der mittleren Fluoreszenzintensität gewonnen.



*Abbildung 6:* Beispiel eines Histogramms der Fluoreszenz 2 mit anti-CD40-PE-gelabelten Antikörpern. Hier sind nur Zellen abgebildet, die sowohl im Lymphozytengate als auch im B-Lymphozytengate (M1) eingeschlossen sind. M2 wurde durch die Kontrolle definiert (siehe Abb. 3) und bezeichnet die CD40-positiven CD19-positiven B-Zellen.

### 3.2.3 Serumparameter

Aus 9 ml Blut wurde durch Zentrifugation (400g) Serum gewonnen. Das Serum wurde abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren, bis es für die Bestimmung der Ig-Spiegel benutzt wurde.

#### 3.2.3.1 Gesamt-IgE

Die Bestimmung des Gesamt-IgE wurde mit dem Pharmacia CAP-System durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf einem Fluoreszenz-Enzym-Immuno-Assay (FEIA). Die feste Phase besteht aus einem hydrophilen Polymer in einer festen Kapsel (ImmunoCAP), an die das entsprechende Antigen kovalent gebunden ist. Die IgE-Antikörper aus dem Patientenserum binden an die gebundenen anti-IgE-Antigene der festen Phase und bilden einen Komplex. Die Antikörper mit anderen Isotypen aus dem Serum werden in einem Waschschrift entfernt. Im

nächsten Schritt werden Enzym-gekoppelte anti-IgE-AK zugegeben, die an die gebundenen Patienten-IgE-AK binden. Die ungebundenen anti-IgE-AK werden abgewaschen. Nach Zugabe eines Substrats, das nach Reaktion mit dem AK-gekoppelten Enzym fluoresziert, wird die Fluoreszenz in einem Fluoro-Counter gemessen und mit Hilfe einer Eichgrade die Konzentration in kU/l des Gesamt-IgE errechnet.

### 3.2.3.2 Spezifisches IgE

Auch die Bestimmung des Wespengift-spezifischem IgE wurde mittels dem Pharmacia CAP-System als dem derzeit sensibelsten Verfahren (69) durchgeführt. Das Testprinzip ist identisch, nur ist an das ImmunoCAP das entsprechende Antigen kovalent gebunden. Die spezifischen IgE-Antikörper aus dem Patientenserum binden an die gebundenen Antigene der festen Phase. Die Konzentration wird in kU/l des spezifischen IgE errechnet. Sie wird in sog. CAP-Klassen eingeteilt.

*Tabelle 7: Einteilung des spezifischen IgE in CAP-Klassen.*

CAP-Klasse	Spez. IgE in kU/l
0	<0,35
1	0,35 – 0,7
2	0,7 – 3,5
3	3,5 – 17,5
4	17,5 – 50,0
5	50,0 – 100,0
6	>100,0

### 3.2.3.3 Spezifisches IgG4

Auch das spezifische IgG4 wurde mit dem CAP-System bestimmt. Das Testprinzip ist identisch, die Konzentration wird in mg/l angegeben.

### 3.2.4 Statistische Methoden

Die Tabellenkalkulation wurde in Excel'97 erstellt, die Statistik wurde in SPSS 8,0 für Windows errechnet. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Wilcoxon-Test für verbundene, nicht-parametrische Daten benutzt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Phänotypische Veränderungen von peripheren B-Zellen während der VIT**

Um den Einfluß der VIT auf den Aktivierungs- und Funktionsstatus von peripheren B-Lymphozyten zu untersuchen, wurde die Expression von CD5, CD23, CD32, CD40, CD54, CD86, CD95, HLA-I-ABC und HLA-II-DR auf CD19-positiven B-Zellen durchflußzytometrisch ermittelt. Da einige wenige Patienten am 2. bzw. 3. Tag nicht analysiert werden konnten, finden sich einige Einzelwerte in den Abbildungen.

#### 4.1.1 Die CD5 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT

Die Expression von CD5 zeigte eine hohe interindividuelle Varianz. Vor Beginn der Therapie exprimierten 7 – 48% (Median 23%) der CD19-positiven Zellen CD5 auf ihrer Oberfläche, mit einer mäßigen MFI von 0,24 bis 2,54 (Median 0,53). Beim 2. Meßzeitpunkt hat sowohl die Prozentzahl der positiven Zellen (Werte von 6 bis 68%; Median 14%) als auch die MFI (Werte von 0,15 bis 4,55; Median 0,26) der CD5 Expression im Vergleich zum 1. Meßzeitpunkt signifikant abgenommen. Bei der 3. Messung wurden wieder Werte vergleichbar mit denen vom 1. Zeitpunkt ermittelt (Prozentwerte der positiven Zellen von 5 bis 54%; Median 24%; MFI-Werte von 0,147 bis 2,8; Median 0,63). Obwohl dieser Anstieg eine klare Tendenz zeigte, erreichte er keine statistische Signifikanz. Die Prozentzahlen der positiven Zellen sind in Abbildung 7, die MFI der Expression sind in Abbildung 8 dargestellt.

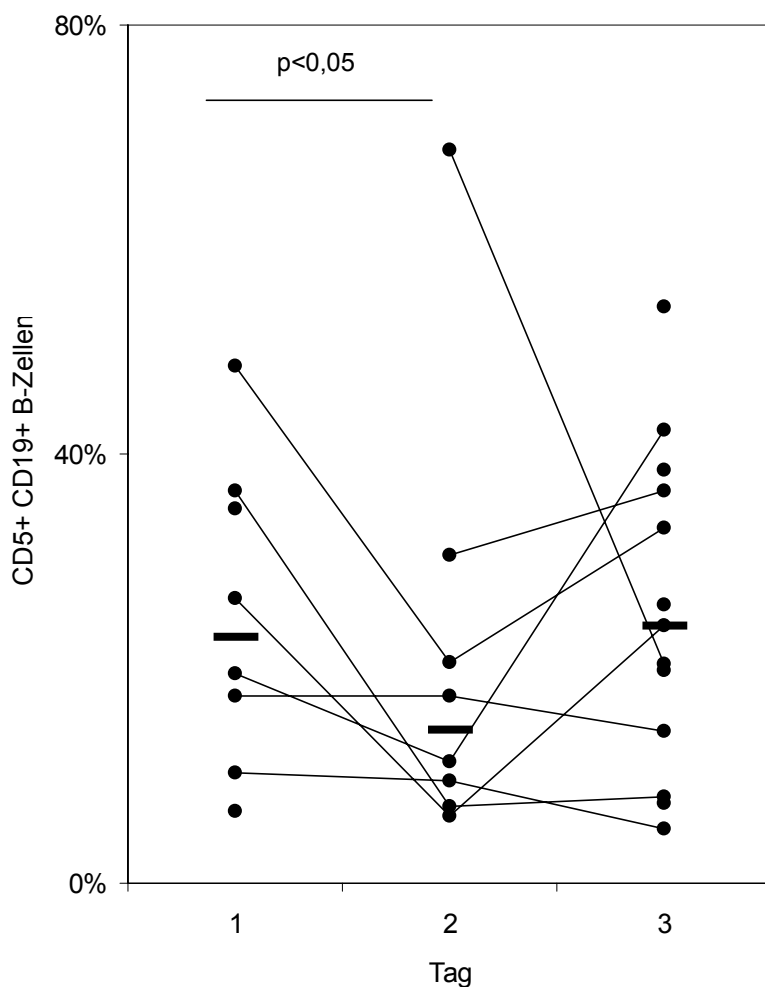


Abbildung 7: Die Expression von CD5 während der VIT in Prozentzahlen der CD5 positiven CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis am 6. Tag; Tag 2: vor der 3. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

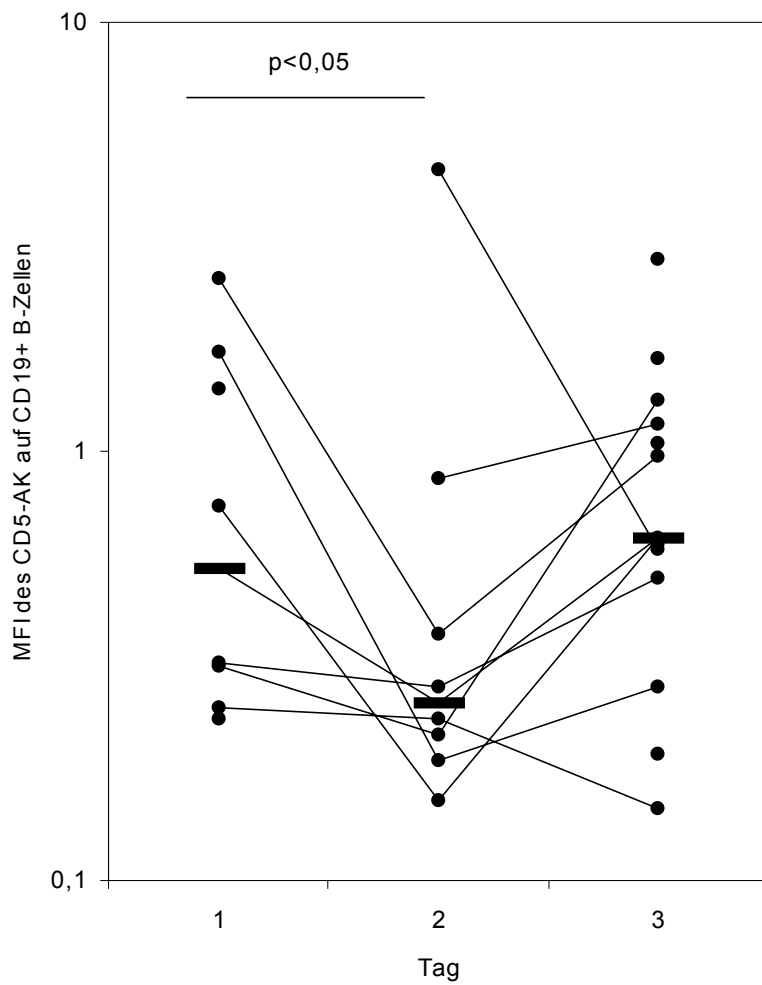


Abbildung 8: Die Expression von CD5 während der VIT, dargestellt als MFI des CD5-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis am 6. Tag; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

#### 4.1.2 Die CD32 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT

Auch die Expression von CD32 zeigte eine hohe interindividuelle Varianz. Nach der Einleitungsphase der VIT war die CD32 Expression im Vergleich zu den Ausgangswerten reduziert (Prozentwerte der positiven B-Zellen am Tag 1 von 28% bis 86%; Median 71%; Prozentwerte der positiven B-Zellen am Tag 2 von 26% bis 82%; Median 57%; MFI-Werte am Tag 1 von 1,22 bis 10; Median 5,17; MFI-Werte am Tag 2 von 0,455 bis 6,18; Median 2,72). Am 3. gemessenen Zeitpunkt waren die Werte wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen (Prozentwerte der positiven B-Zellen am Tag 3 von 57% bis 89%; Median 70%; MFI-Werte am Tag 3 von 0,674 bis 17; Median 4,67). Die Prozentzahlen der positiven Zellen sind in Abbildung 9, die MFI der Expression sind in Abbildung 10 dargestellt.

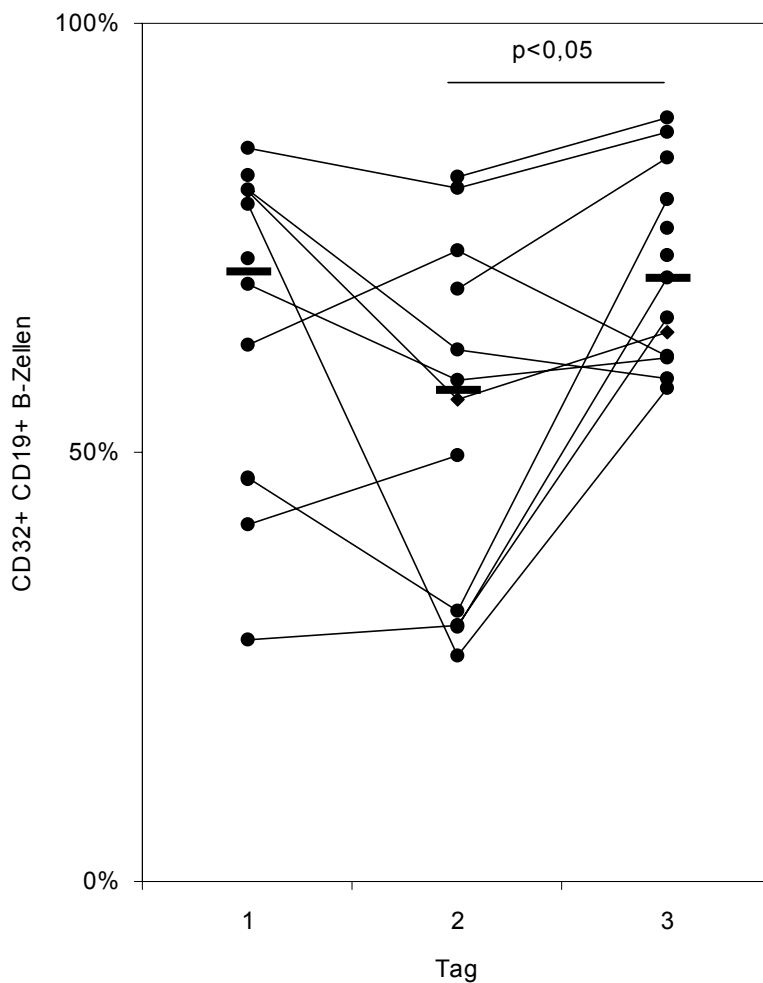
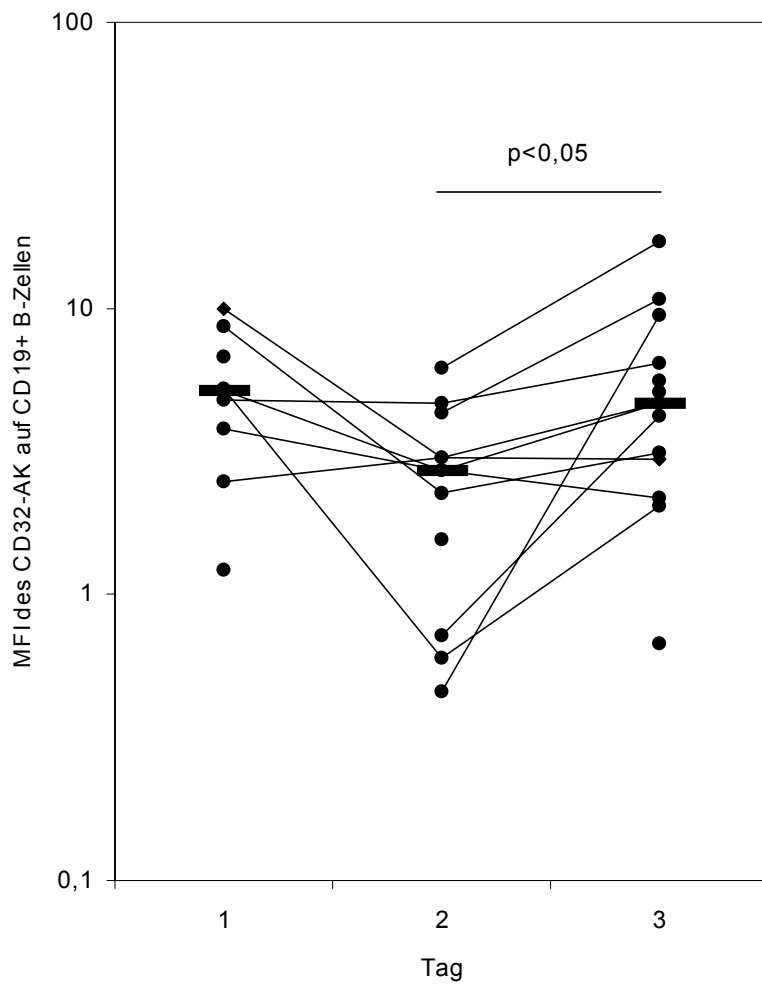


Abbildung 9: Die Expression von CD32 während der VIT, Prozentzahlen der CD32 positiven CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.



*Abbildung 10:* Die Expression von CD32 während der VIT, dargestellt als MFI des CD32-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis am 6. Tag; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

### 4.1.3 Die CD54 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT

Vor Beginn der Therapie wies die Expression von CD54 auf peripheren B-Zellen eine starke interindividuelle Varianz (3 - 79% positive B-Zellen, Median 46%) auf. Am 2. Untersuchungszeitpunkt zeigte sich eine deutlich geringere Expression (Prozentwerte der positiven B-Zellen am Tag 2 von 5% bis 61%; Median 30%), demgegenüber steht eine signifikante Erhöhung der Werte am 3. Tag im Vergleich zu den Werten nach der Initiierungsphase (Prozentwerte der positiven B-Zellen am Tag 3 von 37% bis 75%; Median 55%). Die MFI verhielt sich auch bei diesem Marker parallel zu den Prozentwerten (MFI-Werte am 1. Tag von 0,166 bis 7,28; Median 1,96; am 2. Tag von 0,151 bis 3,18; Median 0,643; am 3. Tag von 1,01 bis 5,61; Median 1,95). Die Prozentzahlen der positiven Zellen sind in Abbildung 11, die MFI der Expression sind in Abbildung 12 dargestellt.

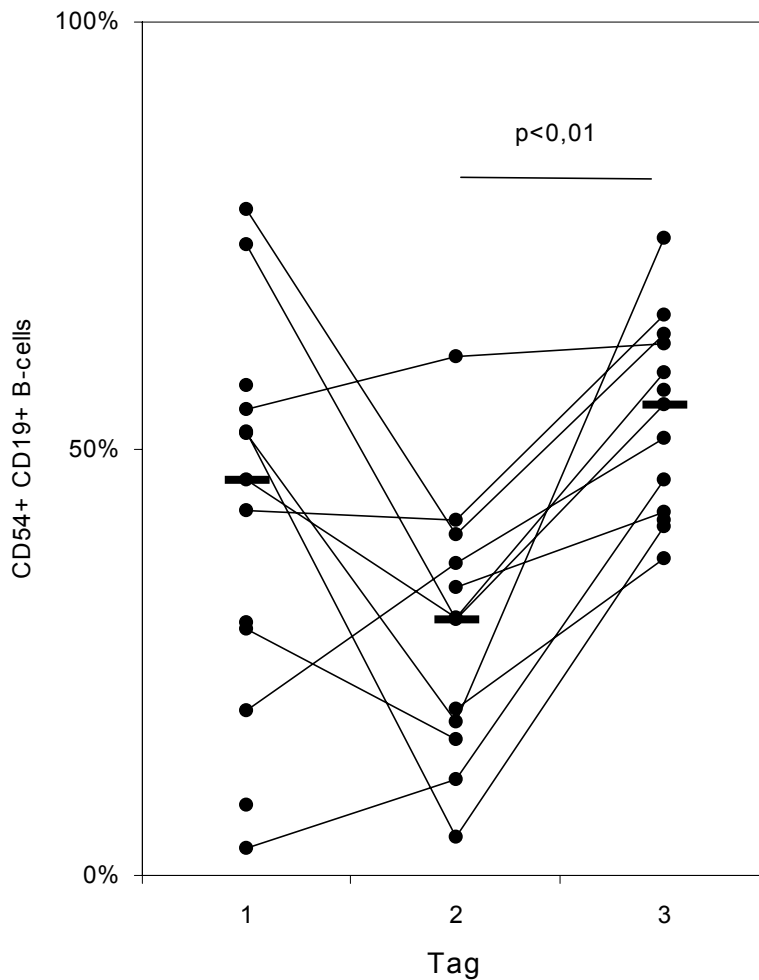


Abbildung 11: Die Expression von CD54 während der VIT, in Prozentzahlen der CD54 positiven CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

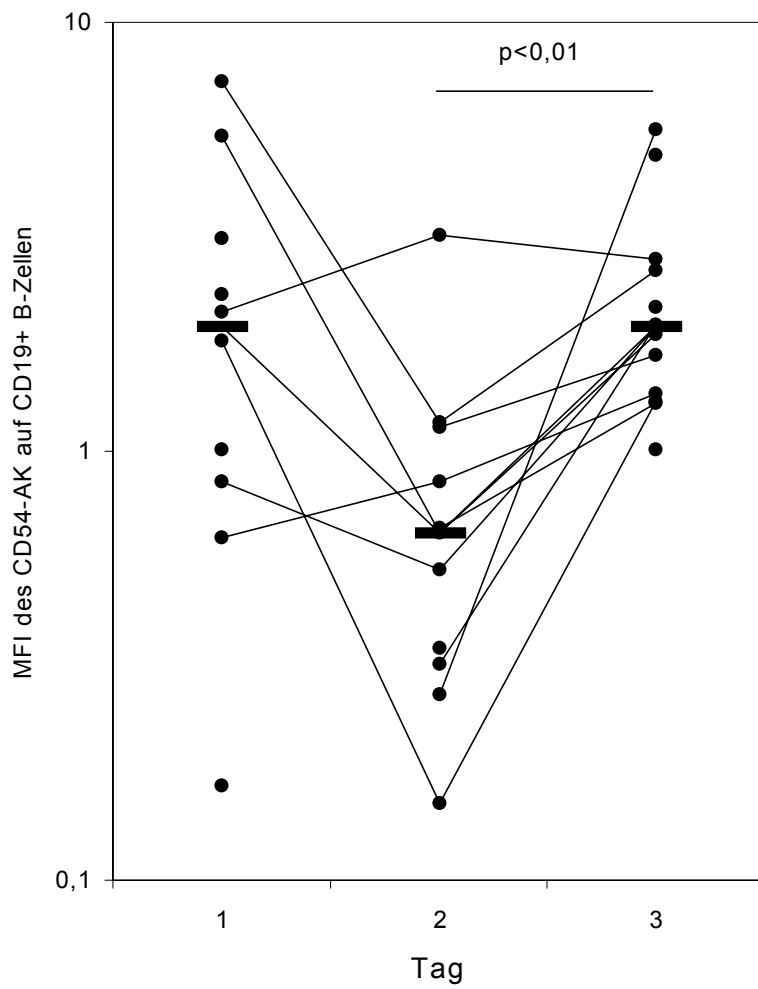


Abbildung 12: Die Expression von CD54 während der VIT, dargestellt als MFI des CD54-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis am 6. Tag; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

#### 4.1.4 Die CD23 Expression auf B-Zellen vor und während der VIT

Die Expression von CD23 wurde nur bei 10 Patienten ermittelt, deshalb wurde hier auf eine statistische Auswertung verzichtet. Es zeigt sich dennoch eine klare Tendenz. Auch CD23 wird am 2. Tag im Vergleich zu Tag 1 und Tag 3 deutlich weniger exprimiert (sowohl die Prozentwerte der positiven B-Zellen als auch die MFI). Die Prozentzahlen der positiven Zellen sind in Abbildung 13, die MFI der Expression sind in Abbildung 14 dargestellt.

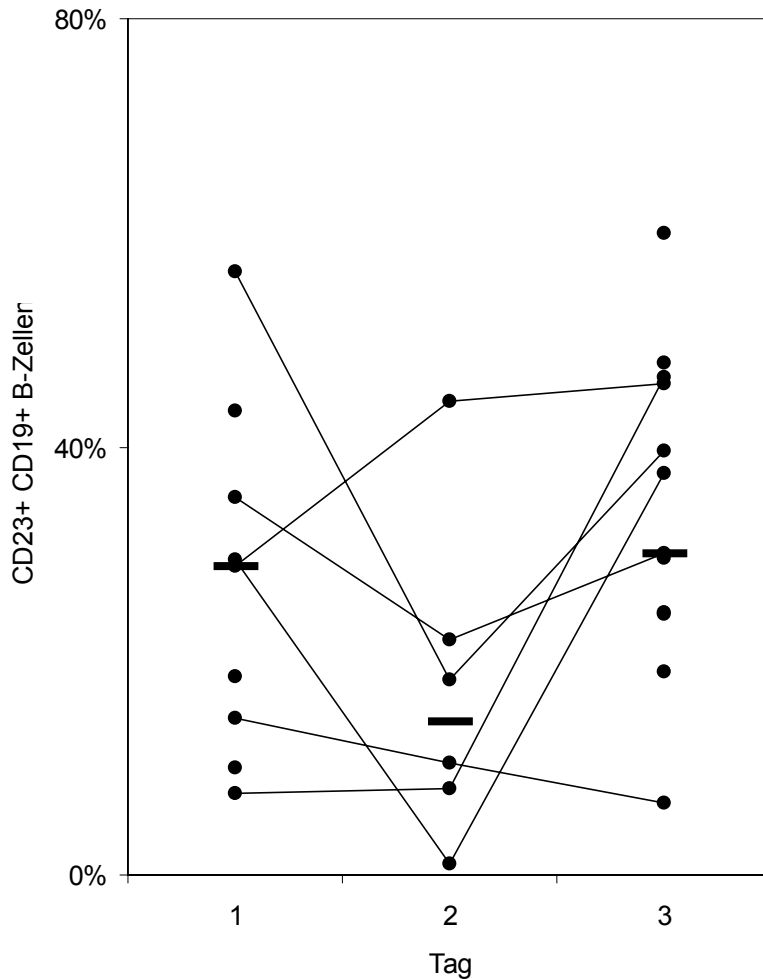


Abbildung 13: Die Expression von CD23 während der VIT, in Prozentzahlen der CD23 positiven CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

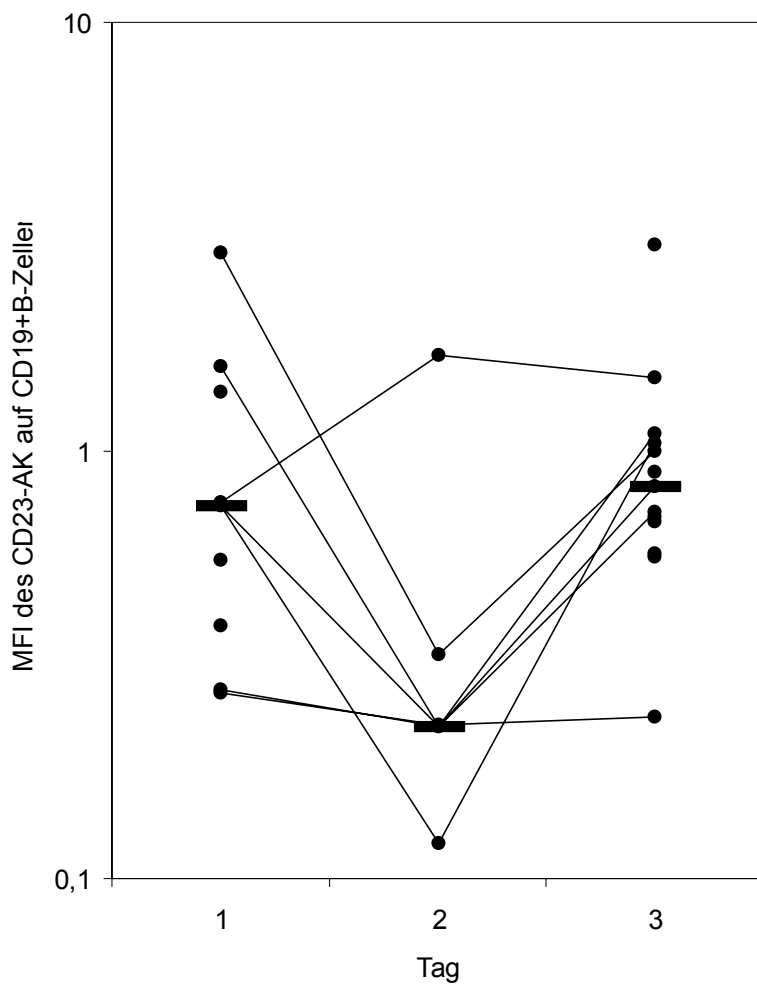
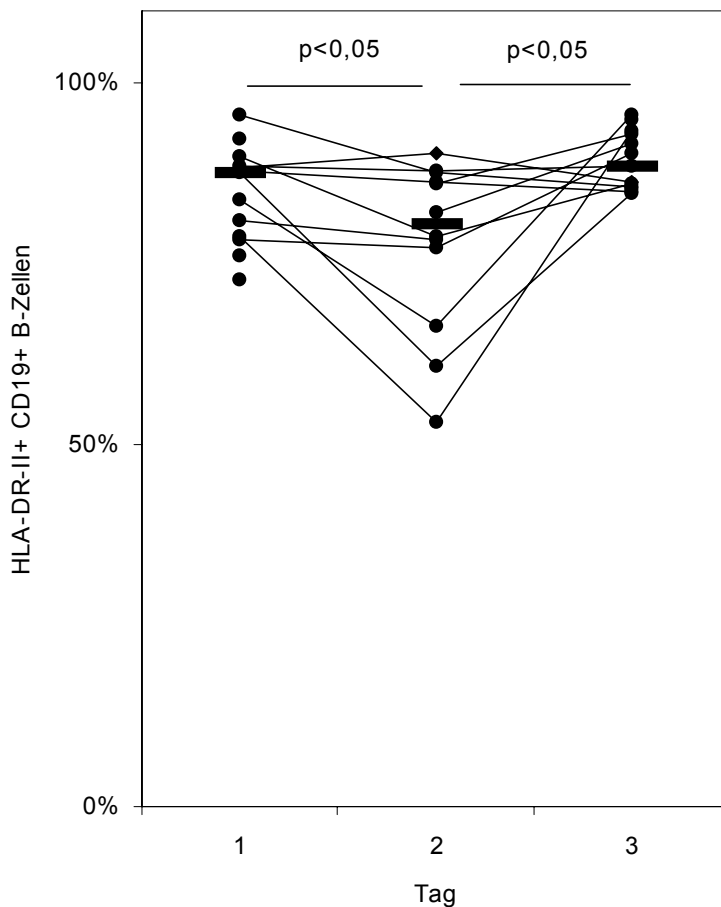


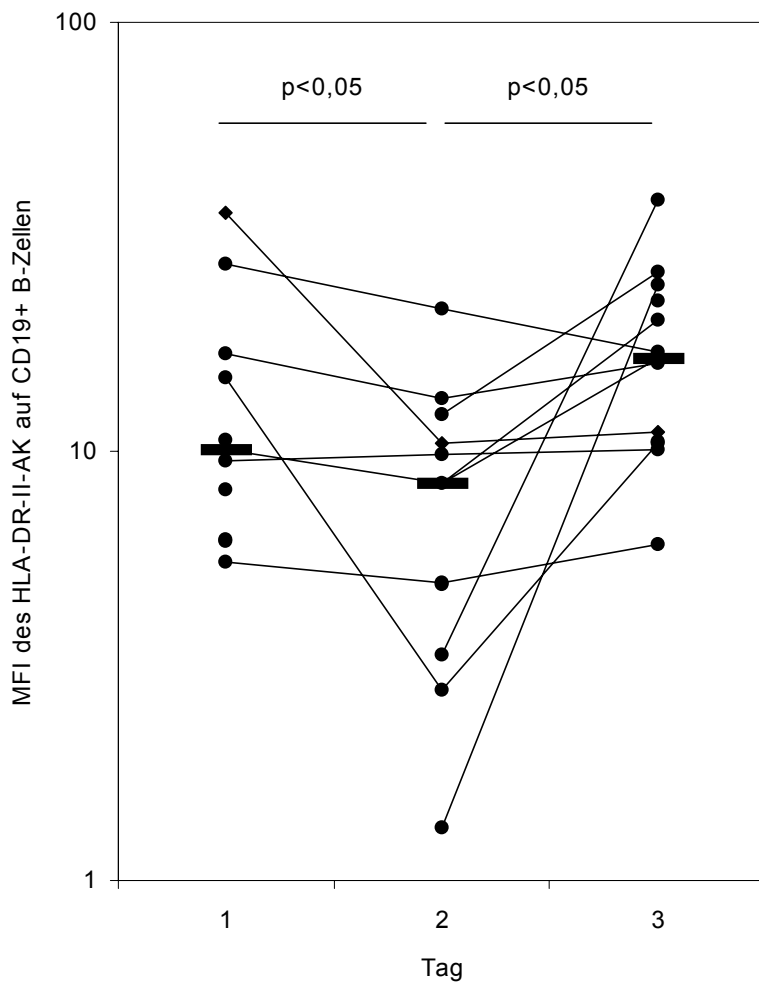
Abbildung 14: Die Expression von CD23 während der VIT, dargestellt als MFI des CD23-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis am 6. Tag; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

#### 4.1.5 Die HLA-II-DR Expression auf B-Zellen vor und während der VIT

Die Expression von HLA-II-DR zeigte interessanterweise keine so hohe interindividuelle Varianz wie sie bei den übrigen Werten auftritt. HLA-II-DR wurde vor Beginn der VIT von der überwiegenden Zahl der B-Lymphozyten stark exprimiert (Prozentwerte am Tag 1 von 73% bis 96%, Median 88%; MFI-Werte von 5,54 bis 36; Median 10,06). Nach der Einleitungsphase der Therapie wurde eine signifikant geringere Zahl HLA-DR-positiver B-Zellen gemessen (53% bis 90%; Median 81%), auch die MFI des HLA-DR-Antikörpers war signifikant reduziert (MFI-Werte am Tag 2 von 1,33 bis 21,5; Median 8,45). Vor der 3. ambulanten Injektion wurde ein Anstieg auf das Anfangsniveau gemessen (Prozentwerte am 3. Tag von 85% bis 96%; Median 89%; MFI-Werte von 6,05 bis 38,4; Median 16,5). Die Prozentzahlen der positiven Zellen sind in Abbildung 15, die MFI der Expression ist in Abbildung 16 dargestellt.



*Abbildung 15:* Die Expression von HLA-DR während der VIT, in Prozentzahlen der HLA-DR positiven CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.



*Abbildung 16:* Die Expression von HLA-DR während der VIT, dargestellt als MFI des HLA-DR-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: ein Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis am 6. Tag; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

#### 4.1.6 Die Expression von CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC auf B-Zellen vor und während der VIT

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC auf B-Zellen wurde während der untersuchten Zeitpunkte nicht signifikant verändert. Wie zu erwarten war, wurde CD40 initial von fast allen B-Zellen exprimiert. Weder eine Modulation der Anzahl positiver Zellen noch der MFI des CD40-Antikörpers wurde festgestellt (siehe Tabelle 8). CD86 wurde nur auf wenigen B-Zellen exprimiert (Mediane: Tag 1: 7%; Tag 2: 5%, Tag 3: 7%), und es wurde keine Veränderung der Expression festgestellt (siehe Tabelle 8). Auch die Expression von CD95 auf peripheren B-Zellen zeigte während der Studie keine signifikanten Veränderungen (siehe Tabelle 8). HLA-I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, deshalb wurde die Prozentzahl der positiven Zellen auch nicht moduliert (siehe Tabelle 8). Aber auch auf Einzelzellebene (MFI) wurde keine Modulation der Expression von HLA-I während der VIT-Studie gemessen.

*Tabelle 8: Die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC auf CD19+ B-Zellen vor und während der VIT.*

Marker		Tag 1	Tag 2	Tag 3
<b>CD40</b>	Median	95%	95%	96%
	Min. Wert	84%	80%	93%
	Max. Wert	98%	98%	99%
<b>CD86</b>	Median	7%	5%	7%
	Min. Wert	1%	2%	4%
	Max. Wert	24%	15%	22%
<b>CD95</b>	Median	28%	31%	37%
	Min. Wert	6%	4%	21%
	Max. Wert	57%	43%	65%
<b>HLA-I-ABC</b>	Median	99%	98%	99%
	Min. Wert	78%	91%	96%
	Max. Wert	99%	98%	99%

## 4.2 Funktionelle Veränderungen von peripheren B-Zellen während der VIT

Die Hauptfunktion von B-Zellen besteht in der Produktion von Immunglobulinen, deshalb wurden die Spiegel des Gesamt-IgE, spezifischen IgE und spezifischen IgG4 zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in dieser Arbeit analysiert.

### 4.2.1 Gesamt-IgE-Spiegel vor und während der VIT

Der Gesamt-IgE-Spiegel der Patienten wurde mittels ELISA vor Beginn der Therapie, vor der Entlassung aus der stationären Behandlung und vor der 3. ambulanten Allergeninjektion bestimmt. Während der Einleitungsphase blieben die IgE-Titer der Patienten konstant, stiegen aber dann im Verlauf signifikant an (Abb. 17).

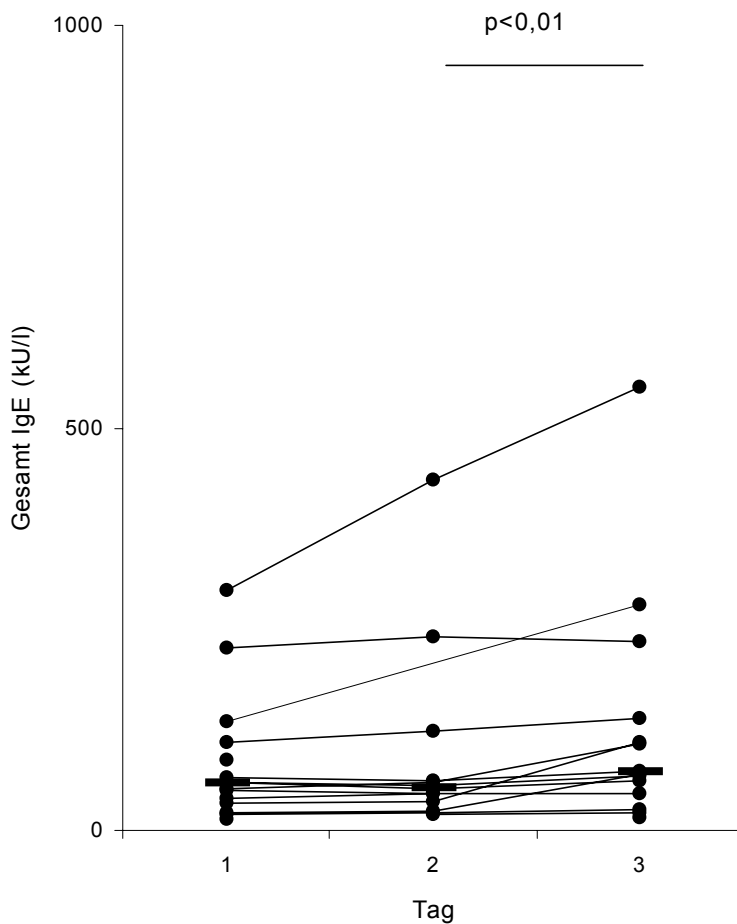


Abbildung 17: Gesamt-IgE der Patienten vor und während der Wespengiftimmuntherapie. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: am 6. Tag der VIT, einen Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

#### 4.2.2 Wespen-spezifische IgE-Titer vor und während der VIT

Das Wespengift-spezifische IgE im Serum der Patienten wurde mittels CAP-ELISA vor und während der VIT bestimmt. Bei einigen Patienten zeigte sich bereits nach einer Woche der Schnell-VIT ein Anstieg des sIgE, ein signifikanter Anstieg wurde nach 3 Wochen ermittelt (Abbildung 18).

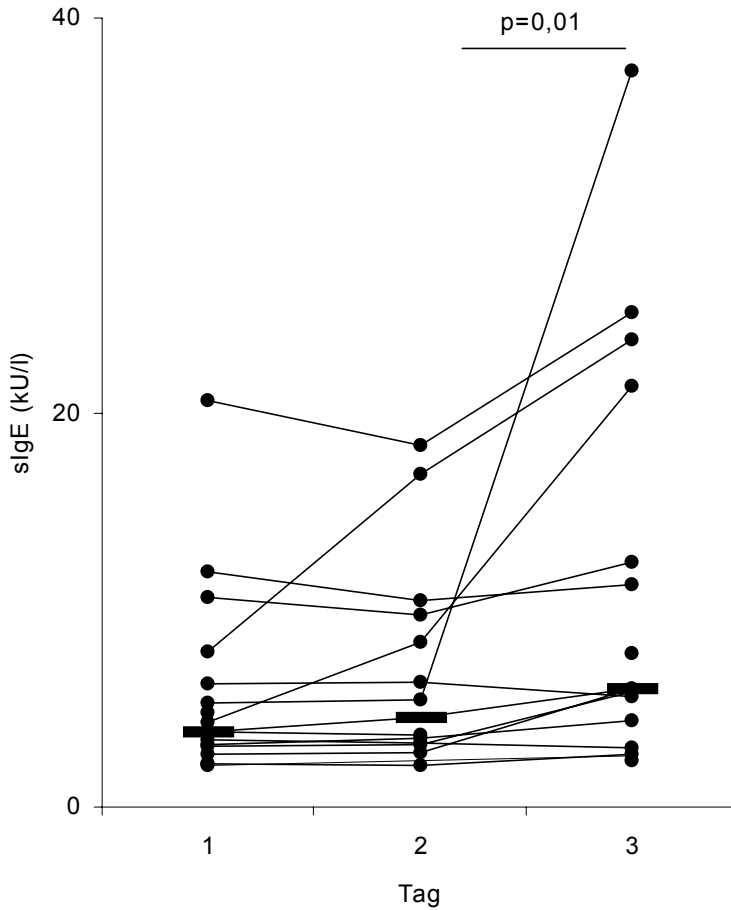


Abbildung 18: Wespengift-spezifisches IgE der Patienten vor und während der VIT. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: am 6. Tag der VIT, einen Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

### 4.2.3 Spezifisches IgG4 im Verlauf der VIT

Das spezifische IgG4 der Patienten wurde im Serum der Patienten vor und während der Therapie ermittelt. Nach der Einleitungsphase zeigte sich noch keine Veränderung der sIgG4-Titer, nach drei Wochen Therapie wurde jedoch ein hochsignifikanter Anstieg der Titer ermittelt (Abbildung 19).

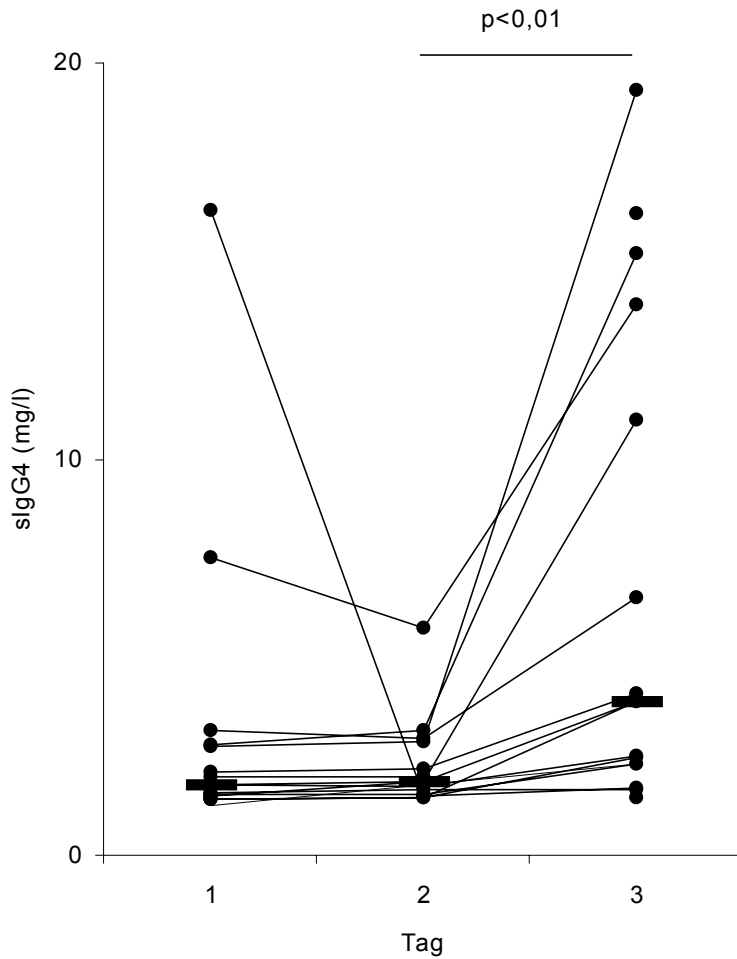


Abbildung 19: Wespengift-spezifisches IgG4 der Patienten vor und während der VIT. Tag 1: vor Beginn der Therapie; Tag 2: am 6. Tag der VIT, einen Tag nach Erreichen der Erhaltungsdosis; Tag 3: vor der 2. ambulanten Allergen-Injektion nach 26 Tagen. Die Punkte repräsentieren die Werte der einzelnen Patienten, der horizontale Balken den Median.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß periphere B-Zellen während der Einleitungsphase einer VIT eine verminderte Expression von HLA-II, CD5, CD23, CD32 und CD54 aufweisen, während die Expression von CD40, CD86, CD95 und HLA-I unverändert bleibt. Da sowohl der Anteil der B-Zellen, die diese Marker exprimieren, als auch die MFI der markierten Antikörper auf den Zellen abnehmen, kann man davon ausgehen, daß es sich nicht um eine Verschiebung von bestimmten B-Zellpopulationen in andere Kompartimente handelt, sondern daß diese Effekte eine Veränderung des Phänotyps auf Einzelzellebene darstellen. Diese Veränderungen der einzelnen B-Zelle können als Indikatoren verschiedener Effekte der VIT auf periphere B-Zellen gedeutet werden.

Dabei scheint die VIT zum einen eine allergenunspezifische Reduktion der B-Zell-Aktivität zu bewirken, da die Expression der Aktivierungsmarker HLA-II, CD32 und CD54 abnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden alle peripheren B-Zellen und nicht nur die allergenspezifischen Zellen untersucht, so daß es sich um einen allergenunspezifischen und nicht um einen spezifischen Effekt handelt. In den meisten IT-Studien wurden jedoch bislang ausschließlich spezifische Effekte untersucht. So wurde eine veränderte Zytokinsekretion nach Allergenstimulation, nicht jedoch nach Stimulation mit einem Kontrollantigen gemessen (8,74). Auch die Proliferation verringerte sich nur bei spezifischer Stimulation mit Wespengiftextrakt und nicht bei unspezifischer Stimulation mit Tetanustoxin (3). Ein allergenunspezifischer Effekt wurde dagegen von Segura et al (117) mit einer verminderten T-Zell-Reagibilität ermittelt, und auch die beschriebenen Veränderungen der Oberflächenmarker peripherer mononukleärer Zellen z.B. in der Studie von Bellinghausen et al (15) und Hakansson et al (58) sind unspezifisch. Es treten also sowohl allergenspezifische als auch allergenunspezifische Effekte während der IT auf, die unterschiedlich erklärt werden müssen.

Zum anderen könnten die beobachteten Veränderungen im Sinne einer B-Zell-Anergie gedeutet werden. Eine B-Zell-Anergie geht mit einer deutlichen Abnahme des mIgM, also des BZR, einher (98). In dieser Arbeit wurde zwar nicht die Expression des mIgM ermittelt, dafür wurde die Expression von CD32 und CD5, die beide mit dem BZR assoziiert sind, gemessen. Beide wurden während der Einleitungsphase der Therapie weniger von B-Zellen exprimiert, was Ausdruck einer Anergie der B-Zellen sein könnte. Die Expression des BZR während einer VIT wurde bisher nicht untersucht, könnte aber weitere Aufschlüsse darüber ergeben, ob auch eine B-Zell-Anergie neben der schon beschriebenen T-Zell-Anergie bei der Wirksamkeit der IT eine Rolle spielt.

Ferner scheint die APZ-Funktion der B-Zellen nach Einleitung der VIT eingeschränkt zu sein, da sich die Expression von HLA-II während der Einleitungsphase signifikant verringert und die HLA-II-Expression, wie in 2.2.2.1. dargelegt, eine notwendige Voraussetzung für die Präsentation von Antigenen ist.

Die Veränderungen der Ig-Spiegel, die ja schon vielfach beschrieben wurden, sind ein Indiz dafür, daß die untersuchten Patienten - zumindest in dieser Hinsicht - sich nicht von anderen untersuchten Kollektiven von Wespengiftallergikern unterscheiden.

Die beobachteten Modulationen werfen nun folgende Fragen auf:

- Wodurch werden sie bedingt?
- Was sind ihre Folgen?
- Wieso treten die phänotypischen Modulationen nur transient auf?
- Spielen sie als Wirkmechanismus der IT eine Rolle oder handelt es sich lediglich um Epiphänomene?

## 5.1 Mögliche Ursachen für die beobachteten Effekte

### 5.1.1 Veränderungen der T-Helferzell-Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$

Wie in Abschnitt 2.4.2. dargelegt, bedingt die IT eine Veränderung des Zytokinmilieus mit einer Verschiebung der IL-4/IFN- $\gamma$ -Ratio zu Ungunsten des IL-4. Da diese Zytokine auch den Phänotyp von B-Zellen beeinflussen, sind sie als Auslöser der hier beschriebenen phänotypischen Modulationen denkbar. So wird die Expression von HLA-II, CD23 und CD54 auf B-Zellen durch IL-4 induziert (13,19,128). Verminderte IL-4-Spiegel werden schon während der Einleitungsphase gemessen (15,117), so daß die verminderte Expression der Oberflächenmoleküle durch die verminderte IL-4-Sekretion bedingt sein könnte. Auch Jung et al (73) und Hakansson et al (58), die bei Atopikern eine verminderte Expression von CD23 bedingt durch IT beschrieben haben, und Bellinghausen et al (15), die neben weiteren Effekten eine reduzierte Expression von IL-4R und CD23 bei Wespengiftallergikern ermittelt haben, versuchen dies über die Veränderung der Zytokinspiegel zu erklären.

Allerdings bleibt, wenn dies die einzige Ursache für die in dieser Arbeit beschriebenen phänotypischen Veränderungen sein soll, die Frage offen, warum nur eine transiente Herunterregulation der untersuchten Moleküle zu beobachten ist, da der IL-4-Spiegel im Laufe der VIT weiter reduziert bleibt (3).

Auch für die beobachteten Veränderungen der Immunglobulin-Spiegel bietet die verringerte IL-4/IFN- $\gamma$ -Ratio einen Erklärungsansatz. IL-4 ist sowohl für den Klassenwechsel zu IgE als auch zu IgG4 notwendig (49,79); es scheint aber die IgG4-Produktion von Zellen, die bereits den Klassenwechsel vollzogen haben, zu inhibieren (16). So wurde gezeigt, daß eine ansteigende IL-4/IFN- $\gamma$ -Ratio ansteigende IgE-Spiegel bewirkt, eine fallende IL-4/IFN- $\gamma$ -Ratio aber die IgG4-Produktion zu Ungunsten der IgE-Produktion steigert (23). Die Langzeiteffekte der IT auf die Ig-Spiegel, nämlich die Reduktion des IgE und der Anstieg des IgG4, könnten also durch die Verringerung der IL-4/IFN- $\gamma$ -Ratio bedingt sein.

### 5.1.2 Erhöhung des IL-10-Spiegel

Die Konzentration des IL-10 steigt während der IT sehr schnell an (6). Wie schon in 2.4.2. beschrieben, induziert IL-10 eine spezifische T-Zell-Anergie, gemessen an verminderter Proliferation und Zytokinsekretion (6). Dieser inhibierende Einfluß auf die T-Zellen ist abhängig von APZ (siehe Abbildung 20), und es wurde gezeigt, daß auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen MHC-II, CD54 und CD86 durch IL-10 herunterreguliert wird (37,45,120,122,133) und somit die Fähigkeit dieser Zellen, eine T-Zellproliferation zu vermitteln, inhibiert wird.

IL-10 scheint aber die Fähigkeit der B-Lymphozyten, Ag zu präsentieren, nicht zu beeinflussen. So wurde in einem Mausmodell die T-Zell-Zytokinproduktion durch IL-10 bei Inkubation mit Makrophagen als APZ inhibiert, bei Milz-B-Zellen als APZ dagegen nicht (45). Auch die MHC-II- und CD86-Expression, die auf Monozyten durch IL-10 herunterreguliert wird, blieb auf einer EBV-B-Zell-Linie bzw. isolierten peripheren B-Zellen konstant (32,37). Allerdings wurde gezeigt, daß die MHC-I-Expression auf B-Zellen durch IL-10 reduziert wurde (139). Der Einfluß des IL-10 auf den Phänotyp von B-Zellen scheint also noch nicht eindeutig verstanden zu sein, insbesondere weil die überwiegenden Studien entweder mit Maus-B-Zellen oder B-Zell-Linien und nicht mit humanen peripheren B-Zellen durchgeführt wurden.

IL-10 hat auch Einfluß auf die Ig-Produktion (siehe Abb. 20), da die durch IL-4 und sCD40L induzierte IgE-Produktion durch IL10 gehemmt und gleichzeitig die IgG4-Produktion gesteigert wird (6). In einer weitergehenden Studie von Jeannin et al (68) wurde ferner gezeigt, daß IL-10, wenn es zu Beginn der Stimulation mit IL-4 oder IL-13 zu PBMC-Kulturen gegeben wurde, die  $\epsilon$ -GLT- und IgE-Synthese hemmt, die  $\gamma$ 4-Transkripte und IgG4-Synthese jedoch steigert. Wenn IL-10 dagegen nach dem 2. Tag der Stimulation zu den Kulturen gegeben wurde, hat es einen steigernden Effekt auf die IgE-Synthese. Diese Zeitabhängigkeit wurde für die IgG4-Produktion nicht ermittelt, hier behält IL-10 seine steigernde Wirkung. Dies bedeutet, daß IL-10 für die IgE-Synthese auf naive B-Zellen eine inhibierende, auf B-Zellen, die bereits auf IgE umgeschaltet haben, jedoch eine fördernde Wirkung ausübt (68).

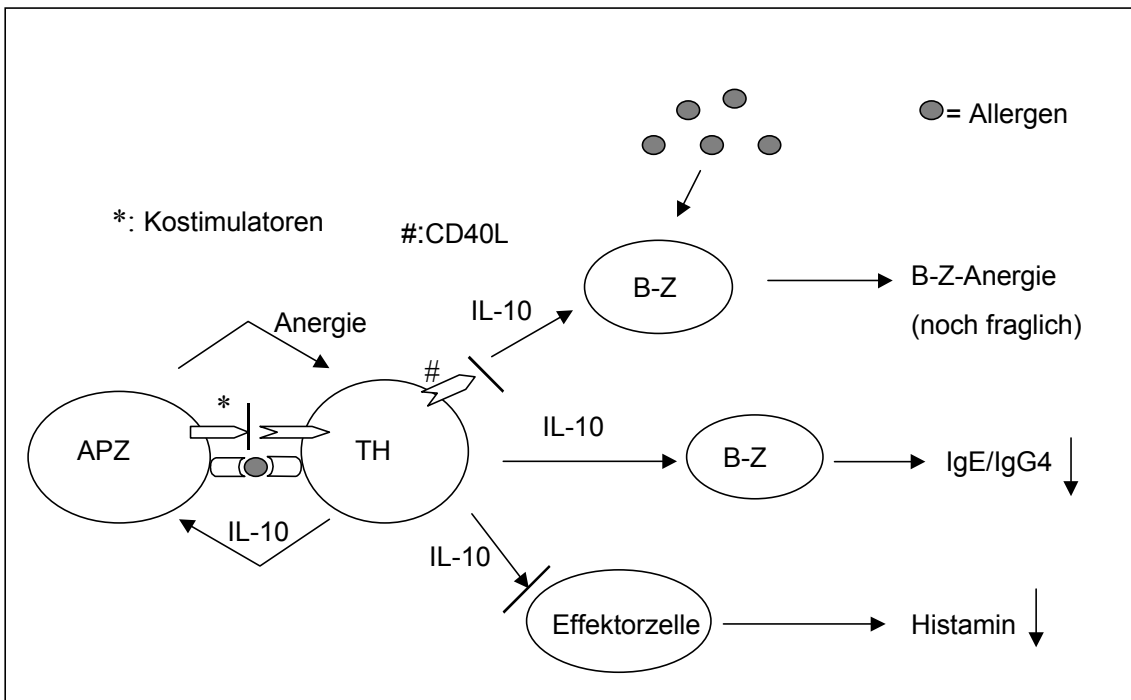


Abbildung 20: Die Wirkung des IL-10 auf APZ, TH-Zellen, B-Zellen und Effektorzellen.

Dies auf die Situation während der IT übertragen, kann zu einem besseren Verständnis der komplexen Veränderungen der Ig-Spiegel beitragen. So könnte der initiale Anstieg des sIgE nach Beginn der Therapie von schon geschwichtenen B-Zell-Populationen stammen, deren Produktion durch IL-10 weiter gefördert wird. Dagegen hat IL-10 einen negativen Effekt auf den IgE-Klassenwechsel ungeschwichteter Zellen, so daß langfristig das IgE abfällt, im Gegensatz zu IgG4, dessen Produktion durch IL-10 nicht inhibiert sondern gefördert wird. So kann sowohl der initiale Anstieg als auch der langfristige Abfall des sIgE und der Anstieg des sIgG4 durch IL-10 erklärt werden.

### 5.1.3 T-Zell-Anergie

Die durch IL-10 induzierte T-Zell-Anergie führt nicht nur zu verminderter T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion (4), sondern auch zu einer verminderten Fähigkeit, ihre Helfer-Effektorfunktion auszuführen. Dies könnte daher einige der hier beschriebenen Effekte erklären. So wurde gezeigt, daß die durch TZR/CD3-vermittelte Induktion von CD40L bei anergen T-Zellen verhindert wird (21). Anergie T-Zellen haben also eine reduzierte CD40L-Expression (siehe Abb. 20), was gut mit der Tatsache vereinbar ist, daß auch während der VIT eine verringerte CD40L-Expression ermittelt wurde (15). Die verringerte CD40-CD40L-Interaktion kann auf B-Zellen wiederum zahlreiche Effekte haben. So wurde gezeigt, daß die *in vitro*-Blockierung dieses Interaktionsweges die B-Zellproliferation und Differenzierung hemmt (27,36). Auch ist das CD40-Signal für den Isotypen-Switch essentiell, wie in Maus-Modellen (77,136) und auch in *in vitro* Versuchen (66) bei humanen Zellen ermittelt wurde. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß beim X-chromosomal gebundenen Hyper-IgM-Syndrom, bei dem der Isotypenwechsel nicht durchgeführt werden kann, ein Defekt im CD40L-Gen liegt (9). Auch die Expression einiger Oberflächenmoleküle auf B-Zellen wird durch CD40-CD40L-Interaktion induziert, so die B7-, CD23- und CD54-Expression (13,24,107). Die Anergie der T-Zellen während der VIT könnte also zur beschriebenen Reduktion der CD23- und CD54-Expression beitragen.

### 5.1.4 Direkte Wirkung des Allergens

Auch eine direkte Wirkung des Allergens auf die B-Zellen während der VIT ist denkbar. So kann

eine hohe Dosis des Antigens ohne ausreichende Kostimulation durch TH-Zellen eine Anergie der B-Zellen bewirken (60,98). Ein Indiz für eine nicht ausreichende TH-Zell-Stimulation ist auch die verringerte CD40L-Expression, die nach einer Woche Schnell-VIT ermittelt wurde (15), denn der CD40-CD40L-Signalweg ist für B-Zellen sehr wichtig (31).

Die kumulative Allergendosis ist während der Einleitungsphase der Schnell-VIT sehr hoch, danach wird jedoch nur in größeren Abständen Allergen appliziert. Die Transienz der beschriebenen Veränderungen der Expression der Oberflächenmoleküle könnte also durch die nur in der ersten Woche existierenden hohen kumulativen Allergendosen begründet sein.

Die Ag-Konzentration hat auch einen Einfluß auf die Ig-Produktion (siehe Abb. 21). So wurde in einem Maus-Modell bei einer niedrigen Ag-Dosis ein hoher IgE-Spiegel, bei einer hohen Ag-Dosis ein niedriger IgE-Spiegel ermittelt (125). Dies scheint bei der Maus jedoch nicht - wie naheliegend - durch veränderte Zytokinmuster (TH2 versus TH1) erklärt zu sein (10). Beim Menschen werden die Ig-Spiegel auch über die Ag-Dosis mitreguliert, jedoch gingen hier die Veränderungen mit entsprechenden Zytokinverschiebungen einher. So wurde bei einer niedrigen Ag-Dosis eine TH2-dominierte Zytokinsekretion mit konsekutiver Erhöhung des IgE ermittelt, bei hoher Ag-Dosis dagegen stieg IFN- $\gamma$  an, und demzufolge verringerte sich der IgE-Spiegel (17,116). Die hohe Ag-Dosis der ersten Therapiewoche könnte also die bereits diskutierte Veränderung der IL-4/IFN- $\gamma$ -Ratio erklären.

## **5.2 Wirkmechanismus oder Epiphänomen?**

Ob die beobachteten Effekte weitere Mechanismen, die für die Wirksamkeit der IT mitverantwortlich sind, darstellen oder ob sie nur Epiphänomene sind, kann nicht vollständig beantwortet werden, soll aber an dieser Stelle diskutiert werden.

### **5.2.1 Allergenunspezifische Reduzierung des Aktivierungsniveaus peripherer B-Zellen**

Wie dargelegt führt die Einleitung der VIT zu einer allergenunspezifischen Reduktion des Aktivierungsniveaus peripherer B-Zellen. So wie die T-Zell-Anergie eine verminderte Expression einiger Oberflächenmarker bedingen könnte, könnte auch umgekehrt die Reduktion einiger B-Zell-Oberflächenmoleküle Einflüsse auf T-Zellen haben. So spielt z.B. CD54 als kostimulatorisches Molekül für die Aktivierung der TH-Zellen eine wichtige Rolle, z.B. konnte die T-Zell-Proliferation von blockierenden anti-CD54-AK inhibiert werden (42). B- und T-Zellen stehen über viele Interaktionen miteinander in Verbindung (27), und Veränderungen der einen Zellart bedingen auch immer Veränderungen der anderen, so daß die Frage der Kausalität hier nicht zu beantworten ist.

### **5.2.2 Einflüsse auf die IgE-Regulation**

Die IgE-Produktion wird sehr komplex reguliert und, wie in 2.2.2.3. erklärt, spielen neben den beiden Hauptsignalen IL-4 bzw. IL-13 und CD40-CD40L-Interaktion eine Reihe weiterer Moleküle eine Rolle, so auch CD23 und CD54, die beide - wie hier gezeigt wurde - durch die VIT wenigstens tendentiell moduliert wurden. Es ist also denkbar, daß diese Veränderungen bei der durch die IT veränderten Ig-Spiegel kausal beteiligt sind.

Die Wirkung des CD23 auf die IgE-Synthese wird kontrovers diskutiert. So wurde durch CD23-CD21-Bindung die IL-4 induzierte IgE-Produktion gesteigert (11). Auch sCD23 scheint eine steigernde Wirkung auf die IL-4 induzierte IgE-Synthese zu haben (18). Durch Blockade der Metalloprotease, die die proteolytische Spaltung des CD23 katalysiert, wurde die IL-4- und anti-CD40-AK-induzierte IgE-Produktion parallel zur Abnahme des sCD23 inhibiert (132).

Aber es wurden auch negative Signale des CD23 auf die IgE-Produktion beschrieben. In einem Maus-Modell mit CD23-transgenen Mäusen wurde durch hohe Expression von CD23 die CD40L- und IL-4-induzierte IgE-Synthese dosisabhängig gehemmt (26). Von Corry und Kheradmand (30) wurde die Hypothese aufgestellt, daß CD23 zu Beginn einer IgE-vermittelten

Immunantwort die IgE-Synthese fördert, daß es aber, wenn die CD23-Expression durch IL-4 stark erhöht ist, eher negative Signale weiterleitet. Es soll hier noch einmal darauf hingewiesen werden, daß v.a. bei Mäusen negative Effekte, beim Menschen dagegen eher positive Einflüsse ermittelt wurden.

Wie in 2.4.2.5. dargelegt, wurde bei atopischen Patienten und bei Giftallergikern ein Einfluß der IT auf die CD23-Expression festgestellt. Ob die hier beobachtete transiente (nicht-signifikante) Reduktion der CD23-Expression an der Ig-Titermodulation beteiligt ist, bleibt spekulativ. Die Veränderungen der Ig-Titer wurden zwar auch schon nach einer Woche VIT gemessen, sind aber nach 3 Wochen deutlicher und halten auch länger an, so daß die transiente Herabregulation der CD23-Expression zeitlich mit der Ig-Modulation kaum vereinbar ist. Auch bei Bellinghausen (15) wurde die CD23-Expression nur nach einer Woche Schnell-VIT gemessen.

CD54 ist ebenfalls an der IgE-Regulation beteiligt, und zwar vermittelt es über Interaktion mit LFA-1 die Aggregation der B-Zellen, die bei der IL-4- und anti-CD40-AK-induzierten IgE-Stimulation vor der IgE-Synthese beobachtet wird (76). Durch anti-CD54-AK wurde die IgE-Synthese durch Erhöhung der  $\epsilon$ -GLT-Konzentration gesteigert (76). Wie für CD23 gilt auch für CD54, daß ein kausaler Zusammenhang der reduzierten Expression nach einer Woche VIT mit den veränderten Ig-Spiegeln aufgrund der zeitlichen Differenzen unwahrscheinlich ist. Es wäre jedoch interessant, die CD23- und CD54-Expression nach längerer Zeit VIT zu ermitteln, da zum Zeitpunkt des Abfalls des IgE-Spiegels ein Zusammenhang zu der CD23- bzw. CD54-Expression bestehen könnte.

### 5.2.3 Reduzierte CD32-Expression

Wie in 4.1.2. beschrieben, wird auch die Expression von CD32 durch die Einleitung der VIT moduliert. Einerseits kann CD32 als Aktivierungsmarker von B-Zellen interpretiert werden, da die Expression von CD32 auf B-Zellen durch anti-IgM- oder PMA-Stimulation heraufreguliert wird (114), andererseits spielt möglicherweise die inhibitorische Regulation des BZR-Signals bei der VIT eine Rolle.

Der menschliche Fc $\gamma$ -II-Rezeptor wird von 3 Genen (IIa, IIb, IIc) auf dem Chromosom 1 codiert, durch alternatives Spleißen entstehen 6 verschiedenen Proteine (50). Der Fc $\gamma$ R-IIb unterscheidet sich deutlich von IIa und IIc sowohl in seiner Struktur als auch in seiner Funktion. Während IgG-Bindung von IIa und IIc zu einer Aktivierung von Zellen führt, hat IIb negative Effekte. Die BZR-Signaltransduktion wird durch Hemmung des Calcium-Einstroms negativ reguliert. Ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) wurde im zytoplasmatischen Abschnitt des Fc $\gamma$ R-IIb identifiziert und kann hierfür verantwortlich gemacht werden (35,50,112). Die bisher erhältlichen monoklonalen Antikörper binden an alle Subtypen des Fc $\gamma$ R-II, so daß aus der durchflußzytometrischen Untersuchung nicht auf die Verteilung der Subtypen auf den B-Zellen geschlossen werden kann (siehe hierzu auch (50)).

Fc $\gamma$ R-II hat einen Einfluß auf IgE-vermittelte allergische Reaktionen, da Immunkomplexe, die IgE enthalten, auch von Fc $\gamma$ R-II gebunden werden können. Dies wurde in einer Studie mit *knock-out* Mäusen dargelegt (126). Interessanterweise zeigten Fc $\gamma$ R-IIb-defiziente Mäuse verstärkte IgE-vermittelte Reaktionen, dagegen war diese bei Mäusen mit einer Defizienz des aktivierenden Fc $\gamma$ R-III vermindert.

IgG-Immunkomplexe binden mit höherer Affinität als IgE-Immunkomplexe an CD32 und auch IgG kann an anaphylaktoiden Reaktionen beteiligt sein, z.B. degranulieren Eosinophile nach Bindung von sIgG an CD32 (75). Die Relevanz von IgG-vermittelten Reaktionen für die Typ-I-Allergie ist jedoch noch umstritten.

Auch Basophile exprimieren CD32, und durch Koaggregation kommt es zur Modulation der IgE-vermittelten IL-4-Synthese. Körber et al (80) haben gezeigt, daß interindividuelle Varianz bezüglich der Verteilung der Isoformen (Fc $\gamma$ R-IIa, -B, -C) auf den Basophilen besteht und wiesen darauf hin, daß u.U. diese die unterschiedlichen Reaktionen der Patienten auf die IT erklärt. Es kann spekuliert werden, daß auch B-Zellen von Patienten eine interindividuelle Varianz der Verteilung der Subtypen zeigen und die negative BZR-Regulation des Fc $\gamma$ R-IIb als möglicher Mechanismus der IT zu ihrer Effizienz beiträgt.

## 5.2.4 Reduzierte Antigen Präsentation von B-Zellen

Die Expression von HLA-II auf peripheren B-Zellen ist nach der Einleitungsphase der VIT signifikant geringer als vor Beginn der Therapie, was zeigt, daß die Fähigkeit der B-Zellen zur Antigenpräsentation durch die IT verringert wird. Dies spielt für die Wirksamkeit der Therapie u.U. eine Rolle, denn die Art der APZ hat einen wesentlichen Einfluß auf den Typ der Immunantwort (siehe Abb. 21). So wurde gezeigt, daß im Falle von B-Zellen als APZ eher eine TH2-Antwort folgt, daß jedoch Monozyten als APZ eher eine TH1-Antwort bewirken (7). Bei Monozyten und Makrophagen als APZ wurde verstärkt IL-12 und IFN- $\gamma$ , dagegen weniger IL-4, IL-5 und IL-13 produziert mit der Folge, daß der Titer des IgG4 anstieg, der des IgE jedoch abfiel. Bei B-Zellen wurde eine erhöhte IL-4-, IL-5- und IL-13-Sekretion und eine reduzierte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Sekretion gemessen mit der Folge, daß der IgE Titer anstieg (7).

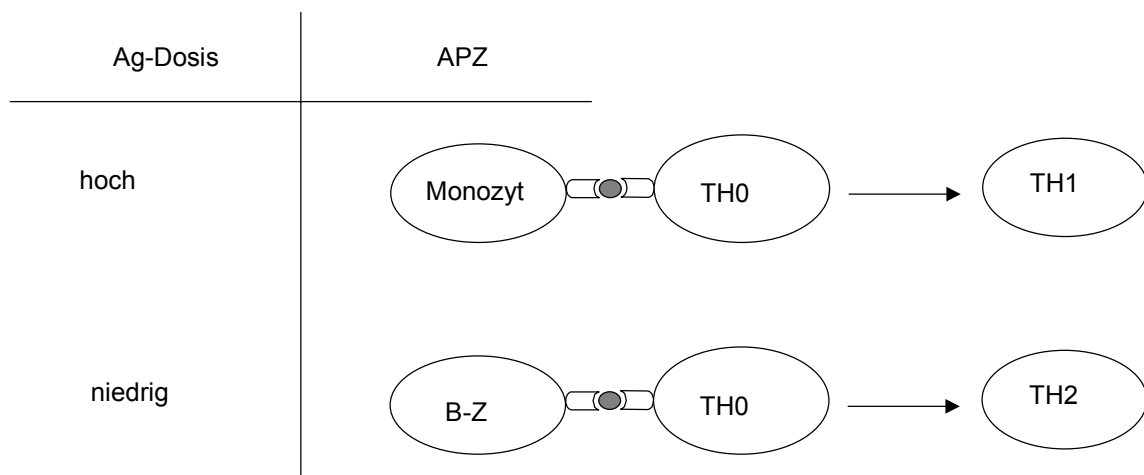


Abbildung 21: Der Einfluß der Ag-Dosis und der Art der APZ auf die Immunantwort.

Auch Secrist et al (116) haben bei B-Zellen als APZ einen erhöhten IL-4-Spiegel, bei Monozyten einen erniedrigten IL-4-Spiegel beschrieben.

Die Relevanz der B-Lymphozyten nimmt bei geringer Antigenkonzentration zu, da sie mit ihrem spezifischen BZR mit hoher Affinität Ag binden können (5).

Wenn man diese Aspekte der APZ und ihre funktionellen Konsequenzen auf die Situation der VIT überträgt, ergibt sich die Möglichkeit, einige der beschriebenen Veränderungen von immunologischen Parametern zu erklären. Durch die Reduktion der HLA-II auf der Oberfläche ist die Fähigkeit der B-Zellen, Ag zu präsentieren, geschwächt, gleichzeitig steigt die Ag-Konzentration während der Einleitungsphase stark an. Dies spricht beides dafür, daß eher andere Zellen als B-Zellen als APZ in der Einleitungsphase eine Rolle spielen und kann wiederum dazu führen, daß das Zytokinmilieu von einer TH2-Dominanz in Richtung TH1 verschoben wird. Die verminderte Funktion der B-Zellen als APZ könnte also dazu beitragen, die allgemein als Hauptmechanismus geltende Verlagerung von TH2 zu TH1 zu erklären.

## 5.2.5 Zeitverlauf der Veränderungen der immunologischen Parameter

Es ist kritisch anzumerken, daß in vielen Studien nicht auf die zeitlichen Zusammenhänge der immunologischen Veränderungen während einer IT eingegangen wird und so die komplexen Verhältnisse stark vereinfacht werden.

Sehr wahrscheinlich sind verschiedene Mechanismen für die Wirksamkeit der IT verantwortlich. Der frühe Schutz direkt nach der Einleitungsphase könnte z.B. andere Ursachen als die Langzeitwirkung haben. Für den frühen Schutz spielt die verminderte Mediatorfreisetzung aus Effektorzellen (103) eine wichtige Rolle, die zumindest partiell durch den erhöhten IL-10-Spiegel bedingt wird. IL-10 wird nach einer Woche IT autokrin von T-Zellen sezerniert und bedingt auch

die T-Zell-Anergie. Die Ursache für die Induktion des IL-10 durch die IT ist noch nicht erkannt. Ob an diesen Zusammenhängen auch die reduzierte B-Zellaktivität, z.B. durch verminderte B-T-Zell-Interaktion beteiligt ist, bleibt vorerst unbeantwortet.

Für die Langzeitwirkung dagegen ist wahrscheinlich eher der TH2-TH1-Shift mit daraus resultierender Veränderung der Ig-Titer verantwortlich. Hier bleibt die Frage offen, warum die Ig-Titer nicht verlässlicher eine Aussage über den Erfolg bzw. Mißerfolg der IT zulassen. Das in jüngerer Zeit entwickelte Immunoblotverfahren, bei dem die spezifische Antikörperreaktivität gegen jedes einzelne Allergen im Allergenextrakt erfaßt wird, könnte u.U. prognostische Aussagekraft besitzen (70). Es zeigte sich, daß Patienten, die in der Stichprovokation ungeschützt waren, bei mindestens einer Allergenbande, bei der sie IgE-AK aufwiesen, kein IgG4-AK hatten, geschützte Patienten dagegen wiesen bei allen Banden, bei denen sie vor VIT IgE-AK besaßen, auch IgG4-AK auf (99). Durch dieses Verfahren gewinnt also die Theorie der „*blocking antibodies*“ wieder an Gewicht. Allerdings fehlen noch große Studien mit geeigneten Patientenkollektiven, die diese Ergebnisse bestätigen.

## 6 Zusammenfassung

Die Wespengiftallergie stellt eine typische allergische Sofortreaktion (Typ-I-Allergie) dar. Für diese IgE-vermittelten, pathologischen Immunreaktionen ist die spezifische Immuntherapie die einzige zur Zeit zur Verfügung stehende kausale Therapie. Die Mechanismen, welche für die zweifelsfrei bewiesene Wirksamkeit der IT verantwortlich sind, sind trotz intensiver Bemühungen weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Als wichtigste These wird zur Zeit eine Verlagerung des pathologischen, TH2-dominierten Zytokinmilieus in Richtung „normales“ TH1-Milieu diskutiert. Zusätzlich werden charakteristische Ig-Titer-Veränderungen mit initialem Anstieg und längerfristigem Abfall des sIgE und Anstieg des sIgG4 beschrieben. Die sIgG4-Antikörper könnten protektiv wirksam sein, da sie kompetitiv mit dem IgE um Ag-Bindung konkurrieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der IT auf periphere B-Zellen hinsichtlich ihrer Immunglobulin-Produktion und ihres Phänotyps untersucht. 15 Patienten mit systemischen Reaktionen nach Wespenstich, Nachweis von spezifischem IgE und mit positivem Hauttest gegenüber Wespengift, bei denen eine Schnell-Immuntherapie eingeleitet wurde, wurden vor Beginn der Therapie (Tag 1), am Tag ihrer Entlassung (Tag 6), also einen Tag, nachdem die Erhaltungsdosis von 100 µg erreicht wurde, und vor der 2. ambulanten Allergieninjektion am 26. Tag untersucht. Die Expression von CD5, CD23, CD32, CD40, CD54, CD86, CD95, HLA-I-ABC und HLA-II-DR wurde auf peripheren mononukleären Blutzellen durchflußzytometrisch mit Hilfe von monoklonalen, PE-konjugierten Antikörpern bestimmt. Anti-CD19 FITC wurde als spezifischer B-Zellmarker benutzt. Sowohl die Prozentzahl der doppelt-positiven Zellen als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der PE-konjugierten Antikörper wurden ausgewertet. Die Serum-Titer des Gesamt-IgE, Wespengift-spezifischen IgE und Wespengift-spezifischen IgG4 wurden mittels ELISA bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Test für nicht-parametrische, verbundene Daten benutzt.

Die Expression von CD54, CD5, CD32 und HLA-II-DR wurde durch die IT signifikant und die von CD23 tendenziell modifiziert. So war die Expression dieser Moleküle auf der Oberfläche peripherer B-Zellen am Tag 6 im Vergleich zum Ausgangswert vom Tag 1 reduziert. Am 26. Tag wurden wieder Werte auf der Höhe der Ausgangswerte vom Tag 1 gemessen. Dagegen veränderte sich die Expression von CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC während der untersuchten Zeitpunkte nicht. Die Ig-Titer veränderten sich in der für die IT charakteristischen Weise. So stieg nach 3 Wochen der Gesamt-IgE-, sIgE- und sIgG4-Titer hochsignifikant an. Der Anstieg des sIgG4 korreliert nicht mit der Effizienz der IT (1,95), man kann ihn lediglich als Hinweis auf eine immunologische Antwort auf die IT werten. In dieser Arbeit bietet er v.a. ein Indiz dafür, daß sich das untersuchte Patientenkollektiv nicht von anderen, bisher untersuchten Kollektiven unterscheidet und somit eine repräsentative Stichprobe darstellt.

Die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle ist als Indikator für Veränderungen der Aktivationslage und des funktionellen Status der Zellen während der VIT zu interpretieren. So spricht die Reduktion der Expression von CD32, CD54 und HLA-II für eine verminderte Aktivierungslage der peripheren B-Zellen. Ferner deutet die Reduktion von CD5 und CD32 auf eine Anergie der B-Zellen hin, induziert durch die hohe Allergendosis während der Einleitungsphase. Durch die tendenziell bzw. signifikant reduzierte Expression von CD23 und CD54 könnte die T-B-Zell-Interaktion verschlechtert werden, die für die Effektorfunktionen beider Zellen bedeutsam ist, so daß z.B. Veränderungen der T-Zellreagibilität, beobachtet während der IT, hierdurch mitbedingt sein könnten.

Einen wesentlichen Beitrag zur Wirksamkeit der IT könnte auch die verminderte Expression des HLA-II leisten, da HLA-II für die Ag-Präsentation essentiell ist. Da B-Zellen als APZ eher eine TH2-Antwort fördern und sie anscheinend in ihrer Fähigkeit, Antigen zu präsentieren, während der Einleitungsphase eingeschränkt sind, könnte dies zu der zur Zeit als wichtigstem Wirkmechanismus diskutierten Verlagerung des Zytokinmilieus von TH2 in Richtung TH1 beitragen.

Unklar bleiben die zeitlichen Zusammenhänge. So ist die Modulation des Phänotyps der B-Zellen nur transient, und nach 4 Wochen IT ist wieder das Ausgangsniveau erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch erst ein signifikanter Anstieg der Ig-Level zu beobachten, so daß fraglich bleibt, ob die Modulationen in kausalem Zusammenhang miteinander stehen. Es bleibt daher in

weiteren Untersuchungen zu klären, ob die allergenunspezifische Reduzierung der Aktivitätslage peripherer B-Zellen während der Einleitungsphase nur ein Nebeneffekt darstellt oder ob sie an der Wirksamkeit der IT kausal beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die spezifische Immuntherapie einen Einfluß nicht nur auf die Ig-Produktion der B-Zellen hat, sondern auch auf deren Phänotyp, so daß sowohl die T-B-Zell-Interaktion als auch die Fähigkeit der B-Zellen zur Antigenpräsentation beeinflußt wird. Dies könnte Hinweise auf bisher nicht bekannte Mechanismen bieten, die an der Wirksamkeit der IT beteiligt sind.

## 7 Literaturverzeichnis

1. (1995): Measurement of specific and nonspecific IgG4 levels as diagnostic and prognostic tests for clinical allergy. AAAI Board of Directors, *J Allergy Clin Immunol* 95: 652-4.
2. Agresti A und Vercelli D (1999): Analysis of gamma4 germline transcription in human B cells, *Int Arch Allergy Immunol* 118: 279-81.
3. Akdis CA, Akdis M, et al. (1996): 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* 98: 1676-83.
4. Akdis CA und Blaser K (1999): IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy, *Faseb J* 13: 603-9.
5. Akdis CA, Blesken T, et al. (1997): Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies in vitro requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells, *J Allergy Clin Immunol* 99: 345-53.
6. Akdis CA, Blesken T, et al. (1998): Role of interleukin 10 in specific immunotherapy, *J Clin Invest* 102: 98-106.
7. Akdis CA, Blesken T, et al. (1998): Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG4 responses by conformational antigen variants, *Eur J Immunol* 28: 914-25.
8. Akoum H, Tscopoulos A, et al. (1996): Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes, *Immunology* 87: 593-8.
9. Allen RC, Armitage RJ, et al. (1993): CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome [see comments], *Science* 259: 990-3.
10. Arps V, Sudowe S und Kolsch E (1998): Antigen dose-dependent differences in IgE antibody production are not due to polarization towards Th1 and Th2 cell subsets, *Eur J Immunol* 28: 681-6.
11. Aubry JP, Pochon S, et al. (1992): CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production, *Nature* 358: 505-7.
12. Bacharier LB und Geha RS (2000): Molecular mechanisms of IgE regulation, *J Allergy Clin Immunol* 105: 547-558.
13. Bacharier LB, Jabara H und Geha RS (1998): Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation, *Int Arch Allergy Immunol* 115: 257-69.
14. Barnes PJ (1999): Therapeutic strategies for allergic diseases, *Nature* 402: B31-8.
15. Bellinghausen I, Metz G, et al. (1997): 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* 27: 1131-9.
16. Blaser K (1996): Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production, *Adv Exp Med Biol* 409: 295-303.
17. Blaser K, Carballido J, et al. (1998): Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2, *Int Arch Allergy Immunol* 117: 1-10.
18. Bonnefoy JY, Gauchat JF, et al. (1996): Pairs of surface molecules involved in human IgE regulation: CD23-CD21 and CD40-CD40L, *Eur Respir J* 9: 63s-66s.
19. Bonnefoy JY, Lecoanet-Henchoz S, et al. (1997): Structure and functions of CD23, *Int Rev Immunol* 16: 113-28.

20. Bousquet J, Lockey R und Malling HJ (1998): Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper, *J Allergy Clin Immunol* 102: 558-62.
21. Bowen F, Haluskey J und Quill H (1995): Altered CD40 ligand induction in tolerant T lymphocytes, *Eur J Immunol* 25: 2830-4.
22. Brehler R (1999): Ultra-Rush-Hyposensibilisierung, *Allergologie* 22: S70-S71.
23. Carballido JM, Carballido-Perrig N, et al. (1994): Regulation of IgE and IgG4 responses by allergen specific T-cell clones to bee venom phospholipase A2 in vitro, *J Allergy Clin Immunol* 93: 758-67.
24. Challa A, Pound JD, et al. (1999): Epitope-dependent synergism and antagonism between CD40 antibodies and soluble CD40 ligand for the regulation of CD23 expression and IgE synthesis in human B cells, *Allergy* 54: 576-83.
25. Charpin D, Birnbaum J und Vervloet D (1994): Epidemiology of hymenoptera allergy, *Clin Exp Allergy* 24: 1010-5.
26. Cho S, Kilmon M, et al. (1997): B Cell Activation and Ig, Especially IgE, Production Is Inhibited by High CD23 Levels in Vivo and in Vitro, *Cellular Immunology* 180: 36-46.
27. Clark EA und Ledbetter JA (1994): How B and T cells talk to each other, *Nature* 367: 425-8.
28. Cong YZ, Rabin E und Wortis HH (1991): Treatment of murine CD5- B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways, *Int Immunol* 3: 467-76.
29. Coombs RRA und Gell PGH (1968): Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell, Oxford.
30. Corry DB und Kheradmand F (1999): Induction and regulation of the IgE response, *Nature* 402: B18-23.
31. Craxton A, Otipoby KL, et al. (1999): Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes, *Adv Immunol* 73: 79-152.
32. Creery WD, Diaz-Mitoma F, et al. (1996): Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype, *Eur J Immunol* 26: 1273-7.
33. Creticos PS, Adkinson NF, Jr., et al. (1985): Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy [published erratum appears in *J Clin Invest* 1986 Nov;78(5):1421], *J Clin Invest* 76: 2247-53.
34. Czarnetzki BM, Thiele T und Rosenbach T (1990): Evidence for leukotrienes in animal venoms, *J Allergy Clin Immunol* 85: 505-9.
35. Daeron M, Latour S, et al. (1995): The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIb, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation, *Immunity* 3: 635-46.
36. de Vries JE und Yssel H (1996): Modulation of the human IgE response, *Eur Respir J* 9: 58s-62s.
37. de Waal Malefyt R, Haanen J, et al. (1991): Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, *J Exp Med* 174: 915-24.
38. Djurup R, Malling HJ, et al. (1985): The IgE and IgG subclass antibody response in patients allergic to yellow jacket venom undergoing different regimens of venom

- immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 76: 46-55.
39. Durham SR und Till SJ (1998): Immunologic changes associated with allergen immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 102: 157-64.
  40. Ebner C, Siemann U, et al. (1997): Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen [see comments], *Clin Exp Allergy* 27: 1007-15.
  41. Einarsson R (1986): Components in insect venoms and analytical methods, *Allergologie* 9: S24-S29.
  42. Evans DE, Munks MW, et al. (2000): Resting B Lymphocytes as APC for naive T Lymphocytes: Dependence on CD40 Ligand/CD40., *J Immunol* 164: 688-697.
  43. Ewan PW (1998): Venom allergy, *Bmj* 316: 1365-8.
  44. Fernandez J, Blanca M, et al. (1999): Epidemiological study of the prevalence of allergic reactions to Hymenoptera in a rural population in the Mediterranean area, *Clin Exp Allergy* 29: 1069-74.
  45. Fiorentino DF, Zlotnik A, et al. (1991): IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells, *J Immunol* 146: 3444-51.
  46. Fricker M, Helbling A, et al. (1997): Hymenoptera sting anaphylaxis and urticaria pigmentosa: clinical findings and results of venom immunotherapy in ten patients [see comments], *J Allergy Clin Immunol* 100: 11-5.
  47. Gagro A, Rabatic S, et al. (1993): Expression of lymphocytes Fc epsilon RII/CD23 in allergic children undergoing hyposensitization, *Int Arch Allergy Immunol* 101: 203-8.
  48. Gary-Gouy H, Bruhns P, et al. (2000): The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling, *J Biol Chem* 275: 548-56.
  49. Gascan H, Gauchat JF, et al. (1991): Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones, *J Exp Med* 173: 747-50.
  50. Gergely J und Sarmay G (1996): Fc gamma RII-mediated regulation of human B cells, *Scand J Immunol* 44: 1-10.
  51. Germain RN (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation, *Cell* 76: 287-99.
  52. Golden DB, Kwiterovich KA, et al. (1998): Discontinuing venom immunotherapy: extended observations, *J Allergy Clin Immunol* 101: 298-305.
  53. Golden DB, Meyers DA, et al. (1982): Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 69: 489-93.
  54. Golden DB, Valentine MD, et al. (1980): Regimens of Hymenoptera venom immunotherapy, *Ann Intern Med* 92: 620-4.
  55. Grabbe J, Haas N und Czarnetzki BM (1994): Die Mastzelle, *Hautarzt* 45: 55-64.
  56. Graft D, Golden D, et al. (1998): The discontinuation of Hymenoptera venom immunotherapy. Report from the Committee on Insects, *J Allergy Clin Immunol* 101: 573-5.
  57. Hahn J (1997): *Checkliste Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
  58. Hakansson L, Heinrich C, et al. (1998): Activation of B-lymphocytes during pollen season. Effect of immunotherapy [see comments], *Clin Exp Allergy* 28: 791-8.

59. Heppt W, Renz H und Röcken M (1998): Allergologie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
60. Hodgkin PD und Basten A (1995): B cell activation, tolerance and antigen-presenting function, *Current Opinion in Immunology* 7: 121-129.
61. Hoffman DR (1996): Hymenoptera venom proteins, *Adv Exp Med Biol* 391: 169-86.
62. Hoffman DR und Jacobson RS (1984): Allergens in hymenoptera venom XII: how much protein is in a sting?, *Ann Allergy* 52: 276-8.
63. Hunt KJ, Valentine MD, et al. (1978): A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity, *N Engl J Med* 299: 157-61.
64. Hussain R, Poindexter RW und Ottesen EA (1992): Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass, *J Immunol* 148: 2731-7.
65. Ishizaka K, Ishizaka T und Hornbrook MM (1966): Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity, *J Immunol* 97: 75-85.
66. Jabara HH, Fu SM, et al. (1990): CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells, *J Exp Med* 172: 1861-4.
67. Jeannin P, Delneste Y, et al. (1997): CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells, *J Biol Chem* 272: 15613-9.
68. Jeannin P, Lecoanet S, et al. (1998): IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10, *J Immunol* 160: 3555-61.
69. Jeep S, Eickholt M, et al. (1993): Wespengift-spezifisches IgE: Vergleich von Phadebas-RAST, Magic-Lite und Pharmacia CAP System, *Allergo Journal* 2: S136-S140.
70. Jeep S, Paul M, et al. (1996): Honeybee venom allergy: immunoblot studies in allergic patients after immunotherapy and before sting challenge, *Allergy* 51: 540-546.
71. Johansson SG, Bennich H und Wide L (1968): A new class of immunoglobulin in human serum, *Immunology* 14: 265-72.
72. Jung CM, Funk A, et al. (1997): Immunohistochemical analysis of late local skin reactions during rush venom immunotherapy, *Allergy* 52: 717-26.
73. Jung CM, Prinz JC, et al. (1995): A reduction in allergen-induced Fc epsilon R2/CD23 expression on peripheral B cells correlates with successful hyposensitization in grass pollinosis, *J Allergy Clin Immunol* 95: 77-87.
74. Jutel M, Pichler WJ, et al. (1995): Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures, *J Immunol* 154: 4187-94.
75. Kaneko M, Swanson MC, et al. (1995): Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation, *J Clin Invest* 95: 2813-21.
76. Katada Y, Tanaka T, et al. (1996): B cell-B cell interaction through intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte functional antigen-1 regulates immunoglobulin E synthesis by B cells stimulated with interleukin-4 and anti-CD40 antibody, *Eur J Immunol* 26: 192-200.
77. Kawabe T, Naka T, et al. (1994): The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation, *Immunity* 1: 167-78.

78. Kehry MR und Yamashita LC (1990): Role of the low-affinity Fc epsilon receptor in B-lymphocyte antigen presentation, *Res Immunol* 141: 77-81; discussion 105-8.
79. Kitani A und Strober W (1993): Regulation of C gamma subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells, *J Immunol* 151: 3478-88.
80. Körber H, Haisch K, et al. (2000): Modulation der IL-4 Freisetzung aus humanen Basophilen durch Fc-Rezeptor Koaggregation (Abstrakt), *Allergo Journal* 9: 34 V35.
81. Kowalski ML und Jutel M (1998): Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases, *Allergy* 53: 485-92.
82. Lack G, Nelson HS, et al. (1997): Rush immunotherapy results in allergen-specific alterations in lymphocyte function and interferon-gamma production in CD4+ T cells, *J Allergy Clin Immunol* 99: 530-8.
83. Lerch E und Muller UR (1998): Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients, *J Allergy Clin Immunol* 101: 606-12.
84. Linehan LA, Warren WD, et al. (1998): STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination, *J Immunol* 161: 302-10.
85. Lockey RF, Turkeltaub PC, et al. (1990): The Hymenoptera venom study. III: Safety of venom immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 86: 775-80.
86. Maggi E (1998): The TH1/TH2 paradigm in allergy, *Immunotechnology* 3: 233-44.
87. Majori M, Bertacco S, et al. (1998): Specific immunotherapy downregulates peripheral blood CD4 and CD8 T-lymphocyte activation in grass pollen-sensitive asthma, *Eur Respir J* 11: 1263-7.
88. Malling HJ (1998): Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment, *Allergy* 53: 461-72.
89. Michils A, Baldassarre S, et al. (2000): Early effect of ultrarush venom immunotherapy on the IgG antibody response [In Process Citation], *Allergy* 55: 455-62.
90. Michils A, Mairesse M, et al. (1998): Modified antigenic reactivity of anti-phospholipase A2 IgG antibodies in patients allergic to bee venom: conversion with immunotherapy and relation to subclass expression, *J Allergy Clin Immunol* 102: 118-26.
91. Müller U, Akdis CA, et al. (1998): Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom, *J Allergy Clin Immunol* 101: 747-54.
92. Müller U, Helbling A und Berchtold E (1992): Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety, *J Allergy Clin Immunol* 89: 529-35.
93. Müller U, Helbling A und Bischof M (1989): Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom, *Allergy* 44: 412-8.
94. Müller U, Helbling A, et al. (1990): Mastocytosis and atopy: a study of 33 patients with urticaria pigmentosa, *Allergy* 45: 597-603.
95. Müller U und Mosbech H (1993): Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms. (EAACI) The European Academy of Allergology and Clinical Immunology, *Allergy* 48: 36-46.
96. Müller UR (1988): *Insektenstichallergie: Klinik, Diagnostik und Therapie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
97. Müller UR, Horat W, et al. (1983): Anaphylaxis after Hymenoptera stings in three patients with urticaria pigmentosa, *J Allergy Clin Immunol* 72: 685-9.

98. Nossal GJ (1996): Clonal anergy of B cells: a flexible, reversible, and quantitative concept [comment], *J Exp Med* 183: 1953-6.
99. Ollert M und Ring J (1999): Prognostische Bedeutung von Immunoblot-Untersuchungen bei Hymenopterengift-Allergie, *Allergologie* 22: S78-S79.
100. Oosterwegel MA, Greenwald RJ, et al. (1999): CTLA-4 and T cell activation, *Curr Opin Immunol* 11: 294-300.
101. Parronchi P, Maggi E und Romagnani S (1999): Redirecting Th2 responses in allergy, *Curr Top Microbiol Immunol* 238: 27-56.
102. Pesando JM, Bouchard LS und McMaster BE (1989): CD19 is functionally and physically associated with surface immunoglobulin, *J Exp Med* 170: 2159-64.
103. Pierkes M, Bellinghausen I, et al. (1999): 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* 103: 326-32.
104. Przybilla B (1993): Bienen und Wespengiftallergie, *Hautarzt* 44: 611-22.
105. Punnonen J, Aversa G, et al. (1993): Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3730-4.
106. Radbruch A (1992): *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer, Berlin, Heidelberg.
107. Ranheim EA und Kipps TJ (1995): Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L, *Cell Immunol* 161: 226-35.
108. Rieber E (1996): Molekulare Mechanismen der IgE-Regulation, *Allergologie* 19: 180-183.
109. Rieger-Ziegler V, Rieger E, et al. (1999): Hymenoptera venom allergy: time course of specific IgE concentrations during the first weeks after a sting, *Int Arch Allergy Immunol* 120: 166-8.
110. Rihet P, Demeure CE, et al. (1992): Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area, *Eur J Immunol* 22: 2063-70.
111. Roitt I, Brostoff J und Male D (1998): *Immunology*, 5 edn. Mosby International Ltd, London, Philadelphia, St Louis, Sydney, Tokyo.
112. Sandor M und Lynch RG (1993): The biology and pathology of Fc receptors, *J Clin Immunol* 13: 237-46.
113. Sarfati M, Fournier S, et al. (1992): Expression, regulation and function of human Fc epsilon RII (CD23) antigen, *Immunol Res* 11: 260-72.
114. Sarmay G, Rozsnyay Z, et al. (1991): Modulation of type II Fc gamma receptor expression on activated human B lymphocytes, *Eur J Immunol* 21: 541-9.
115. Schwartz RH (1996): Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? [comment], *J Exp Med* 184: 1-8.
116. Secrist H, DeKruyff RH und Umetsu DT (1995): Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type, *J Exp Med* 181: 1081-9.
117. Segura JA, Assenmacher M, et al. (1998): Systemic T-cell unresponsiveness during rush bee-venom immunotherapy, *Allergy* 53: 233-40.
118. Sen G, Bikah G, et al. (1999): Negative regulation of antigen receptor-mediated

- signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells, *Eur. J. Immunol.* 29: 3319-3328.
119. Siemasko K, Eisfelder BJ, et al. (1998): Cutting edge: signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes, *J Immunol* 160: 5203-8.
  120. Song S, Ling-Hu H, et al. (1997): Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes, *Blood* 89: 4461-9.
  121. Stall AM, Wells SM und Lam KP (1996): B-1 cells: unique origins and functions, *Semin Immunol* 8: 45-59.
  122. Steinbrink K, Wolfli M, et al. (1997): Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells, *J Immunol* 159: 4772-80.
  123. Sterry W und Paus R (1999): *Checkliste Dermatologie*, 3 edn. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
  124. Storch V und Welsch U (1997): *Systematische Zoologie*. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
  125. Sudowe S, Rademaekers A und Kolsch E (1997): Antigen dose-dependent predominance of either direct or sequential switch in IgE antibody responses, *Immunology* 91: 464-72.
  126. Ujike A, Ishikawa Y, et al. (1999): Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG, *J Exp Med* 189: 1573-9.
  127. Urbanek R, Kemeny DM und Richards D (1986): Sub-class of IgG anti-bee venom antibody produced during bee venom immunotherapy and its relationship to long-term protection from bee stings and following termination of venom immunotherapy, *Clin Allergy* 16: 317-22.
  128. van de Stolpe A und van der Saag PT (1996): Intercellular adhesion molecule-1, *J Mol Med* 74: 13-33.
  129. Vercelli D, De Monte L, et al. (1998): To E or not to E? Can an IL-4-induced B cell choose between IgE and IgG4?, *Int Arch Allergy Immunol* 116: 1-4.
  130. Vercelli D, Jabara HH, et al. (1989): Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens, *J Exp Med* 169: 1295-307.
  131. Wahn U, Seger R und Wahn V (1999): *Pädiatrische Allergologie und Immunologie in Klinik und Praxis*, 3 edn. Urban & Fischer, München, Jena.
  132. Wheeler DJ, Parveen S, et al. (1998): Inhibition of sCD23 and immunoglobulin E release from human B cells by a metalloproteinase inhibitor, *GI 129471, Immunology* 95: 105-10.
  133. Willems F, Marchant A, et al. (1994): Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes, *Eur J Immunol* 24: 1007-9.
  134. Worm M und Henz BM (1999): Molekulargenetische Grundlagen der Allergie: Ansätze für eine molekulare Therapie. In Ganten, D. and Ruckpaul, K., eds., *Handbuch der molekularen Medizin*, Band 4, Immunsystem und Infektiologie, p. 126-155. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
  135. Wyss M, Scheitlin T, et al. (1993): Immunotherapy with aluminum hydroxide adsorbed insect venom extracts (Alutard SQ): immunologic and clinical results of a prospective study over 3 years, *Allergy* 48: 81-6.
  136. Xu J, Foy TM, et al. (1994): Mice deficient for the CD40 ligand [published erratum

appears in Immunity 1994 Oct;1(7):following 613], Immunity 1: 423-31.

137. Yu X, Fournier S, et al. (2000): The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis, J Immunol 164: 3543-53.
138. Yunginger J (1993): Insect Allergy. In Middleton, E., Reed, C., Ellis, E., Adkinson, N., Yunginger, J., and Busse, W., eds., Allergy; Principles and Practice, 4 edn., p. 1511-1521. Mosby, St Louis.
139. Zeidler R, Eissner G, et al. (1997): Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10, Blood 90: 2390-7.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Gene der konstanten Regionen der Immunglobuline .....	14
Abbildung 2: Dichotomie der TH-Antwort. ....	24
Abbildung 3: Beispiel für den Vorwärts-Seitwärts-Scatter-Dotplot. ....	31
Abbildung 4: Beispiel eines Histogramms der Fluoreszenz 1 mit anti-CD19-FITC-markierten Antikörpern. ....	32
Abbildung 5: Histogramm der Fluoreszenz 2 mit PE-markierten Kontrollantikörpern. ....	33
Abbildung 6: Beispiel eines Histogramms der Fluoreszenz 2 mit anti-CD40-PE-gelabelten Antikörpern. ....	34
Abbildung 7: Die Expression von CD5 während der VIT in Prozentzahlen der CD5 positiven CD19+ B-Zellen. ....	37
Abbildung 8: Die Expression von CD5 während der VIT, dargestellt als MFI des CD5-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. ....	38
Abbildung 9: Die Expression von CD32 während der VIT, Prozentzahlen der CD32 positiven CD19+ B-Zellen. ....	39
Abbildung 10: Die Expression von CD32 während der VIT, dargestellt als MFI des CD32-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. ....	40
Abbildung 11: Die Expression von CD54 während der VIT, in Prozentzahlen der CD54 positiven CD19+ B-Zellen. ....	41
Abbildung 12: Die Expression von CD54 während der VIT, dargestellt als MFI des CD54-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. ....	42
Abbildung 13: Die Expression von CD23 während der VIT, in Prozentzahlen der CD23 positiven CD19+ B-Zellen. ....	43
Abbildung 14: Die Expression von CD23 während der VIT, dargestellt als MFI des CD23-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. ....	44
Abbildung 15: Die Expression von HLA-DR während der VIT, in Prozentzahlen der HLA-DR positiven CD19+ B-Zellen. ....	45
Abbildung 16: Die Expression von HLA-DR während der VIT, dargestellt als MFI des HLA-DR-PE-AK auf CD19+ B-Zellen. ....	46
Abbildung 17: Gesamt-IgE der Patienten vor und während der Wespengiftimmuntherapie. ....	48
Abbildung 18: Wespengift-spezifisches IgE der Patienten vor und während der VIT. ....	49
Abbildung 19: Wespengift-spezifisches IgG4 der Patienten vor und während der VIT. ....	50
Abbildung 20: Die Wirkung des IL-10 auf APZ, TH-Zellen, B-Zellen und Effektorzellen. ....	53
Abbildung 21: Der Einfluß der Ag-Dosis und der Art der APZ auf die Immunantwort. ....	56

### 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematische Stellung einiger Hymenopteren .....	16
Tabelle 2: Wespengiftbestandteile und einige Eigenschaften .....	17
Tabelle 3: Einteilung des Schweregrads der SAR .....	19
Tabelle 4: Notfallmaßnahmen zur Behandlung anaphylaktischer Reaktionen . ....	21
Tabelle 5: Patientendaten. ....	28
Tabelle 6: Therapieprotokoll der Einleitungsphase. ....	29
Tabelle 7: Einteilung des spezifischen IgE in CAP-Klassen. ....	35
Tabelle 8: Die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD86, CD95 und HLA-I-ABC auf CD19+ B-Zellen vor und während der VIT. ....	47

### 8.3 Materialliste

	<b>Firma</b>	<b>Ort</b>
<b><u>Verwendete Geräte:</u></b>		
Zentrifuge Minifuge RF	Hereaus Sepatech	
Casy®1 Modell TT	Schärfe System GmbH	Reutlingen
Durchflußzytometer: CoulterXL	Coulter	
<b><u>Verwendete Chemikalien:</u></b>		
Dulbecco`s PBS ohne Ca, Mg	PAA Laboratories	Linz, Österreich
BSA (Bovine serum albumine)	Fluka BioChemika	Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (reinst)	Merck	Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck	Darmstadt
Ethanol (absolut)	Merck	Darmstadt
Ficoll Dichte 1,077	Biochrom KG	Berlin
<b><u>Verwendete Materialien:</u></b>		
Falcon 50 ml Röhrchen (Blue Max)	Becton Dickinson	Franklin Lakes, U.S.A.
Monovetten NH <sub>4</sub> -Heparin	Sarstedt	Nümbrecht
FACS-Röhrchen (55.526)	Sarstedt	Nümbrecht
<b><u>Wespengiftextrakte:</u></b>		
ALK-lyophilisiert SQ (Einleitungsphase)	ALK Scherax	Hamburg
ALK-depot SQ(Fortsetzungsbehandlung)	ALK Scherax	Hamburg
<b><u>CAP-ELISA:</u></b>		
IgE FEIA	Pharmacia & Upjohn	Uppsala, Schweden
sIgE FEIA	Pharmacia & Upjohn	Uppsala, Schweden
sIgG4 FEIA	Pharmacia & Upjohn	Uppsala, Schweden
<b><u>Antikörper für die Durchflußzytometrie:</u></b>		
CD5-PE (AHS0517)	Biosource	Ratingen
CD19-FITC (AHS.1918)	Biosource	Ratingen

CD23-PE (AHS2307)	Biosource	Ratingen
CD32-PE (1935)	Immunotech	Krefeld
CD40-PE (1936)	Immunotech	Krefeld
CD54-PE (1239)	Immunotech	Krefeld
CD86-PE (33435X)	Pharmingen	Hamburg
CD95-PE (33455X)	Pharmingen	Hamburg
HLA-I-ABC-PE (322.95X)	Pharmingen	Hamburg
HLA-II-DR-PE (AHU0187)	Biosource	Ratingen
IgG1-FITC (PN IM0639)	Immunotech	Krefeld
IgG1-PE (PN IM0670)	Immunotech	Krefeld
IgG2a-PE (PN IM0671)	Immunotech	Krefeld
IgG2b-PE (33805X)	Pharmingen	Hamburg

**Puffer:**

FACS-Waschpuffer:

PBS mit 0,2% BSA

FACS-Färbepuffer:

PBS mit 2% BSA und  
0,1% Natriumazid

## 8.4 Lebenslauf

### ***Persönliche Daten***

Anne Constanze Katharina Röver, geboren am 18. 9. 1973 in Berlin

### ***Schulbildung***

1980 - 1984 Nord-Grundschule Zehlendorf, Berlin  
1984 - 1993 Gymnasium Steglitz, Berlin; Allg. Hochschulreife

### ***Studium***

1993 – 1995 Studium der Volkswirtschaftslehre an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg; Erwerb des Vordiploms  
1995 - 1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg; Physikum  
seit Okt. 1997 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin  
Aug. 1998 1. Staatsexamen  
April 2001 2. Staatsexamen

### ***Praktika***

März 1998 Famulatur auf einer internistischen Station im Sankt Gertrauden-Krankenhaus, Berlin  
Aug. 1999 Famulatur auf einer dermatologischen Station, Charité Campus Virchow, Berlin  
März 2000 Famulatur auf einer internistischen Station im Wenckebach-Krankenhaus, Berlin  
April 2000 Famulatur in der Abteilung für Psychosomatik, Charité Campus Virchow, Berlin  
Aug. 2000 Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Cheltenham General Hospital, Cheltenham, Gloucestershire, England

### ***Promotion***

1998 - 2000 Thema: Phänotypische und funktionelle Charakterisierung peripherer B-Zellen während Wespengiftimmuntherapie bei Frau Prof. B. M. Henz, Arbeitsgruppe Frau Dr. M. Worm, Dermatologische Forschungslabore, Charité Campus Virchow  
Okt. 1999 Teilnahme am Europäischen Studentenkongreß 1999 der Charité  
März 2000 Teilnahme am Mainzer Allergologie-Workshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie

## 8.5 Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Beate Henz danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, ihre inhaltlichen Anregungen und für die Korrektur und Begutachtung meiner Dissertation.

Mein aufrichtiger Dank gebührt besonders Frau Dr. Margitta Worm für die gute Betreuung, die unermüdliche Unterstützung von Beginn an und auch für die stets spannende fachliche Auseinandersetzung. Ich habe mich über die freundschaftliche und angenehme Atmosphäre unseres Zusammenarbeitens sehr gefreut.

Die Arbeit in den dermatologischen Laboren wurde durch das hilfsbereite und freundliche Klima zu einer wertvollen Erfahrung. Ich möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern danken, insbesondere Guido Heine, und natürlich den Patienten für ihre bereitwilligen Blutspenden.

Schließlich möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen meiner Familie, die mich immer in Allem unterstützt, und meinem Freund Christoph .

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Anne Constanze Röver