Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Hertl
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

# Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion bei der spezifischen Immuntherapie mit Allergoiden

**Inaugural-Dissertation**
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von:
Britta Adams, geb. Höbel aus Herten / Westfalen
Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 11.06.2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Herr PD Dr. med. W. Pfützner

Korreferentin: Frau PD Dr. med. Al-Fakhri

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... I

1 EINLEITUNG ..... 01
1.1 Allergie ..... 02
1.2 Birkenpollenallergie ..... 05
1.3 T-zelluläre Faktoren der Typ-I-Allergie ..... 07
1.4 T-Helfer-1 / T-Helfer-2-Modell ..... 08
1.5 Regulatorische T-Zellen ..... 13
1.6 Zytokine ..... 16
1.6.1 Interleukin 5 ..... 16
1.6.2 Interleukin 10 ..... 17
1.6.3 Interferon γ ..... 19
1.7 Allergiediagnostik ..... 20
1.7.1 Allergenspezifisches Immunglobulin E ..... 21
1.7.2 Allergenspezifisches Immunglobulin G4 ..... 21
1.8 Allergiebehandlung ..... 23
1.8.1 Spezifische Immuntherapie ..... 25
1.8.2 Allergoide ..... 28
1.9 Fragestellung ..... 31

2 MATERIAL UND METHODEN ..... 33
2.1 Patienten ..... 33
2.2 Materialien ..... 34
2.2.1 Laborgeräte ..... 34
2.2.2 Verbrauchsmaterialien ..... 35
2.2.3 Chemikalien ..... 36
2.2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie ..... 37
2.2.5 Kits ..... 38
2.2.6 Stimulanzien ..... 38
2.2.7 Puffer und Kulturmedien ..... 38
2.2.8 Software ..... 38
2.3 Methoden ..... 39

2.3.1 Fragebögen ..... 39
2.3.2 Pricktest ..... 39
2.3.3 Immunglobulin-Messung ..... 39
2.3.4 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen ..... 40
2.3.5 Trypanblaufärbung ..... 41
2.3.6 Einfrieren von Zellen ..... 42
2.3.7 Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Lyse ... 42
2.3.8 Durchflusszytometrie ..... 43
2.3.9 Proliferationsassay ..... 46
2.3.10 *Enzyme-linked Immunospot* (ELISPOT) *Assay* ..... 47

3 ERGEBNISSE ..... 51
3.1 Fragebögen ..... 51
3.1.1 Klinischer Score A ..... 51
3.1.2 Medikamentenscore ..... 52
3.2 Pricktest ..... 52
3.3 Immunglobulin-Messung ..... 53
3.3.1 Birkenpollen-spezifisches Immunglobulin E ..... 53
3.3.2 Bet v 1-spezifisches Immunglobulin E ..... 54
3.3.3 Gesamt-Immunglobulin E ..... 55
3.3.4 Birkenpollen-spezifisches Immunglobulin G4 ..... 56
3.3.5 Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnis ..... 57
3.4 T-Zell-Analytik ..... 59
3.4.1 Durchflusszytometrie ..... 59
3.4.2 Proliferationsassay ..... 59
3.4.3 *Enzyme-linked Immunospot* (ELISPOT) *Assay* ..... 60
3.4.3.1 Interleukin 5-sezernierende Zellen ..... 60
3.4.3.2 Interleukin 10-sezernierende Zellen ..... 61
3.4.3.3 Interferon γ-sezernierende Zellen ..... 62
3.4.3.4 T-Helfer 2 / T-Helfer 1-Zell-Verhältnis ..... 63
3.4.3.5 T-Helfer 2 / Typ 1 regulatorische T-Zell-Verhältnis 64

4 DISKUSSION ..... 66
4.1 Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie ..... 66

4.2 Klinische Parameter ..... 69
4.3 Immunglobulin-Messung ..... 70
4.3.1 Immunglobulin E-Messung ..... 70
4.3.2 Immunglobulin G4-Messung ..... 71
4.4 $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ Treg ..... 72
4.5 Bet v1-spezifische T-Zell-Subsets ..... 74
4.5.1 T-Zell-Proliferation ..... 74
4.5.2 T-Helfer 2-Zellfrequenzen ..... 75
4.5.3 Typ 1 regulatorische T-Zellfrequenzen ..... 76
4.5.4 T-Helfer 1-Zellfrequenzen ..... 77

5 ZUSAMMENFASSUNG ..... 80
ABSTRACT ..... 82

6 TABELLENANHANG ..... 84

7 LITERATURVERZEICHNIS ..... 89

8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS ..... 122
8.1 Abbildungsverzeichnis ..... 122
8.2 Tabellenverzeichnis ..... 123

9 LEBENSLAUF .....

10 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....

11 DANKSAGUNG .....

12 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| ACK-Lyse | Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Lyse |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle (*antigen-presenting cell*) |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V. |
| B-Zelle | B-Lymphozyt |
| Bet v 1 | Hauptallergen der Birke |
| CD | *cluster of differentiation* (Unterscheidungsgruppen) |
| $CO_2$ | Kohlendioxid |
| CPDA | Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin |
| cpm | *counts per minute* (gezählte Impulse pro Minute) |
| DC | Dendritische Zelle (*dendritic cell*) |
| ELISPOT-Assay | *Enzyme-linked Immunospot Assay* (enzymgekoppelter Immunospottest) |
| FACS | *Fluorescence Activated Cell Sorting* (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) |
| FCS | *Fetal Calf Serum* (fetales Kälberserum) |
| FEIA | Fluoroenzymimmunoassay |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| Foxp3 | *forkhead box p3* |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen (*Human Leukocyte Antigen*) |
| IFN-γ | Interferon γ |

| | |
|---|---|
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| Kap. | Kapitel |
| M | molar |
| MHC | Haupthistokompatibilitäts-komplex (*Major Histocompatibility Complex*) |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| PAMP | Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*) |
| PBMC | Periphere mononukleäre Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*) |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*) |
| $PGE_2$ | Prostaglandin $E_2$ |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PRP | Pathogeneseassoziierte Proteine (*pathogenesis-related protein*) |
| PRR | Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) |
| RAST | Radioallergosorbent-Test (*radioallergosorbent test*) |
| rpm | Umdrehungszahl pro Minute (*rounds per minute*) |
| RPMI | Zellkulturmedium |
| s. / s.u. | siehe / siehe unten |
| SCIT | subcutane Immuntherapie |
| SIT | spezifische Immuntherapie |
| SLIT | sublinguale Immuntherapie |
| sog. | sogenannte |
| Tab. | Tabelle |
| TCR | T-Zell-Rezeptor (*T Cell Receptor*) |

| | |
|---|---|
| TGF | Transformierender Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*) |
| Th-Zelle | T-Helferzelle |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TLR | Toll-ähnlicher Rezeptor (*toll-like receptor*) |
| Tr1-Zelle | Typ 1 regulatorische T-Zelle |
| Treg | Regulatorische T-Zelle |
| | |
| Vgl. | vergleiche |
| | |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

In der Arbeit verwendete englischsprachige Begriffe sind *kursiv* dargestellt.

# 1 EINLEITUNG

Jeder Mensch wird täglich mit einer Vielzahl verschiedener Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten konfrontiert, ohne daraufhin schwere Infektionen zu entwickeln. Zur Verteidigung gegen solche Erreger besitzt der Körper eine differenzierte Immunabwehr. Ein funktionierendes Immunsystem ist ein komplexes System aus spezialisierten Zellen und ihren Botenstoffen. Zu den wichtigsten Bestandteilen gehören zelluläre Bausteine wie Phagozyten und Lymphozyten sowie eine humorale Komponente bestehend aus Antikörpern, Komplementsystem und Signalstoffen wie Entzündungsmediatoren, Interleukinen (IL) und Chemokinen.

Allergien ergeben sich durch überschießende Abwehrreaktionen des Immunsystems auf normalerweise harmlose Umweltstoffe (sog. Allergene). Klinisch zeigen sich diese Reaktionen als entzündliche Prozesse in den mit dem Allergen in Kontakt gekommenen Organsystemen. Zur Behandlung allergischer Reaktionen stehen therapeutisch eine Reihe verschiedener Medikamentenklassen zu Verfügung. Diese Therapiemöglichkeiten setzen allerdings ausschließlich symptomatisch an. Die spezifische Immuntherapie (SIT) oder Hyposensibilisierung ist dagegen momentan die einzige verfügbare kausale Therapie bei allergischen Soforttypreaktionen bzw. Typ-I-Allergien (s.u.). Dabei wird dem Patienten wiederholt eine kleine Menge des entsprechenden Allergens verabreicht, um auf diesem Wege eine Toleranz zu induzieren. Die zu applizierende Menge wird dabei so dosiert, dass der Patient durch die Therapie möglichst keine allergischen Symptome entwickelt. Die klinische Effektivität der SIT ist gut belegt. Die durch diese Therapie induzierten immunologischen Veränderungen und ihre pathophysiologische Relevanz sind dagegen immer noch Gegenstand laufender Untersuchungen. Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung zellulärer Mechanismen der Toleranzinduktion bei Patienten mit Birkenpollenallergie im Verlauf einer SIT mit hypoallergenen Proteinen, sog. Allergoiden. Dabei sollen die zellulären und humoralen Veränderungen vor dem Hintergrund des klinischen Verlaufs untersucht werden.

## 1.1 Allergie

Eine Allergie ist eine überschießende Immunreaktion des Organismus auf kleinste Mengen bestimmter körperfremder, nicht pathogener Stoffe. Die Allergene können dabei sowohl aus der Natur (z.B. Blütenpollen, Nahrungsmittel, Tierhaare oder Schimmelpilze) als auch aus synthetischen Produkten stammen (Arzneimittel, Kosmetika, Farben, Textilien o.ä.).
Allergische Reaktionen können nach Coombs und Gell in vier Klassen mit jeweils weiteren Subtypen unterteilt werden (vgl. Tab. 1, [Gell 1975]). Dabei stellt die in dieser Arbeit diskutierte Immunglobulin E (IgE)-vermittelte allergische Soforttypreaktion die Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I dar. Über 25% der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leidet unter einer Typ-I-Allergie, wobei ein deutlicher Prävalenzanstieg über die letzten Jahrzehnte hinweg verzeichnet werden konnte [Aberg 1995, Bousquet 2007, Diepgen 2000, Mothes 2004, Ring 2001]. Insbesondere der Anstieg dieser allergischen Erkrankungen bei Kinder und Jugendlichen [Asher 2006, Beasley 2000] sowie in Entwicklungsländern ist auffällig [Platts-Mills 2010, Van Ree 2007].

Tab. 1: Übersicht über die verschiedenen Allergietypen nach Coombs und Gell [Gell 1975].

| Allergietyp | Pathomechanismus | Krankheitsbilder |
|---|---|---|
| I | Soforttyp-Allergie<br>IgE-vermittelte Aktivierung und Degranulierung von Mastzellen mit Freisetzung von Mediatoren | Urtikaria, allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma |
| II | zytotoxische Reaktion<br>an Zelloberflächen körpereigener Zellen gebundene IgG- oder IgM-Antikörper mit Auslösung zytotoxischer Aktionen von NK-Zellen oder komplementvermittelter Lyse | Medikamenten-induzierte Thrombopenie, hämolytische Anämie |
| III | immunkomplexvermittelte Überempfindlichkeit<br>Immunkomplexbildung (meist IgG, selten IgM) gegen lösliche Antigene mit Komplement-aktivierung und folgender Entzündungs-reaktion | Purpura Schönlein-Hennoch, Lupus erythematodes, exogen-alveoläre Alveolitis |
| IV | Spättyp<br>Aktivierung antigenspezifischer T-Effektorzellen | Kontaktdermatitis, chronisches Asthma bronchiale |

Ig: Immunglobulin, NK-Zellen: natürliche Killerzellen

Die allergische Reaktion vom Typ I kann in eine Sensibilisierungs- und eine Effektorphase unterteilt werden: Die Sensibilisierungsphase ist geprägt durch

den ersten Allergenkontakt und die anschließende Aktivierung allergenspezifischer T-Helfer (Th)-Lymphozyten. In den Körper eintretende Allergene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APC) phagozytiert. Diese prozessieren die aufgenommenen Antigene und präsentieren die Allergenbruchstücke über MHC II (*major histocompatibility complex* Klasse II)-Oberflächenrezeptoren an naive CD (*cluster of differentiation)* $4^+$ T-Zellen (vgl. Abb. 1, [Renz 1995]). Zusätzlich verstärken co-stimulatorische Signale (B7 mit CD28, CD40-Ligand mit CD40) die Interaktion [Lenschow 1996, Spriggs 1992]. Die auf diese Weise stimulierten T-Zellen entwickeln sich in Kombination mit dem umgebenden Zytokinmilieu zu aktivierten Th-Zellen vom Typ 2.

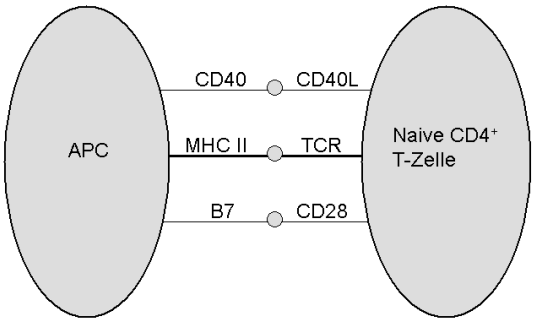


Abb. 1: Interaktion einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit einer naiven $CD4^+$ T-Zelle.
CD: *cluster of differentiation*, CD40L: CD40-Ligand, MHC II: *major histocompatibility complex* Klasse II, TCR: T-Zellrezeptor

Aktivierte Th2-Zellen sezernieren verschiedene Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 [Lee 2003, Randolph 1999, Renauld 1995, Yanagida 1995]. IL-4 und IL-13 werden benötigt für einen Immunglobulinklassen-*Switch* von IgG- hin zu IgE-produzierenden B-Zellen [Punnonen 1993, Punnonen 1997]. Für diesen Aktivierungsschritt ist eine feste Sequenz von Stimuli und Cofaktoren nötig. Hierbei kommt es zu einer Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR) der allergenspezifischen Th2-Zelle und dem MHC II-Oberflächenrezeptor einer B-Zelle, auf dem entsprechende Bruchstücke des Allergens durch die B-Zelle präsentiert werden. Durch diese Verbindung wird die B-Zelle empfänglich für die von der T-Zelle sezernierten Zytokine IL-4 und IL-13 [De Vries 1998]. Ein

weiteres Signal erfolgt wiederum durch direkten Zellkontakt: Der auf aktivierten T-Zellen exprimierte CD40-Ligand bindet an den CD40-Rezeptor der B-Zelle. Bei Vorhandensein aller dieser Signale in der richtigen Reihenfolge wird die B-Zelle in eine allergenspezifische IgE-sezernierende Plasmazelle umgewandelt [Gascan 1991, Koning 1996, Renz 1995]. Diesen Vorgang nennt man Sensibilisierung. Die spezifischen IgE-Antikörper können an IgE-Rezeptoren unterschiedlicher Affinität auf der Oberfläche von Effektorzellen der allergischen Immunreaktion binden oder frei im Blut zirkulieren. Letztere machen nur eine geringe Menge aus und weisen mit knapp drei Tagen eine sehr kurze Halbwertszeit auf [Atsushi 1977]. Effektorzellen wie Mastzellen, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten tragen einen hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI), der bei Stimulation die Lebensdauer dieser Zellen fördert. Der niedrigaffine IgE-Rezeptor (FcεRII) ist auf vielen verschiedenen aktivierten Zelltypen zu finden, z.B. B-Zellen, Eosinophilen, Monozyten und Makrophagen [Flores-Romo 1993, Fujiwara 1994, Riffo-Vasquez 2000]. Durch Bindung von IgE an diesen Rezeptor kommt es auf noch nicht vollständig geklärtem Wege zu einer Regulation der IgE-Synthese. Dabei wurde in verschiedenen Studien sowohl eine positive [Flores-Romo 1993, Fujiwara 1994] als auch eine negative Beeinflussung dieser Synthese beobachtet [Yu 1994]. Die Sensibilisierung ist die Voraussetzung für eine allergische Reaktion, zieht aber keine klinische Symptomatik nach sich.

Bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Allergen beginnt die Effektorphase der Allergie. Das aufgenommene Antigen kann direkt an die oberflächengebundenen IgE-Moleküle der verschiedenen Zellpopulationen binden. Dadurch werden die IgE-Antikörper auf der Zellmembran von Mastzellen und Basophilen vernetzt (*cross-linking*) [Marone 2000, Metcalfe 1997]. Diese Aktivierung führt zu einem Kalzium-Einstrom in die Zelle und vermittelt eine Exocytose von Granula mit bereits präformierten Entzündungsmediatoren [Metcalfe 1997]. Zu den wichtigsten Mediatoren gehören Histamin, Leukotriene, Kinine, Prostaglandine und Thromboxan $A_2$. Des Weiteren wird die Neusynthese weiterer Botenstoffe wie beispielsweise Tumornekrosefaktor (TNF) α, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 induziert [Gordon 1990, Metcalfe 1997]. Vermittelt durch die Chemokin- sowie Zytokinsekretion wandern inflammatorische Zellen (T-Zellen, basophile und

eosinophile Granulozyten) an den Ort der Allergenexposition. Ebenso wird die Neusynthese dieser Zellen induziert. Die Wirkung der erhöhten Konzentration inflammatorischer Zellen zeigt sich als „Spätphase“-Reaktion ca. sechs bis zwölf Stunden nach den ersten klinischen Symptomen [Macfarlane 2000, Minai-Fleminger 2009].

Körperfremde Stoffe treffen in fast allen Fällen zunächst auf Gewebe der Körperoberfläche. Dazu gehören neben der Haut auch die Schleimhäute des Respirations- und Gastrointestinaltrakts sowie des Auges. Um möglichst direkt auf Schadstoffe reagieren zu können, befindet sich in diesen Grenzgeweben eine sehr dichte Ansammlung von Immunzellen. Dort zeigt sich auch die Wirkung der im Rahmen der allergischen Effekphase freigesetzten Mediatoren in Form von Kontraktion glatter Muskulatur, erhöhter vaskulärer Permeabilität und Stimulation kutaner Nervenendigungen (Juckreiz). Eine allergische Sofort-Typ-Reaktion kann somit je nach Reaktionsort zu einer Vielzahl von klinischen Bildern führen. Zu den häufigsten Manifestationen gehören Rhinokonjunktivitis allergica, Asthma bronchiale und gastrointestinale Reaktionen wie Erbrechen oder Diarrhoe.

## 1.2 Birkenpollenallergie

Die Prävalenz für durch Pollen hervorgerufene allergische Erkrankungen zeigt in den letzten Jahrzehnten ansteigende Tendenzen. In einigen Gebieten Europas leiden mittlerweile bis zu 54% der Bevölkerung an einer Pollenallergie [D’Amato 1998]. Auffällig ist hierbei, dass in Nordeuropa die meisten Pollenallergien durch Birkenpollen hervorgerufen werden [D’Amato 1998, Eriksson 1996], während im übrigen Europa Gräserpollen die Hauptursache für polleninduzierte Soforttypreaktionen darstellen [D’Amato 1998]. Birkenpollen sind auch in Deutschland die bedeutendsten Allergene unter den Baumpollen. 19-25% der Pollenallergiker sind hierzulande gegenüber Birkenpollen sensibilisiert, wobei weiterhin eine ansteigende Tendenz anzunehmen ist [Altmeyer 2002].

Unter der Gattung der Birke (*betula*) werden ca. 48 verschiedene Arten zusammengefasst, von denen nur vier in Mitteleuropa vorkommen. Dabei

handelt es sich um die Hänge- (*verrucosa*), die Moor- (*pubescens*), die Strauch- (*humilis*) und die Zwergbirke (*nana*). Die Pollen der Birke enthalten das männliche Erbgut und werden durch den Wind zu den weiblichen Blüten getragen. Auf Grund dieses Vermehrungsweges werden die Birken zu den angiospermen, d.h. bedecktsamigen Pflanzen gezählt. Die durch den Wind weit verbreiteten Pollen (einschließlich ihrer allergenen Bestandteile), einhergehend mit der Häufigkeit dieser vier Birkenarten im städtischen Bereich auf Grund ihres genügsamen Wachstums, stellen somit eine wesentliche Voraussetzung für die hohe Sensibilisierungsrate dar.

In Deutschland liegt die Pollenflugzeit abhängig vom Wetter zwischen März und Ende Mai [D'Amato 1998, D`Amato 2001]. In dieser Zeit wird das hochpotente Allergen inhalativ aufgenommen und führt bei den Betroffenen zu den typischen Symptome einer Typ-I-Allergie (vgl. Kap. 1.1). Die Pollen werden nicht gleichmäßig über die Zeit abgegeben, sondern unterliegen Schwankungen durch pH-Wert, Temperatur, Luftdruck, Luffeuchtigkeit und Luftverschmutzungen [Behrendt 1997, Behrendt 2001, Peternel 2004]. Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass es durch leichten Regenfall zu einem Allergenanstieg und durch Temperaturabfall oder starken Niederschlag zu einem Abfall der Allergenbelastung kommt [Peternel 2004, Schappi 1997]. Optimale Bedingungen für einen starken Pollenflug sind an warmen und trockenen Tagen morgens und am späten Nachmittag gegeben [Knox 1979]. Des Weiteren unterliegt der Pollenflug jährlichen Schwankungen, wobei die Rhythmik noch nicht endgültig geklärt werden konnte. Einige Studien sprechen von einem zweijährigen Rhythmus [Atkinson 1990, Jäger 1991], da dem Baum die Energie fehle, jedes Jahr eine hohe Pollenproduktion zu erreichen. In anderen Studien wird von einem dreijährigen Rhythmus gesprochen [Detand 2000]. Neben dieser Rhythmik hemmen längere Frostperioden im Frühjahr das Blühverhalten der Birke. Neuere Studien zeigen, dass neben der produzierten Pollenmenge auch der Allergengehalt der Pollen Schwankungen unterliegt [Reid 2009]. Dadurch muss ein verminderter Pollenflug nicht automatisch mit verringerten klinischen Symptomen assoziiert sein, sondern vielmehr auch die Allergenkonzentration der Pollen in Bezug zu der allergischen Symptomatik gestellt werden. Insgesamt hat die Pollenproduktion in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen, wobei in

diesem Zusammenhang auch der Einfluss der Klimaerwärmung diskutiert wird [Frei 2000, Menzel 2000]. Diese Beobachtung wird als eine weitere Erklärung für die ansteigenden Prävalenzen von Pollenallergien herangezogen [D´Amato 1998, ISAAC 1998, Spieksma 2003].

Zudem reagieren Pflanzen bei umweltbedingtem Stress durch ansteigende Expression von *pathogenesis-related proteins* (PRPs). Zur ubiquitären Familie der PRPs gehört auch das Protein Bet v 1. Das aus 159 Aminosäuren bestehende Bet v 1 stellt das Hauptallergen (Majorallergen) der Birke dar [Bufe 1996]. Definitionsgemäß wird ein Allergen als Majorallergen bezeichnet, wenn mehr als 50% der Sensibilisierten hierauf ansprechen [King 1994]. Im Fall der Birke reagieren sogar über 98% der Birkenpollenallergiker auf Bet v 1 [Jarolim 1989, Menz 1996, Movérare 2002, Pauli 1996]. Neben diesem Hauptallergen finden sich weitere Minorallergene der Birke (Bet v 2 bis Bet v 8).

## 1.3 T-zelluläre Faktoren der Typ-I-Allergie

Noch immer sind die genauen immunologischen Abläufe der Pathophysiologie einer Soforttypallergie nicht endgültig verstanden und unterliegen weiterhin stetigen Ergänzungen und Überarbeitungen. Seit der Beschreibung der Typ-I-Allergie durch Coombs und Gell (vgl. Kap. 1.1) werden die zu Grunde liegenden Ursachen untersucht. Tada et al. publizierten 1978 erste Ergebnisse zu Th-Subpopulationen [Tada 1978]. Diese stellten Th1- und Th2-Zellen als zwei funktionell unterschiedliche Zellpopulationen, charakterisiert durch individuelle Zytokinmuster, dar (vgl. Kap. 1.4). Basierend auf den neuen Erkenntnissen zu Th1- und Th2- Zellen stellten Coffman und Mosmann die These auf, dass die Interaktion und das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen wichtig für das menschliche Immunsystem sei [Mosmann 1986]. Erst später wurden Zusammenhänge zwischen Th2-Zellen und allergischen Erkrankungen hergestellt [Romagnani 1991, Romagnani 1994]. Mitte der neunziger Jahre rückte eine weitere T-Zellsubpopulation, die regulatorischen T-Zellen (Treg), in den Mittelpunkt des Interesses (vgl. Kap. 1.5) [Sakaguchi 1995, Asano 1996, Takahashi 1998, Thornton 1998]. Treg waren bereits zwei Jahrzehnte zuvor im Rahmen der Immunmodulation beschrieben worden, jedoch konnte diese

Subpopulation ohne spezifische Marker nicht näher charakterisiert werden und das Interesse ging verloren [Gershon 1970, Kilshaw 1975]. Die Entdeckung des Transkriptionsfaktors Foxp3 [Brunkow 2001] ermöglichte schließlich weitergehendere Klassifizierungen. Darüber hinaus wurden weitere Treg-Klassen, wie z.B. Typ 1 regulatorische T-Zellen (Tr1) beobachtet [Groux 1997] und eine funktionelle Rolle in der Aufrechterhaltung einer immunologischer Balance zwischen Gesunden und Allergikern postuliert [Akdis 2005].

## 1.4 T-Helfer-1 / T-Helfer-2-Modell

T-Lymphozyten können anhand ihrer CD-Moleküle in zwei große Untergruppen eingeteilt werden. Zytotoxische T-Zellen tragen als gemeinsames Merkmal CD8 und Th-Zellen CD4 auf ihrer Oberfläche. Durch diese unterschiedlichen Oberflächenstrukturen ergeben sich auch voneinander abweichende Zellkontakte. Während zytotoxische T-Zellen Peptide erkennen, die mittels MHCI-Molekülen präsentiert werden, ist die Antigenpräsentation bei Th-Zellen MHCII-restringiert. MHCI-Moleküle sind auf fast allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden, MHCII-Moleküle hingegen nur auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen (DC), Monozyten und Makrophagen.
Kommen naive T-Zellen mit MHCII-präsentierten Antigenen und zusätzlichen co-stimulatorischen Signalen in Kontakt, wird ihre Proliferation und Differenzierung (*priming*) induziert. Hierbei können sich aus den naiven T-Zellen verschiedene Phänotypen von Th-Zellen entwickeln, die sich u.a. durch ihre charakteristische Zytokinproduktion voneinander unterscheiden lassen. Die beiden am Besten charakterisierten Subtypen sind Th1- und Th2-Zellen (vgl. Tab. 2). Jeder der beiden Subtypen kann durch Freisetzung von spezifischen Zytokinen die Entwicklung der naiven T-Zelle zum anderen Phänotyp hemmen [Abbas 1996, Janeway 2009] und somit den eigenen Phänotyp fördern. Dieser Prozess wurde zunächst 1986 bei Mäusezellen beschrieben [Mosmann 1986], konnte in der Folgezeit aber auch beim Menschen beobachtet werden [Del Prete 1998, Romagnani 1994].

Tab. 2: Charakteristische Zytokine für T-Helfer 1 (Th 1)- und Th2-Zellen.
[Janeway 2009, Randolph 1999, Romagnani 1991, Street 1991]

| Th1-Zytokine | Th2-Zytokine |
|---|---|
| IFN-γ | IL-4 |
| IL-2 | IL-5 |
| IL-12 | IL-6 |
| TNF-α | IL-10 |
| GM-CSF | IL-13 |

IFN: Interferon, IL: Interleukin, TNF: Tumornekrosefaktor, GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

Naive Th0-Zellen können sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine sezernieren [Estaquier 1997], da zu Beginn einer akuten Immunantwort die Maturation häufig noch nicht stattgefunden hat. Erst bei wiederholter Stimulation kommt es zur Ausreifung der verschiedenen Phänotypen, u.a. geprägt vom umgebenden Zytokinmilieu [Janeway 2009]. Viele weitere Faktoren nehmen darüber hinaus Einfluss darauf, zu welchem Phänotyp sich die naiven T-Zellen entwickeln. So führen die Beschaffenheit und Menge des präsentierten Antigens, co-stimulatorische Signale und die Zytokinproduktion der APC zu einer unterschiedlichen Differenzierung. Eingehend wurde der Einfluss von DC auf die T-Zellentwicklung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das bei der Reifung der DC umgebende Zytokinmilieu für den späteren Phänotyp ausschlaggebend ist (vgl. Abb. 2). Bei Vorliegen von z.B. Interferon γ (IFN-γ) oder Adenosintriphosphat (ATP) mit TNF-α wird die Entwicklung von Typ 1 Effektor DC (DC1) gefördert [Snijders 1998, Viera 2000], die eine starke IL-12-Produktion zeigen und damit eine Th1-Antwort induzieren [Snijders 1998]. Den gleichen Effekt weisen auch IL-12 und IL-18 auf. Umgekehrt fördern Prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$), β-Agonisten, IL-10 [De Smedt 1997, Kalinski 1998] und Glukokortikoide [Viera1998] die Ausbildung von IL-12-defizienten DC (DC2) [Viera 2000] und damit eine Th2-Antwort [Liu 2001]. IL-12 wird auf Grund dieses entscheidenden Einflusses auf die dichotome Th1/Th2-Zellentwicklung auch als das Schlüsselzytokin der Th1-Antwort bezeichnet [Hsieh 1993, Moser 2000, Snijders 1998].

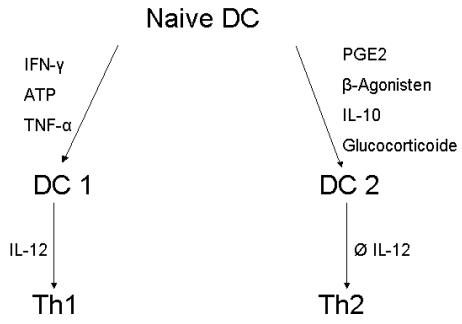


Abb. 2: Einfluss des Zytokinmilieus auf die Entwicklung dendritischer Zellen (DC).
Th: T-Helferzelle, IFN: Interferon, ATP: Adenosintriphosphat, TNF: Tumornekrosefaktor, IL: Interleukin, $PGE_2$: Prostaglandin $E_2$
[De Smedt 1997, Hsieh 1993, Kalinski 1998, Liu 2001, Moser 2000, Snijders 1998, Viera1998, Viera 2000]

Zusätzlich wurde von De Jong et al. beobachtet, dass intrazelluläre Pathogene eine DC1- und damit Th1-Entwicklung fördern, während extrazelluläre Pathogene eine DC2- und damit Th2-Ausbildung begünstigen [De Jong 2002]. Ebenso hat die vorliegende Allergenkonzentration einen Einfluss auf die Differenzierung von Th-Zellen. Hohe Antigenkonzentrationen fördern die Ausbildung von Th1-Zellen und geringe Konzentrationen die Differenzierung zu Th2-Zellen [Hsieh 1993, Seder 1992]. Das Verhältnis von APC zu T-Zellen kann ebenfalls Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung nehmen. Bei einem relativ hohen Verhältnis von DC zu T-Zellen (1:4) differenzieren die naiven Zellen zu gleichen Teilen zu Th1- und Th2-Zellen. Bei niedrigeren Verhältnissen (1:300) verschiebt sich das Gleichgewicht zu Seiten der Th2-Zellen [Tanaka 2000]. Ferner wurden Oberflächenmarker gefunden, die unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung der naiven T-Zellen nehmen. Auf der Zelloberfläche von APC liegende CD80-Moleküle (B7-1) können eine Th1-Zellantwort fördern, während das von Monozyten und DC präsentierte CD86-Molekül (B7-2) die Ausbildung von Th2-Zellen begünstigt [Kuchroo 1995, Ranger 1996].
Weitere bedeutsame Moleküle für die Ausbildung einer Th1- oder Th2-Antwort sind die sogenannten PAMPs.

Tab. 3: *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) als Einflussfaktoren auf die Entwicklung dendritischer Zellen. Typ 1-PAMPs fördern hierbei über IL-12 die Ausbildung von Th1-Zellen, wohingegen Typ 2-PAMPs die Th2-Zellentwicklung induzieren.
[Cella 1999, De Jong 2002, Gagliardi 2000, Hartmann 1999, Pearce 1991, Traidl-Hoffmann 2005, Whelan 2000]

| Typ 1-PAMPs | Typ 2-PAMPs |
|---|---|
| LPS | Parasitenbestandteile:<br>Eierextrakte<br>von Schistosoma mansoni<br>Nematodenbestandteile |
| CpG Nucleotide + GM-CSF | Choleratoxin |
| Bordetella pertussis-Toxin | Einige Allergene<br>z.B. Birkenpollenextrakte |
| Doppelstrang-RNA | |

LPS: Lipopolisaccharid, CpG Nucleotide: Cytosin und Guanin Nucleotidpaare, GM-CSF: *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

*Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) sind von unterschiedlichen Pathogenen ausgehende Faktoren, die mit DCs interagieren. PAMPs lassen sich in Typ 1-PAMPs und Typ 2-PAMPs unterscheiden, je nachdem, ob sie IL-12 induzieren [Kapsenberg 2003, Snijders 1998].

Zusätzliche Einflüsse auf die Th1/Th2-Zellentwicklung ergeben sich durch weitere Interaktionsmöglichkeiten von T-Zellen mit DCs. Die Bindung des CD40-Liganden auf aktivierten T-Zellen an CD40 auf DC führt zu einer vermehrten IL-12-Ausschüttung. Zudem steigt die Sekretion der Chemokine CXCL8 (CXC-Chemokin-Ligand) und CCL3 (*Chemokine Ligand 3*) an [Caux 1994, Cella 1996, Sallusto 1995], wodurch Th1-Zellen chemotaktisch angelockt werden [Mantovani 2004].

Die Immunantwort der Th1-Zellen ist charakterisiert durch zellvermittelte Reaktionen. Es kommt zu einer Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen mittels IFN-γ und TNF-α. Dadurch können intrazelluläre Pathogene und Mikroorganismen effektiv zerstört werden [Janeway 2009]. Die IgG-Bildung durch B-Zellen wird angeregt, wobei es zu einer Hemmung der IgE-Produktion kommt [Mosmann 1986, Randolph 1999]. Beispielhaft für diesen Reaktionsweg sind die Typ-IV-Allergien [Gell 1975], aber auch einige Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen.

Für die Th2-Reaktion typisch ist die Aktivierung von B-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen. Die B-Zellaktivierung bedingt einen Ig-Klassenwechsel von IgG1 zu IgE. Durch die Mastzellaktivierung werden vermehrt Histamin, Leukotriene und Prostaglandine freigesetzt. Die Mediatorfreisetzung und die vermehrte IgE-Produktion führen zu einer Abwehr extrazellulärer Pathogene, insbesondere von Parasiten [Randolph 1999]. Die Th2-Reaktion ist allerdings auch entscheidend für die Entwicklung allergischer Soforttyperkrankungen [Wong 2001].

Wichtig für ein gesundes Immunsystem ist ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Th1- und Th2-Zellen. Bei allergischen Erkrankungen kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Th2-Zellen. Dies wurde u.a. anhand von T-Zellen nachgewiesen, die aus Biopsien und Bronchiallavage-flüssigkeit von Asthmapatienten gewonnen wurden [Del Prete 1993]. Das Th1/Th2-Paradigma geht davon aus, dass Th1-Zellen die direkten Gegenspieler der Th2-Zellen sind und damit einen protektiven Effekt gegenüber allergischen Erkrankungen aufweisen. Damit könnte bei einer frühzeitigen Differenzierung der Immunreaktion in Richtung Th1-Zellen eine allergische Reaktion inhibiert werden. Epidemiologische Studien mit Patienten, die an Th1-mediierten Autoimmunerkrankungen leiden, zeigten, dass Patienten mit Typ 1-Diabetes [Huang 1999], Rheumatoider Arthritis [Allanore 1998] oder Multipler Sklerose [Oro 1996] ein deutlich reduziertes Risiko für Erkrankungen des atopischen Formenkreises haben. Ebenso weisen Studien darauf hin, dass Kinder mit einer früh in der Entwicklungsphase aufgetretenen allergischen Erkrankung ein geringeres Risiko tragen, später an Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken [Douek 1999]. Vornehmlich im Mausmodell gibt es Hinweise auf eine klinisch relevante Th-Zell-Dichotomie [Herz 1998]. Das Th1/Th2-Modell ist allerdings nicht unumstritten. Es liegen auch dem Modell widersprüchliche Ergebnisse vor, z.B. dass eine hohe Expression von Th1-typischen Zytokinen eine Verstärkung der allergischen Entzündung in der Lunge mit sich führen kann [Randolph 1999]. Darüber hinaus konnte auch im Mausmodell keine Hemmung der Th2-induzierten bronchialen Hyperreagibilität und pulmonalen Entzündung durch den Transfer von Th1-Zellen induziert werden [Hansen 1999].

Bei der SIT sollte es nach dem Th1/Th2-Modell zu einer Stärkung der Th1-Antwort und zu einer Hemmung der gesteigerten Th2-Aktivität kommen.

Bisherige Studien ergeben zwar recht einheitlich eine Abnahme der Th2-Zellzytokine, jedoch widersprüchliche Angaben in Bezug auf die Th1-Zellzytokine. Es konnte sowohl eine Zunahme [Akoum 1996, Bellinghausen 1997, Jutel 1995] als auch eine Abnahme [Akdis 1996, Muller 1998, Segura 1998] der Th1-Zytokine gemessen werden. Momentan ist Stand der Forschung, dass das Th1/Th2-Modell nicht ausreichend zur Erklärung der immunologischen Zusammenhänge geeignet ist bzw. dass diese Zusammenhänge sehr viel komplexer sind, als in bisherigen Studien angenommen wurde.

## 1.5 Regulatorische T-Zellen

$CD4^+CD25^+$-T-Zellen stellen eine weitere Untergruppe der $CD4^+$-positiven T-Zellen dar [Sakaguchi 1995, Steinbrink 2002]. Die Arbeitsgruppe um Sakaguchi prägte den Namen für diese „regulatorisch“ wirksame Zellpopulation [Sakaguchi 1999]. Die immunregulatorische Funktion dieses speziellen Zelltyps zeigte sich in Untersuchungen zur Kontrolle von Autoimmunität und Selbsttoleranz [Asano 1996, Lechler 2001, Taylor 2001], welche über eine Hemmung von autoreaktiven T-Zellen vermittelt wird [Stephens 2001].

Die Charakterisierung der Treg über die konstitutive Expression des IL-2-Rezeptors CD25 wurde kurze Zeit später als nicht ausreichend erachtet, da auch nicht-regulatorische T-Zellen CD25 transient exprimieren können [Kuziel 1990]. Ein typisches Merkmal dieser Treg ist die Expression des intrazellulären Transkriptionsfaktors „*forkhead box P3*“ (Foxp3) [Fontenot 2003, Hori 2003, Khattri 2003], der allerdings auch durch andere T-Zellen vorübergehend exprimiert werden kann [Wang 2007]. Insgesamt weisen ca. 5 bis 10% aller $CD4^+$-Zellen Foxp3 auf [Hori 2003, Khattri 2003, Sakaguchi 1995].

In der Folge wurde eine ganze Reihe unterschiedlicher Treg gefunden und beschrieben [Akdis 1999, Apostolou 2004; Chen 1994, Cobbold 2004, Cortesini 2001, Hu 2004, Sakaguchi 1995, Seo 1999, Zhang 2000]. Auf Grund der anhaltenden intensiven Forschung hinsichtlich Phänotyp und ihrer genauen Funktion ist die Klassifikation immer noch im Wandel. Heutzutage werden die $Foxp3^+$ Treg in zwei Untergruppen unterteilt. Die natürlichen (n)Treg und die induzierten Treg [Sakaguchi 2008]. Dabei entstehen die natürlichen Treg im

Thymus, wobei zwei Differenzierungsschritte für die Zellentwicklung notwendig sind. Im ersten Schritt wird jede Vorläuferzelle im Kortex des Thymus mit dem MHC-Komplex der Epithelzellen konfrontiert. Nur wenn der T-Zellrezeptor (TCR) diesen Komplex erkennt, überlebt die Zelle (positive Selektion), während die anderen Zellen durch Apoptose eliminiert werden. Im zweiten Schritt findet eine negative Selektion statt, bei der $CD25^+$-Zellen Kontakt zu medullären DC aufnehmen. Diese DC präsentieren über MHCII ein Selbstantigen an die T-Zelle. Bei Erkennung des Selbstantigens mit hoher Affinität erhält die T-Zelle ein Apoptosesignal, um spätere Autoimmunreaktionen zu verhindern. Bei mittlerer Affinität im Kontakt mit dem TCR entwickeln sich die Vorläuferzellen zu Th0-Zellen und werden in der Peripherie weiter differenziert. Der Anteil der T-Zellen, der eine hohe Affinität für Selbstpeptide zeigt, aber der negativen Selektion gerade noch entgeht, entwickelt sich zu nTreg weiter und wird in die Peripherie entlassen [Sakaguchi 2003].

T-Zellen kommen demnach entweder als Th0 oder bereits als Treg aus dem Thymus in die Peripherie. Aus den naiven T-Zellen entwickeln sich dann erst nach Antigenkontakt Th1- oder Th2-Zellen. Bei Vorliegen bestimmter Bedingungen können sich jedoch auch in der Peripherie noch Treg aus Th0-Zellen entwickeln. Dabei können folgende Formen von induzierten Treg entstehen: $Foxp3^-$ Treg (Tr1- oder Th3-Zellen) oder $Foxp3^+$ Treg [Wing 2006].

Im murinen Modell konnte gezeigt werden, dass sich bei niedrigen Antigenkonzentrationen in der Peripherie aus $CD4^+CD25^-$-Zellen $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-Zellen entwickeln können [Apostolou 2004]. Dabei scheint das vorliegende Zytokinmilieu eine wichtige Rolle zu spielen. Besonders TGF-β [Weiner 2001] und IL-10 [Liu 1998] werden dabei als begünstigende Faktoren diskutiert. Eine Induktion der Foxp3-Expression mittels TGF-β konnte durch Chen et al. belegt werden [Chen 2003]. Es wurde gezeigt, dass eine gestörte TGF-β-Signaltransduktion zu einer Abnahme der peripheren $CD4^+CD25^+$-Zellpopulation führt und es zu einer Verringerung der Foxp3-Expression dieser Zellen kommt [Schramm 2004]. Das vermehrte Vorliegen von TGF-β korreliert dagegen mit einer sowohl peripher als auch im Thymus erhöhten Anzahl von $CD4^+CD25^+$-Zellen [Schramm 2004].

Bei den Tr1-Zellen handelt es sich im Unterschied zu den nTreg um antigenspezifische Treg, die eine hohe IL-10-Produktion aufweisen, aber kein

IL-2 und IL-4 bilden [Aleksza 2002, Groux 1997, Levings 2000]. In-vitro wird ihre Bildung aus T-Zellen durch Zugabe von IL-10 [Groux 1997] oder Vitamin D3 und Dexamethason gefördert [Barrat 2002]. Ebenso kann auch eine Antigenpräsentation von unreifen DC zur Bildung von Tr1-Zellen führen [Martin 2003]. Aktuell wird angenommen, dass Tr1-Zellen aus antigenspezifischen anergen T-Zellen gebildet werden können, wofür die wiederholte Exposition gegenüber dem spezifischen Antigen notwendig ist [Jonuleit 2000]. Dieses wurde bestätigt durch die Beobachtung, dass beim Menschen in der Frühphase der SIT ein Anstieg von Tr1-Zellen erfolgt [Jutel 2003, Möbs 2010]. Ihre Funktion ergibt sich aus dem von ihnen produzierten IL-10, mit dem sie eine Suppression allergenspezifischer Th1- und Th2-Antworten herbei führen können [Groux 1997, Janeway 2009, Taylor 2006].

Der dritte Typ induzierbarer Treg, die Th3-Zellen, zeichnet sich durch eine hohe TGF-β-Produktion bei geringer IL-4- und IL-10-Produktion aus [Chehade 2005, Chen 1994]. Th3-Zellen zeigen ihre Zytokinproduktion vor allem in Reaktion auf oral aufgenommene Antigene und können dadurch einen Antikörperklassenwechsel zu IgA bewirken [Weiner 2001].

Studien legen den Verdacht nahe, dass spezifische Toleranzinduktion ein Th3- bzw. Tr1-abhängiger Prozess sein könnte [Akdis 2005, Jutel 2003]. Vergleiche von Allergikern mit Gesunden zeigen, dass es keine Unterschiede in der Antigenerkennung durch T-Zellen gibt [Ebner 1995]. Bei beiden Personengruppen scheinen zudem alle drei Typen von Treg ($Foxp3^+$ Treg, Th3- und Tr1-Zellen) vorzuliegen. Es wurde postuliert, dass Allergiker gegenüber Gesunden nicht nur eine erhöhte Anzahl allergenspezifischer Th2-Zellen aufweisen, sondern auch eine geringere Zahl an Tr1-Zellen [Akdis 2004], allerdings gibt es auch Hinweise, dass sich Gesunde und Allergiker nicht im Vorkommen der Tr1-Zellen unterscheiden [Möbs 2010].

Untersuchungen zu Treg zeigen, dass z.B. bei Asthma $Foxp3^+$ Treg die Lunge infiltrieren und die Entzündung hemmen [Hadeiba 2003]. Auch konnte durch Tr1-ähnliche Zellen ein Rückgang der Eosinophilie und der Atemwegshyperreagibilität erreicht werden [Oh 2002]. Ebenso wirkte sich die TGF-β-Überexpression in $CD4^+$-Zellen positiv auf Eosinophilie und Atemwegshyperreagibilität aus [Hansen 2000]. Insgesamt verdeutlichen diese Daten, dass verschiedene Typen regulatorischer T-Zellen Einfluss auf

allergische Erkrankungen ausüben können [Palomares 2010]. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Untersuchung von $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-Zellen und IL-10 sezernierende Tr1-Zellen gelegt.

## 1.6 Zytokine

Zytokine sind Proteine oder Glykoproteine, die als Mediatoren von verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen, Fibroblasten und Epithelzellen produziert werden [Andus 1991]. Dabei werden viele Zytokine von mehr als einem Zelltyp synthetisiert und zeigen zudem eine große Anzahl verschiedener Effekte [Andus 1991]. Zytokine fungieren als Vermittler immuno-endokriner Wechselbeziehungen [Imura 1991] und werden dafür meist nur vorübergehend produziert. Reguliert wird die Produktion und Ausschüttung durch zahlreiche Faktoren, so auch durch Zytokine. Der Wirkungsbereich der Zytokine liegt meist in der unmittelbaren Umgebung ihres Sekretionsortes und wird über spezifische membranständige Rezeptoren vermittelt. Wichtiges Kennzeichen im Vergleich zu Hormonen ist der starke Überlappungsbereich des Wirkspektrums unterschiedlicher Zytokine [Balkwill 1989], so zeigen z.B. IL-1 und TNF-α trotz starker struktureller Unterschiede ähnliche Regulierungseffekte [Le 1987]. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit als Marker unterschiedlicher T-Zellpopulationen untersuchten Zytokine genauer eingegangen.

### 1.6.1 Interleukin 5

IL-5 ist ein typisches Th2-Zytokin, wird aber auch von Eosinophilen und Mastzellen produziert. Die wichtigsten Funktionen bestehen in der Stimulation des Wachstums, der Wanderung und der Differenzierung von Eosinophilen [Clutterbuck 1989, Kopf 1996, Palframan 1998], der Aktivierung von Eosinophilen zur Parasitenabwehr [Yoshida 1996] und als Kostimulator für die Differenzierung von B-Zellen [Abbas 1996, Kramer 1999]. IL-5 agiert damit als Verbindung zwischen T-Zellaktivierung und der Ausbildung einer eosinophilen

Entzündung [Abbas 1996, Janeway 2009]. Über Maskierung bestimmter Oberflächenrezeptoren mittels IL-5 zeigt sich zudem im Gewebe des Atemtraktes eine Apoptoseverzögerung [Welte 2001]. Gesteigerte Eosinophilie wird in den Industrieländern am häufigsten im Rahmen einer atopischen Genese beobachtet. Im Rahmen dieser Erkrankungen spielt IL-5 als Zytokin der Th2-Antwort eine zentrale Rolle. So wurde beispielsweise in Studien zum Asthma bronchiale ein signifikant erhöhter IL-5-Spiegel während der Exazerbationen vorgefunden [Ikeda 1997, Motojima 1993].

### 1.6.2 Interleukin 10

Fiorentino beschrieb 1989 zum ersten Mal einen Zytokinsynthese-inhibierenden Faktor (CSIF), der später IL-10 genannt wurde [Fiorentino 1989]. Produzenten dieses Interleukins sind Treg [O´Garra 2004], Th2-Zellen [Barnes 2000, Fiorentino 1989], Th1-Zellen [Barnes 2000, Sornasse 1996], B-Zellen, Monozyten [De Waal 1991, John 1998, Wanidworanun 1993], aktivierte Makrophagen [Barnes 2000, John 1998], Mastzellen [Barnes 2000] und $CD8^+$-Zellen [Dafrarian 1996, Varney 1999].

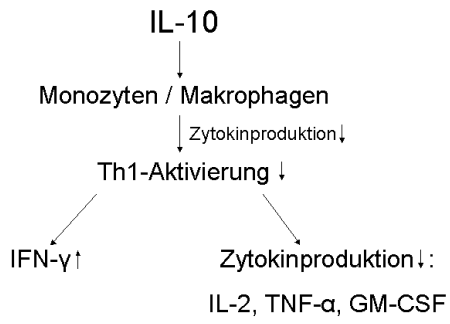


Abb. 3: Interleukin (IL) 10-Wirkung auf Monozyten und Makrophagen.
Th1: Typ 1 T-Helferzelle, IFN: Interferon, TNF: Tumornekrosefaktor, GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
[Abbas 1996, Barnes 2000, De Waal 1991, Fiorentino 1989, Hart 1995, Lauw 2000, Olikowsky 1997, Zissel 1996]

Eine Wirkung von IL-10 besteht in der Hemmung der Zytokinproduktion von Makrophagen und Monozyten (vgl. Abb. 3) [Barnes 2000, De Waal 1991, Hart 1995, Lauw 2000, Olikowsky 1997, Zissel 1996]. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Th1-Zellaktivierung, wodurch die Th1-Zell-abhängige Produktion von Zytokinen wie IL-2, TNF-α und GM-CSF supprimiert wird [Abbas

1996, Fiorentino 1989]. Ausschließlich auf die IFN-γ-Produktion zeigt sich ein positiver Effekt [Lauw 2000].

Des Weiteren wird die Expression von MHCII-Molekülen und anderen Oberflächenmarkern auf APC unter IL-10-Einfluss herabreguliert (vgl. Abb. 4). Eine Reduktion von diesen Strukturen hat eine verminderte Antigenpräsentation zur Folge und zieht damit eine abgeschwächte T-Zellaktivierung nach sich [Allavena 1998, Pretolani 1997]. Darüber hinaus sinkt die IL-12-Produktion von APC und die T-Zellentwicklung wird in Richtung der Th2-Zellen verschoben.

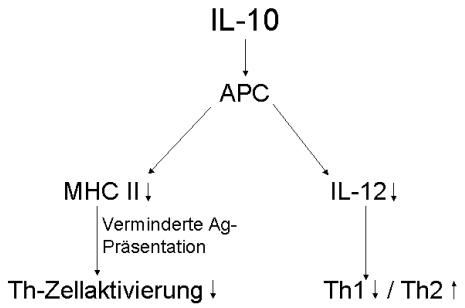


Abb. 4: Interleukin (IL) 10-Wirkung auf antigenpräsentierende Zellen (APC).
MHC: *major histocompatibility complex* , Th: T-Helferzelle
[Allavena 1998, Pretolani 1997]

IL-10 zeigt darüber hinaus, zusätzlich zu vielen Suppressionsmechanismen, auch eine Stimulation von aktivierten B-Zellen. Dies erfolgt vermutlich über eine Verhinderung des IL-4-mediierten Klassenwechsels zu IgE [Rousset 1992] und einer gesteigerten Antikörperproduktion von IgG4 [Moore 2001]. Punnonen konnte in diesem Zusammenhang in humanen Zellen eine Blockade der IgE-Produktion durch IL-10-Gabe zeigen [Punnonen 1993]. Im Mausmodell konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Abwesenheit von IL-10 zu einer erhöhten Rate an Erkrankungen durch Protozoen führt und es dabei zu erhöhten Spiegeln von IL-12, IFN-γ und TNF-α kommt [Gazzinelli 1996]. Ebenfalls zeigen Arbeiten an IL-10-k*nock-out*-Mäusen ein gehäuftes Vorkommen von chronischen Darmentzündungen [Kühn 1993]. Bei Patienten mit malignen Erkrankungen konnten erhöhte IL-10-Spiegel gefunden werden, wodurch sich möglicherweise eine Inhibition des Immunsystems und dadurch ein gesteigertes Tumorwachstum ergibt [Mocellin 2004, Zhou 2005]. Ebenso

zeigen Patienten mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises eine erhöhte IL-10-Produktion [Long 2004, Matsumoto 2004]. Eine Verringerung von Entzündung und Hyperreagibilität der Atemwege durch IL-10 spricht für eine immunsuppressive protektive Wirkung [Quinn 2000]. Andererseits scheint IL-10 auch notwendig zu sein, um eine Überempfindlichkeit überhaupt erst zu entwickeln [Makela 2000].

### 1.6.3 Interferon γ

IFN-γ wird von $CD4^+$-Th1-Zellen, Th0-Zellen, $CD8^+$-T-Zellen und NK-Zellen produziert [Billiau 1996, Sad 1995]. Es bewirkt eine Förderung der B- und T-Zelldifferenzierung, wobei Th0-Zellen unter IFN-γ-Einfluss zu Th1-Zellen differenzieren [Abbas 1996, Trinchieri 1995]. Um diesen Effekt zu verstärken, kommt es gleichzeitig zu einer Suppression des Th2-Wachstums und konsekutiv zu einer Reduktion der Th2-Zytokine [Coyle 1996]. Murine B-Zellen werden zur Produktion der Antikörperunterklassen IgG2a und IgG3 angeregt, während der Isotypen-Klassenwechsel von IgG1 zu IgE gehemmt wird [Abbas 1996, Coffman 1986]. Die Expression von MHCI- und MHCII-Molekülen wird durch IFN-γ gefördert [Giacomini 1988], was sowohl zu einer Kräftigung der humoralen als auch der zellulären Immunreaktion führt. Ein weiterer Effekt von IFN-γ liegt in der Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen und NK-Zellen [Borish 2003]. Durch Stärkung dieser drei Zellpopulationen kommt es zu einer verbesserten Abwehr intrazellulärer Erreger. Darüber hinaus wird aber auch die Abwehr gegenüber Tumorzellen gestärkt [Billiau 1996]. Zeitgleich wird die Hemmung von Makrophagen über TGF-β reduziert, da IFN-γ die Anzahl der TGF-β-Rezeptoren auf der Makrophagen-Zelloberfläche verringert [Wahn 2005]. Verstärkt wird der Effekt von IFN-γ durch den Einfluss von IL-2 und IL-12 [Trinchieri 1995]. Gefördert wird hierbei die Wirkung von IL-2 durch die verstärkte IL-2-Rezeptor-Expression unter IFN-γ-Einfluss. Ebenso wird eine gesteigerte IL-10-Produktion als wichtiger Baustein der IFN-γ-Wirkung angesehen [Coyle 1996]. Da IFN-γ auf Basis der Th1/Th2-Hypothese den Gegenspieler zur Th2-vermittelten allergischen Reaktion darstellt, rückte IFN-γ zunehmend in den Blickpunkt der Forschung. Tierexperimentell konnte bereits

eine inhibierende Wirkung auf die eosinophile Entzündung gefunden werden. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Allergiker niedrigere IFN-γ-Konzentrationen im Blut aufweisen [Jung 1999] und niedrige neonatale IFN-γ-Spiegel mit einer erhöhten Atopierate korrelieren [Tang 1994]. Darüber hinaus zeigen Allergiker eine reduzierte IFN-γ-Rezeptorexpression auf DC [Gros 2011].

## 1.7 Allergiediagnostik

Die Diagnosestellung allergischer Erkrankungen ergibt sich durch eine Kombination aus Anamnese sowie klinischen und laborchemischen Untersuchungen. Die Basis wird dabei durch eine ausführliche allergologische Anamnese gebildet, mit besonderem Augenmerk auf Zeitpunkt, Dauer, Frequenz und Schwere der allergischen Symptomatik. Darüber hinaus sollten Medikamenteneinnahmen und Exposition gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren oder Noxen, wie z.B. Tabakrauch [Høst 2003], geklärt werden. Als hilfreich erweist sich die Verwendung standardisierter Fragebögen [Bousquet 2001]. Nach der Anamnese schließt sich eine umfassende körperliche Untersuchung an. Dabei können Untersuchungen der inneren und äußeren Nase, der Augen und der betroffenen Hautregionen den Verdacht einer allergischen Erkrankung erhärten, aber auch ausschließen. Zur weiteren Diagnostik bieten sich Hauttests an, da sie bei geringem Arbeitsaufwand eine gute Sensitivität und Spezifität bieten [Anhoej 2001]. In der Praxis hat der Pricktest die größte Bedeutung [Schaub 2010]. Zu beachten ist, dass durch die Reaktion lediglich eine Sensibilisierung für das jeweilige Allergen angezeigt wird, eine klinische Symptomatik jedoch nicht vorliegen muss [Bergmann 1992]. Ähnlich wie der Pricktest können auch mittels Intracutantest oder Scratchtest allergische Reaktionen der Haut hervorgerufen werden [Moll 2005]. Ergänzend zu den Hauttests können Provokationstests in der Diagnostik eingesetzt werden. Hierbei werden allergische Reaktionen direkt organbezogen ausgelöst, z.B. nasale oder bronchiale Provokation bei Pollenallergien oder orale Provokation bei Nahrungsmittelallergien. Zusätzlich werden klinische Parameter

erhoben, wobei sowohl lokale Symptome als auch Fernsymptome berücksichtigt werden [Bergmann 1994, Malm 2000].

Laborchemisch können die bei allergischen Erkrankungen erhöhte Serum-IgE-Spiegel des Patienten beurteilt werden. Dafür werden sowohl die Gesamt-IgE-Konzentration als auch der allergenspezifische IgE-Gehalt bestimmt. Die Gesamt-IgE-Konzentration kann hierbei nur eingeschränkt verwendet werden, da auch bei parasitären Infektionen, Rauchern und anderen Erkrankungen Anstiege zu verzeichnen sind. Besser geeignet ist demnach die Bestimmung des allergenspezifischen IgE [Høst 2003].

### 1.7.1 Allergenspezifisches Immunglobulin E

IgE-Konzentrationen können mittels *radioallergosorbent test* (RAST) bestimmt werden. Genauere Angaben, gerade in den unteren Messbereichen, lassen sich jedoch mittels des weiterentwickelten CAP-System erzielen (vgl. Kap. 2.3.3) [Jeep 1992, Schaub 2010]. Anhand der Konzentrationen können verschiedene sogenannte CAP-Klassen eingeteilt werden (vgl. Tab. 4) [Schaub 2010]. Bei Werten < 0,35kU/l wird von einem negativen Ergebnis gesprochen.

Tab. 4: *Radioallergosorbent test* (RAST)-Klassen

| CAP-Klasse | IgE (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 |

Ig: Immunglobulin

### 1.7.2 Allergenspezifisches Immunglobulin G4

Die Immunglobuline vom Isotyp G werden in vier Subklassen, IgG1 bis IgG4, unterteilt, von denen IgG4 den geringsten Anteil ausmacht. Die Produktion von IgG4 wird angeregt durch eine länger andauernde Exposition gegenüber einem spezifischen Antigen. Diese wird von einem IL-4- und IL-13-dominierten

Zytokinmilieu gefördert [Punnonen 1993, Vercelli 1998]. IgG4 wird von aktivierten B-Zellen bei Parasitosen [Aalberse 1983] und unter SIT [Nakagawa 1983] produziert. Dabei scheint dieser Antikörperklasse eine antiinflammatorische Funktion zuzukommen [Van der Neut Kolfschoten 2007]. Da die IgG4-Synthese physiologisch auch bei fortwährendem hochkonzentrierten Allergenkontakt auftritt, bezeichnet Platts-Mills et al. dies auch als physiologische Toleranzentwicklung [Platts-Mills 2001]. Beschrieben wurde diese Reaktion an Hand des Beispiels von Imkern, welche gehäuft in ihrem Berufsleben von Bienen gestochen wurden und daraufhin erhöhte Spiegel von Bienengiftspezifischem IgG4 aufwiesen [Aalberse 1983]. IgG4 wird außerdem eine protektive Rolle gegen IgE-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen zugesprochen [Hussain 1992]. Die dahinter stehende Hypothese „blockierender Antikörper“ besagt, dass IgG4 mit IgE-Molekülen um die Antigenbindung konkurriert [Cooke 1935, Rihet 1992]. Da IgG4 jedoch im Gegensatz zu IgE nur mit schwacher Affinität an Fc-Rezeptoren bindet und auch keine Komplementfaktoren fixiert, bewirkt es keine klinischen Reaktionen [Agresti 1999]. Durch die Bindung von Allergenen an IgG4 kommt es zu einer verringerten Fixation von IgE-Allergen-Komplexen [Wachholz 2003] mit verminderter Präsentation eines Allergens und sukzessiver Aktivierung von $CD4^+$-T-Zellen [Van Neerven 2004]. Somit könnte IgG4 eine wichtige regulierende Rolle bei IgE-vermittelten Immunantworten zukommen.

Treg, insbesondere Tr1-Zellen, können durch IL-10-Sekretion einen Anstieg der IgG4-Produktion fördern [Akdis 1998]. Studien geben den Hinweis, dass ein ansteigendes IL-4/IFN-γ-Verhältnis eine Steigerung des IgE-Spiegels nach sich zieht, wobei ein fallender IL-4/IFN-γ-Quotient die IgG4-Produktion fördert [Carballido 1994]. Die Spiegel von allergenspezifischem IgG, besonders der des IgG4-Subtyps, steigen unter SIT zumeist bereits nach kurzer Therapiezeit an und bleiben unter SIT auch auf diesen erhöhten Werten [Djurup 1985, Tseng 2008, Scadding 2010, Urbanek 1986]. Dies führte zu der These, dass die IgG- bzw. IgG4-Konzentration als ein prädiktiver Wert für die Wirksamkeit der SIT genutzt werden könnte [Bousquet 1998, Golden 1982, Wachholz 2004].

## 1.8 Allergiebehandlung

Bei der Therapie allergischer Erkrankungen gibt es die drei mögliche Ansätze

- Allergenkarenz,
- symptomatische medikamentöse Therapie und
- SIT.

Allergenkarenz stellt die wirksamste Therapieoption dar, lässt sich aber für viele Allergene im Alltag nicht verwirklichen. Voraussetzung für eine konsequent durchgeführte Karenz sind die genaue Kenntnis der klinisch relevanten Sensibilisierungen und die Möglichkeit die Allergene auch umgehen zu können. In diesem Fall müssen die Handlungsempfehlungen für den Patienten angemessen und auch im Alltag praktikabel sein [Klimek 1997].

Im Bereich der antiallergischen Therapeutika gibt es eine ganze Reihe verschiedener symptomatisch wirkender Medikamente. Dazu gehören Antihistaminika, Steroide, Sympathomimetika, Parasympatholytika, Leukotrienrezeptorantagonisten und Cromone. Die medikamentöse Basistherapie der unterschiedlichen atopischen Erkrankungen ist verschieden, aber die eingesetzten Medikamentengruppen sind häufig identisch. Inhalative $\beta_2$-Sympathomimetika und Glukokortikoide stellen die beiden wichtigsten Substanzgruppen in der Behandlung des allergischen Asthma bronchiale dar. Hinzu können ergänzend orale Glukokortikoide, Anticholinergika, Cromone, Theophyllin und Leukotrienantagonisten verabreicht werden. Grundlage der Therapie des Asthma bronchiale stellt der Stufentherapieplan der AWMF [AWMF Asthma Leitlinie Langfassung, Version 1.3, Juli 2011] dar (vgl. Tab. 5).

Tab. 5: Stufentherapie des Asthma bronchiale.

| Schweregrade | I | II | III | IV | V |
|---|---|---|---|---|---|
| **Bedarfs-medikation** | Inhalative rasch wirksame $\beta_2$-Sympathomimetika | | | | |
| **Dauertherapie („Controller")** | Keine | ICS in niedriger Dosierung | ICS in mittlerer Dosierung<br><br>oder<br><br>ICS in niedriger Dosierung plus langwirksames $\beta_2$-Sympatho-mimetikum | ICS in mittlerer bis hoher Dosierung plus lang-wirksames $\beta_2$-Sympatho-mimetikum | Zusätzlich zu Stufe 4:<br>Orale Cortico-steroide<br><br>Bei IgE-vermittelter Pathogenese: monoklonaler Anti-IgE-Antikörper (Omalizumab) |

ICS: inhalative Corticosteroide
[modifiziert nach: AWMF Asthma Leitlinie Langfassung, Version 1.3, Juli 2011]

Antihistaminika gehören neben den topischen Glucocorticosteroiden zu den Therapeutika der ersten Wahl bei allergischer Rhinokonjunktivitis. Dabei stehen topische Antihistaminika sowohl für die nasale als auch für die okuläre Therapie zur Verfügung. Eingesetzt werden seit den 80er Jahren Antihistaminika der zweiten Generation und seit neuerem der dritten Generation, die im Vergleich zur ersten Generation eine höhere Rezeptoraktivität und geringere sedierende Effekte zeigen [Bousquet 2001]. Topische nasale Steroide stellen eine sehr effektive Therapieoption für die allergische Rhinitis dar, wobei ein geringes Risiko zur Entwicklung systemischer Nebenwirkungen besteht [Bonsmann 2001]. Beclomethasondipropionat (BDP) wurde als erstes Steroid Mitte der 70er Jahre in der topischen Therapie der allergischen Rhinitis eingesetzt. Heute sind viele weitere topische Steroide verfügbar, die sich von den klassischen Steroiden durch eine verbesserte Penetration in die Schleimhäute auf Grund höherer Lipophilie und höhere Affinität zum intrazellulären Steroidrezeptor unterscheiden [Issar 2006]. Sympathomimetika werden selten topisch eingesetzt, da sie ausschließlich über adrenerge Rezeptoren eine Gefäßkonstriktion der Nasenschleimhaut und damit eine Schwellungsabnahme nasal bewirken können. Die weitere Symptomatik bleibt unbeeinflusst [Deutsche Gesellschaft für HNO-Heilkunde 1996]. Ebenso wie die Sympathomimetika zeigen auch die Parasympatholytika bei lokaler Applikation

dosisabhängig nur eine Wirkung auf die nasale Sekretion [Kaiser 1995]. Die Gruppe der Leukotrienrezeptorantagonisten wird alleine oder in Kombination mit Antihistaminika [Meltzer 2000] zur Therapie eingesetzt, wobei sie einen geringeren Stellenwert unter den Therapeutika einnehmen. Begründet ist der Einsatz dieser Substanzgruppe über die Wirkung von Leukotrienen als Mediatoren allergischer Entzündung, insbesondere als Botenstoffe der Sekretion und Obstruktion [Deutsche Gesellschaft für HNO-Heilkunde 1996]. Zur Gruppe der Cromone gehören die Wirkstoffe Cromoglycinsäure und Nedocromil. Beide können nur zur lokalen Therapie verwendet werden, da eine orale Gabe nicht zu ausreichender Resorption führt. Über kontrollierte Studien konnte die Wirkung von Cromoglycinsäure für saisonale allergische Rhinitis nachgewiesen werden [Blair 1973, Holopainen 1971].

Die SIT stellt dagegen bislang die einzige kausale Therapie allergischer Erkrankungen dar [Bodtger 2002, Bousquet 1998, Grammer 1982, Jutel 2005, Passalacqua 2002]. Darüber hinaus kann eine frühzeitig durchgeführte SIT neue Sensibilisierungen verhindern [Calderon 2007, Des Roches 1997, Pajno 2001, Purello-D´Ambrosio 2001]. Bei belegter Wirksamkeit sowohl für mono- als auch für oligosensibilisierte Patienten [Deutsche Gesellschaft für HNO-Heilkunde 1996] stellt die SIT auch aus ökonomischer Sicht eine gute Alternative zur alleinigen symptomlindernden Therapie dar [Donahue 1999, Klimek 1999]. Standardtherapieform ist die subkutane Verabreichung, wobei zunehmend auch die sublinguale Applikation und die subkutane Gabe von Allergoiden (vgl. Kap. 1.8.1) in der Praxis eingesetzt wird [Canonica 2003].

### 1.8.1 Spezifische Immuntherapie

Belegt ist die Wirksamkeit der SIT in zahlreichen klinischen, randomisierten, placebokontrollierten Studien [Abramson 2000, Bodtger 2002, Bousquet 1988, Durham 1999, Grammer 1982, Haugaard 1992, Jutel 2005, Passalacqua 2002, Ross 2000, Varney 1997]. Darüber hinaus ist auch eine Progredienzverlangsamung bzw. Verhinderung eines sogenannten Etagenwechsel nachgewiesen [Grembiale 2000, Jacobsen 2007, Moller 2002, Niggemann 2006, Novembre 2004]. Nachdem die klinische Wirksamkeit und Sicherheit belegt werden konnte, nahmen nationale (DGAKI, *Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie*), europäische (EAACi,

*European Academy of Allergology and Clinical Immunology*) und internationale Vereinigungen (WHO, *World Health Organisation*) die SIT in ihre Empfehlungen zur Allergiebehandlung auf [Kleine-Tebbe 2003]. Seit Anerkennung der klinischen Wirksamkeit rückte in den vergangenen Jahren das wissenschaftliche Interesse über die genauen Wirkmechanismen in den Mittelpunkt der Forschung. Zudem stehen immer noch Untersuchungen zu Langzeiteffekten aus.

Unterschieden werden bei der SIT eine Aufdosierungs- und eine Erhaltungsphase [Bousquet 1998]. Während der Aufdosierungsphase wird das Allergen in Intervallen von zumeist ein bis zwei Wochen in ansteigender Dosierung verabreicht. Sobald die angestrebte Maximaldosis erreicht ist, geht es in die Erhaltungsphase über, während der diese Dosis in üblicherweise einmonatigen Abständen über einen Zeitraum von mindestens drei Jahren appliziert wird [Adkinson 1999]. Die erreichte klinische Wirkung ist auch nach Beendigung der Therapie noch nachweisbar [Durham 1999, Jacobsen 2007].
Erstmalig wurde eine SIT im Jahr 1911 durchgeführt, wobei damals bereits mit subkutanen Injektionen des Allergens, in diesem Fall Gräserpollen („Pollentoxin“), in ansteigenden Dosierungen gearbeitet wurde [Cohen 2003]. Durch Weiterentwicklungen der damaligen Therapie gibt es heute eine Vielzahl verschiedener SIT-Formen, so dass zusätzlich zu der subkutanen auch die sublinguale Applikationsform therapeutisch eingesetzt wird.
Indiziert ist die Hyposensibilisierung bei Patienten mit der gesicherten Diagnose einer IgE-vermittelten Typ-I-Allergie und entsprechenden klinischen Symptomen (Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis). Außerdem muss das Allergen, gegen das der Patient sensibilisiert ist, bekannt sein und eine Allergenvermeidung nicht ausreichend möglich sein. Der Einsatz einer SIT bei polysensibilisierten Patienten mit mehr als drei unabhängigen, klinisch relevanten Sensibilisierungen ebenso wie bei Kindern unter fünf Jahren wird aktuell kritisch gesehen [Bangsgaard 2010, Fiocchi 2005]. Zum Einsatz sollten nur standardisierte, qualitativ hochwertige Allergenextrakte kommen [Kleine-Tebbe 2000, Kleine-Tebbe 2003]. Eine entsprechende Verfügbarkeit besteht bei Bienengift, Wespengift, einigen Baum-, Gräser- und Roggenpollen, Hausstaubmilben und Katzenhaarallergenen [Klimek 2000]. Jedoch nicht alle

Patienten, die diese Voraussetzungen erfüllen, können sich einer SIT unterziehen. Zu den absoluten Kontraindikationen zählen maligne Tumorleiden im akuten Stadium, schwerwiegende Immundefekte (einschließlich Immunsuppression) sowie eine eingeschränkte Compliance, wie sie u.a. im Rahmen von psychiatrischen oder Suchterkrankungen zu finden ist [Klimek 2000]. Relative Kontraindikationen für eine Hyposensibilisierung liegen in folgenden Fällen vor:

- Schwere Allgemeinerkrankungen [Klimek 2000].
- Starke funktionelle Veränderungen des Respirationstraktes, z.B. Atemwegsobstruktionen mit FEV 1 < 70% oder persistierendes Asthma bronchiale [Klimek 2000, Kleine-Tebbe 2003].
- Kardiovaskuläre Erkrankungen oder Hyperthyreosen verbunden mit Risiken durch Adrenalingabe [Kleine-Tebbe 2003].
- Anwendung von β-Blockern [Hepner 1990] und ACE-Hemmern.
- Autoimmunerkrankungen, chronische Infektionen oder chronische Entzündungen [Klimek 2000].
- Sehr ausgeprägte Sensibilisierung, da bei diesen Patienten gehäuft schwere systemische Reaktionen nach der Allergeninjektion beobachtet werden konnten [Stewart 1992, Varney 1991].
- Schwangerschaft: In einigen Fällen kann die Fortführung einer bereits eingeleiteten Therapie sinnvoll sein [Rueff 2000]. Diskutiert wird ein erhöhtes Risiko für Frühgeburten [Mock 2000].

Wie bereits oben erwähnt gibt es unterschiedliche Formen der SIT. Dabei können in Abhängigkeit von der Applikation grundsätzlich zwei Gruppen unterschieden werden. Zum einen können die Allergene subkutan appliziert werden, so dass von subkutaner Immuntherapie (SCIT) gesprochen wird. Die andere Möglichkeit besteht in einer mukosalen Anwendung der Allergene, wobei die Extrakte direkt unter die Zunge (sublingual) aufgetragen werden (SLIT) [Canonica 2003].

Die SCIT darf nur durch einen Arzt mit allergologischen Fachkenntnissen durchgeführt werden [Kleine-Tebbe 2003]. Appliziert werden dabei Allergene entweder in Form von wässrigen Extrakten, Semi-Depot-Präparaten oder Allergoiden (vgl. Kap. 1.8.2). Die Injektion erfolgt subkutan auf der Streckseite des Oberarms etwa eine Handbreit proximal des Olecranons. Nach der Gabe

bleibt der Patient mindestens eine halbe Stunde unter ärztlicher Aufsicht, um im Falle einer anaphylaktischen Reaktion jederzeit intervenieren zu können [Kleine-Tebbe 2003, Klimek 2000]. Bestätigt wurde die klinische Wirksamkeit der SCIT mittels zahlreicher Untersuchungen [Dokic 2005, Ewan 1988, Haugaard 1993, Hedlin 1991, Kelso 1995], so dass diese klassische Therapieform als sehr effektiver Behandlungsansatz für die Typ I-Allergie angesehen wird.

Als schwerste Nebenwirkung einer SIT können anaphylaktische Schocks auftreten [Williams 2004], wobei die Angaben zur Inzidenz je nach Studie variieren. Der größte Teil schwerwiegender systemischer Reaktionen tritt innerhalb von 20 Minuten nach der Allergeninjektion auf [Stewart 1992]. Eine Zusammenfassung von 19 Studien zur SCIT ergab, dass im Median 0,5% der Injektionen eine systemische Reaktion nach sich ziehen bzw. 12,9% aller Patienten einmal oder öfter eine systemische Reaktion erleiden. In den meisten Fällen handelt es sich jedoch um leichte Reaktionen [Stewart 1992].

### 1.8.2 Allergoide

Allergoide sind Allergene, die durch Formaldehyd oder Glutaraldehyd modifiziert worden sind [Klimek 2000]. Dabei liegt nicht mehr das Allergen in seiner natürlichen Form vor, sondern mit veränderter räumlicher Konfiguration. Die Aminosäuresequenz bleibt erhalten, so dass nach wie vor T-Zellepitope vorhanden sind, die 3D-Struktur ist allerdings verändert. Hintergrund dieser Modifikation ist, dass in den Körper eintretende Allergene normalerweise durch APC prozessiert und dann an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese präsentierten Allergenabschnitte besitzen nicht mehr die Konformation des nativen Moleküls, sondern nehmen durch Bindung an die MHCII-Moleküle eine abweichende räumliche Struktur ein [Lehrer 1996]. Diese zehn bis 25 Aminosäuren umfassenden Peptide können von spezifischen TCR erkannt werden, wobei die Aminosäuresequenz den ausschlaggebenden Faktor zur Erkennung darstellt. B-Zellepitope werden hingegen konformationsabhängig erkannt [Lombardero 1990] und führen dann zur Antikörperproduktion.

Ziel der Therapie mit Allergoiden ist es daher, die Modulation der Immunantwort ausschließlich über T-Zellepitope zu erreichen. Dadurch sollen IgE-bedingte Nebenwirkungen bzw. allergische Symptome minimiert werden [Casanovas

2005], da B-Zellepitope nach der Aldehydbehandlung nicht mehr in der entsprechenden Konformation vorhanden sind. Experimentell konnte herausgefunden werden, dass Allergoide eine deutlich niedrigere Bindungsaffinität zu spezifischem IgE aufzeigen und damit auch eine reduzierte Allergenität besitzen [Wurtzen 2007]. Durch diese Reduktion ist die Rate allergischer bzw. anaphylaktischer Nebenwirkungen geringer als bei konventionellen Allergenen [Casanovas 2002, Casanovas 2005] und ermöglicht dadurch eine schnellere Dosissteigerung bei guter Therapiesicherheit. Jedoch gibt es auch Analysen, die keinen Unterschied in der Häufigkeit allergischer Nebenwirkungen zwischen Allergoiden und nativen Allergenen nachweisen konnten [Lüderitz-Püchel 2001].

Die Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben, wurden alle mit dem Allergoid Depigoid® für Betula alba (LETI Pharma GmbH) behandelt. Das Medikament wurde bei allen an der Studie teilnehmenden Patienten entsprechend den Dosisvorgaben des Herstellers appliziert (vgl. Abb. 5).

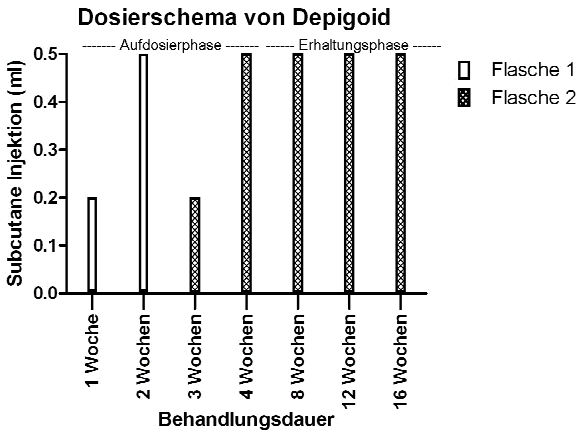


Abb. 5: Dosierschema von Depigoid®.
[modifiziert nach LETI Pharma]

Zur Herstellung des Allergoids hat LETI Pharma ein von ihnen patentiertes Herstellungsverfahren entwickelt (vgl. Abb. 6). Die Depigmentierung dient der Aufreinigung und Entfernung aller nicht-proteinartigen, therapeutisch irrelevanten Substanzen. Zudem soll hiermit die enzymatische Aktivität, die viele Allergene mit sich bringen, reduziert werden. Bei vielen Allergenen handelt es sich um funktionelle Enzyme mit zum Teil IgE-potenzierender Wirkung.

Zusätzlich können diese enzymatischen Wirkungen einen negativen Einfluss auf die Haltbarkeit des Medikamentes haben. Durch Polymerisation mit Glutaraldehyd soll die allergene Kapazität der depigmentierten nativen Allergenextrakte weiter vermindert werden. Die Immunogenität, also die Fähigkeit T-Zell zu stimulieren, die sich ausschließlich aus der Aminosäuresequenz ergibt, soll erhalten bleiben. Durch abschließende Adsorption des Allergoids an Aluminiumhydroxid wird die Freisetzung und Abgabe an den Körper aus dem subkutanen Depot verzögert, so dass in der Erhaltungsphase eine Applikation pro Monat ausreichend ist. Außerdem stellt sich eine erhöhte Stabilität ein, so dass eine ständige Kühlung nicht mehr erforderlich ist.

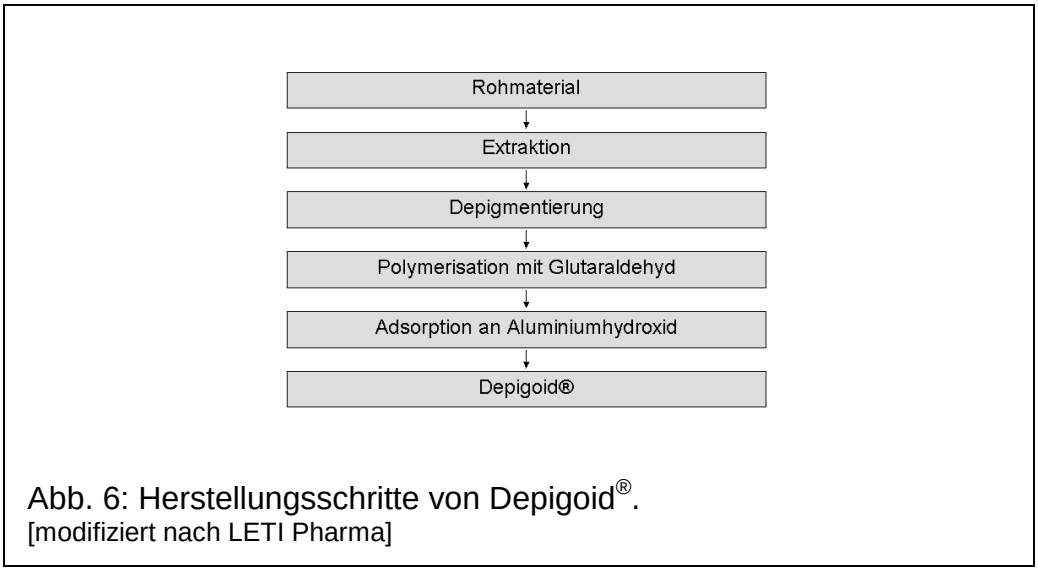


Abb. 6: Herstellungsschritte von Depigoid®.
[modifiziert nach LETI Pharma]

Als charakteristische Merkmale von Depigoid® gelten die nachfolgend genannten Punkte:

- Depigmentierter und damit von irrelevantem Material gereinigter Extrakt [Europäisches Patentamt 1997].
- Erreichen eines schnellen Schutzes vor Allergien [Ferrer 2003].
- Schnelle Aufdosierungsphase und dadurch Vorsprung an Maximaldosen gegenüber der konventionellen SIT.
- Hohe Wirksamkeit durch hohe Konzentrationen [Branco-Ferreira 2005, Guerra 2003].
- Hohe Sicherheit durch hohe Reinheit [Casanovas 2002, Casanovas 2005].

## 1.9 Fragestellung

Die klinische Effektivität der SIT ist gut belegt (vgl. Kap. 1.8.1). Die durch diese Therapie induzierten immunologischen Veränderungen und ihre pathophysiologische Relevanz sind dagegen immer noch Gegenstand laufender Untersuchungen. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass bei Typ-I-Allergien das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen gestört ist, jedoch zeigen neuere Studien, dass Treg durch ihre supprimierenden Effekte eine entscheidende Rolle bei der Modulation der zellulären Immunantwort spielen (vgl. Kap. 1.5). Besonders Tr1 werden als wichtige Mediatoren bei der Wirkung einer erfolgreichen SIT angesehen, da signifikante Anstiege während der frühen Phase der klassischen SCIT beobachtet werden konnten [Jutel 2003, Möbs 2010]. Ebenso kommt es zu einer Erhöhung der Treg-induzierten IL-10-Sekretion [Akdis 2001, Muller 1998]. Bisherige immunologische Untersuchungen zu Mechanismen der SIT wurden im Wesentlichen im Rahmen klassischer SCIT-Verfahren mit nativer Allergenapplikation durchgeführt. Allergoide unterscheiden sich in Aufbau, Struktur und ihren immunologischen Eigenschaften deutlich von nativen Allergenen. In diesem Projekt soll daher das Vorkommen und die zellulären Veränderungen in den Frequenzen allergenspezifischer T-Zellpopulationen (Th1/Th2/Treg) bei Patienten mit klinisch relevanter Birkenpollenallergie (Rhinokonjunktivitis und / oder Asthma bronchiale) unter einer SIT mit Birkenpollenextrakt Allergoid (Depigoid®) untersucht und mit dem klinischen Erfolg der SIT korreliert werden. Insbesondere Veränderungen der Tr1- und $Foxp3^+$ Treg-Zellen unter SIT mit Allergoiden wurden bisher nicht näher bestimmt. Mit dem vorliegenden Projekt sollen diese Lücken geschlossen werden. Dabei sollen die Veränderungen im Zytokinmuster unter der SIT näher charakterisiert werden und vor allem der zeitliche Verlauf der T-Zellfrequenzen und das Verhältnis zwischen allergenspezifischen Tr1- und Th2-Zellen sowie Th1- und Th2-Zellen eingehender untersucht werden. Parallel dazu dient die Messung der Antikörperprofile von Gesamt-IgE, allergenspezifischem IgE sowie allergenspezifischem IgG4 der Verlaufsbeobachtung humoraler Parameter. Die

Ergebnisse sowie der klinische Therapieerfolg sollen mit den publizierten Daten der konventionellen SCIT verglichen werden.

Folgende Test wurden dafür durchgeführt:

- Erfassung des klinischen Therapieerfolgs mittels Fragebögen.
- Überprüfung des klinischen Ansprechens mittels Pricktest.
- Erfassung der Proliferation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) nach Stimulation mit Bet v 1.
- Bestimmung der $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ Treg mittels durchflusszytometrischer Messungen.
- Bestimmung der Frequenzen von Bet v 1-spezifischen Th1-, Th2- und Tr1-Zellen nach Allergenstimulation mittels ELISPOT.
- Messung des Gesamt-IgE, Birkenpollen-spezifischen IgE, Bet v 1-spezifischen IgE und IgG4 durch Fluoroenzymimmunoassays (FEIA).

# 2 MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Patienten

Als Teilnehmer für diese Studie wurden sieben Birkenpollenallergiker im Alter zwischen 24 und 54 Jahren (Durchschnittsalter 37 Jahre) eingeschlossen, wobei es sich um fünf Frauen und zwei Männer handelte. Alle Studienteilnehmer waren Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg. Die Indikation zur SIT wurde durch die in der Allergologieambulanz tätigen Ärzte gestellt.
Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultat der Philipps-Universitat Marburg in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki genehmigt.

Einschlusskriterien:

- Rhinokonjunktivitis allergica und / oder Asthma bronchiale allergicum mit Beschwerdemaximum im Frühjahr.
- Sensibilisierung gegen Birkenpollen, in klinischen Tests nachweisbar:
    - Positiver Prick- oder Intracutantest gegen Birkenpollen.
    - Positiver nasaler Provokationstest gegen Birkenpollen.
- Sensibilisierung gegen Birkenpollen (und das Leitallergen Bet v 1) in vitro nachweisbar:
    - Spezifisches IgE der CAP-Klasse >1 (auf das klassische Birkenpollenallergen).
    - CAP-Klasse >0 auf rekombinantes Bet v 1.
- Alter zwischen 18 und 65 Jahren.
- Unterschriebene Einverständniserklärung.

Ausschlusskriterien:

- Kontraindikationen gegen eine SIT.
- Bestehender Kinderwunsch oder Schwangerschaft.
- Compliance nicht gewährleistet.
- Minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten.

Die Patienten wurden im Zeitraum zwischen September 2007 und März 2009 in die Studie eingeschlossen. Die ambulanten Injektionen wurden in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt. Im Zuge dieser Konsultationen fanden die Blutentnahmen von venösem Blut in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA)-Röhrchen, sowie die standardisierte Erhebung des aktuellen Zustandes ihrer Erkrankung mittels Fragebogen statt.
Von den sieben Patienten wurden im weiteren Verlauf zu vorher festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen. Diese Zeitpunkte lagen vor Therapiebeginn (M0) und 1, 3, 6 und 12 Monaten nach Therapiebeginn (M1, M3, M6, M12) (vgl. Tab. 6).

Tab. 6: Übersicht über die an der Studie teilnehmenden Patienten und Untersuchungszeitpunkte.

| | M0 | M1 | M3 | M6 | M12 |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 | X | X | X | X | X |
| P2 | X | X | X | X | X |
| P3 | X | Patient erschien nicht zur Blutentnahme | X | X | X |
| P4 | X | X | X | X | X |
| P5 | X | X | Therapie abgebrochen | | |
| P6 | X | X | X | X | X |
| P7 | X | X | X | Therapie läuft noch | |

P: Patient, M: Untersuchungsmonat, X: Untersuchung wurde wie geplant durchgeführt

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Laborgeräte

| | |
|---|---|
| Analysenwaage Kern 770 | Kern, Balingen, D |
| Brutschrank Hera cell 150 | Heraeus, Langenselbold, D |
| Dry Vaccum Pump / Compressor 2511 | Welch, Hampshire, UK |
| Einfrierbehälter Qualifreeze | NUNC, Wiesbaden, D |
| Eismaschine ZBE 150 | Ziegra, Isernhagen, D |
| Eli.Scan F-3200 | A.EL.VIS, Hannover, D |
| Express Pipettierhilfe | Becton Dickison, Heidelberg, D |

| | |
|---|---|
| FACS Calibur | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| Finnpipette multichannel 5-50µl | Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Gefrierschrank Comfort | Liebherr, Ochsenhausen, D |
| Gefrierschrank Hera freeze | Heraeus, Osterode, D |
| Gefrierschrank Premium | Liebherr, Ochsenhausen, D |
| Gilson-Pipetman 20µl | Abimed, Langenfeld, D |
| ImmunoCap® 100 E | Phadia AB, Uppsala, Schweden |
| Kühlschrank Economic cooler | Bosch, Stuttgart, D |
| Megafuge 1.0 R | Heraeus, Osterode, D |
| 200ml Mehrkanalpipette | Eppendorf, Hamburg, D |
| 200ml Mehrkanalpipette Discovery | Abimed, Langenfeld, D |
| Microplate Scintillation&Luminescence Counter TopCount NXT | Hewlett Packard, Frankfurt, D |
| Mikroskop Axiostar | Carl Zeiss, Oberkochern, D |
| MS1 Minishaker | IKA, Staufen, D |
| Multipette plus | Eppendorf, Hamburg, D |
| Neubauer Zählkammer | Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, D |
| pH-Meter pH510 | Eutech Instruments, Nijkerk, NL |
| Pipet.aid | Drummond, Broomall, USA |
| Präzisionswaage Kern 440-49N | Kern, Balingen, D |
| Sterilwerkbank Hera safe Typ: KS 18 | Heraeus, Osterode, D |
| Sterilwerkbank Gelaire BSB 4 | Gelaire, Sydney, AUS |
| Stickstofftank Chronos 200 | Cryotherm, Kirchen/Sieg, D |
| Trockenschrank UT12 | Heraeus, Langenselbold, D |
| Vortexmixer Genius 3 | IKA, Staufen, D |
| Wasserbad GFL 1083 | GFL, Großburgwedel, D |

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Combitips plus 5ml | Eppendorf, Hamburg, D |
| Cryo.s Einfrierröhrchen 2ml | Greiner bio-one, Frickenhausen, D |
| CryoTubeTM Vials | NUNC, Wiesbaden, D |

| | |
|---|---|
| Deckgläschen für Neubauer Zählkammer | Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| Easy Tab, Glass Fiber F Lonza | Hewlett Packard, Frankfurt, D |
| Einfrierbox für Cryoröhrchen | NUNC, Wiesbaden, D |
| Einmal-Pipettenspitzen | Mikro-Bio-Tech-Brand, Gießen, D |
| FACS-Röhrchen | Sarstedt, Nürnbrecht, D |
| Gewebekulturplatten 96 *well* Rundboden | Greiner bio-one, Frickenhausen, D |
| Handschuhe Nobaglove-Latex | NOBA Verbandmittel Danz, Wetter/Ruhr, D |
| Lagerkasten für 100 Mikroröhrchen | Sarstedt, Nürnbrecht, D |
| Mikrotiterplatte 6 *well* / 24 *well* | NUNC, Wiesbaden, D |
| MILLEX-GP 0,22µm Filter Unit | Millipore, Eschborn, D |
| Multiscreen Abklebeband transparent | Millipore, Eschborn, D |
| Neubauerzählkammer | Brand, Wertheim/Main, D |
| Neubauerzählkammer | Labor Optik, Friedrichsdorf, D |
| Pasteurpipette Glas | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D |
| Reagent Reservoir 50ml | Corning Incorporated, Corning, USA |
| Reagenzröhrchen 15ml / 50ml | Greiner bio-one, Frickenhausen, D |
| Serologische Pipette 1ml / 2ml / 50ml | Greiner bio-one, Frickenhausen, D |
| Serologische Pipette 5ml / 10ml / 25ml | NUNC, Wiesbaden, D |
| S-Monovette EDTA | Sarstedt, Nürnbrecht, D |
| S-Monovette CPDA | Sarstedt, Nürnbrecht, D |
| S-Monovette Serum | Sarstedt, Nürnbrecht, D |
| Steriflip | Millipore, Eschborn, D |

### 2.2.3 Chemikalien

| | |
|---|---|
| 2-Propanolol (70%) | Merck, Darmstadt, D |
| 2-Propanolol (100%) | Sigma-Aldrich, Seelze, D |
| AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol; $C_{14}H_{14}N_2$) | Sigma-Aldrich, Seelze, D |
| Ammoniumchlorid ($NH_4Cl$) | Mallinckrodt Baker, Griesheim, D |
| Aqua ad iniectabilia | B. Braun, Melsungen, D |
| Dimethylsulfoxide, minimum 99,5 (GC) | Sigma-Aldrich, Seelze, D |

| | |
|---|---|
| DMF (N,N-Dimethylformamide) | Sigma-Aldrich, Seelze, D |
| Dulbecco´s PBS | PAA Laboratories, Cölbe, D |
| EDTA 0,5M | Sigma-Aldrich, Seelze, D |
| Essigsäure ($C_2H_4O_2$) | Merck, Darmstadt, D |
| FACS Clean | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| FACS Flow | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| FACS Rinse | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| FCS (*fetal calf serum*) | PAA Lab. GmbH, Cölbe, D |
| Gigasept AF | Schülke & Mayr, Norderstedt, D |
| Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$) | Merck, Darmstadt, D |
| L-Glutamin 200mM | PAA Lab. GmbH, Cölbe, D |
| [methyl-$^3$H]-Thymidin | Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK |
| MicroScintTM-O, 1l | PerkinElmer, Rodgau-Jugesheim, D |
| Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$) | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumazid ($NaN_3$) | Merck, Darmstadt, D |
| Pancoll human, steril filtered | PAN Biotech, Aidenbach, D |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck, Darmstadt, D |
| Penicillin (10.000U/ml) | PAA Lab. GmbH, Cölbe, D |
| PHS (humanes Serum, Typ AB) | PAA Lab. GmbH, Cölbe, D |
| Rinderalbumin Fraktion V (*bovine serum albumin*) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin | Lonza, Vervies, Belgien |
| Streptomycin (10.000µg/ml) | PAA Lab. GmbH, Cölbe, D |
| Trypan blue solution (0,4%) | Sigma-Aldrich, Seelze, D |
| Tween-20 | Merck, Darmstadt, D |
| Wasserstoffperoxid 30% | Merck, Darmstadt, D |

### 2.2.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

| | |
|---|---|
| FITC Mouse IgG1 (Isotyp-Kontrolle) | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| PE Mouse IgG1 (Isotyp-Kontrolle) | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| APC Mouse IgG1 (Isotyp-Kontrolle) | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| FITC Mouse anti-Human CD4 | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| PE Mouse anti-Human CD127 | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| APC Mouse anti-Human CD25 | Becton Dickison, Heidelberg, D |

### 2.2.5 Kits

| | |
|---|---|
| ELISPOT Human IL-5 ELISPOT-Set | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| ELISPOT Human IL-10 ELISPOT-Set | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| ELISPOT Human IFN-γ ELISPOT-Set | Becton Dickison, Heidelberg, D |

### 2.2.6 Stimulanzien

| | |
|---|---|
| Bet v 1a, 1mg | Biomay, Wien, A |
| Interleukin 2 (IL-2), human | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Phytohämagglutinin (PHA) | Sigma-Aldrich, Seelze, D |
| Tetanus toxin von Clostridium tetani | Sigma-Aldrich, Seelze, D |

### 2.2.7 Puffer und Kulturmedien

ACK (=Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat)-Lysis-Puffer: 0,15M $NH_4Cl$ + 1mM $KHCO_3$ + 0,1mM EDTA → auf 1 Liter destilliertes Wasser → pH auf 7,2 bis 7,4 einstellen

Einfriermedium: FCS + 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

FACS-Puffer: 1x Dulbecco´s PBS + 1% Rinderserumalbumin + 0,1% $NaN_3$ → Sterilfiltration mittels Stericup 0,22µm (Millipore)

$RPMI^{++}$: RPMI 1640 + 100U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin + 2mM L-Glutamin

Waschpuffer 1: 1l PBS + 0,5ml Tween-20

Waschpuffer 2: Entspricht PBS

### 2.2.8 Software

| | |
|---|---|
| Eli.Analyse V 4.2 | A.EL.VIS, Hannover, D |

| | |
|---|---|
| CellQuest Pro | Becton Dickison, Heidelberg, D |
| Microsoft® Exel | Microsoft, USA |
| Microsoft® Word | Microsoft, USA |
| Microsoft® Powerpoint | Microsoft, USA |
| GraphPad Prism 5 | GraphPad Software, San Diego |

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Fragebögen

Die Patienten bekamen zu jedem Untersuchungszeitpunkt zwei standardisierte Fragebögen. Dabei wurden der Schweregrad der allergischen Erkrankung (Klinischer Score A) und die Änderung der symptomatischen Medikation unter Therapie (Medikamenten-Score) erfasst. Die Dokumentation erfolgte dabei als subjektive Einschätzung durch den Patienten. Der Klinische Score A umfasst eine Skala von „überhaupt nicht krank“ (1) bis „extrem schwer krank“ (7). Analog dazu kann beim Medikamenten-Score der veränderte Medikametenverbrauch mit 1 („sehr viel weniger“) bis 7 („sehr viel mehr“) angegeben werden. Ein Puntkwert von 4 entspricht dabei einem unveränderten Medikamentenbedarf.

### 2.3.2 Pricktest

Zu Therapiebeginn und ein Jahr nach Beginn der SIT wurde bei jedem Patienten ein Pricktest durchgeführt. Beim Pricktest wurde die Reaktion auf Birkenpollen mittels standardisierter Birkenpollenlösung getestet. Als Negativkontrolle diente physiologische Kochsalzlösung. Als Positivkontrolle wurde Histamin-Lösung verwendet, deren normale Reaktion als Vergleichsparameter mit doppelt-positiv (++) bewertet wurde [Schaub 2010]. Von diesen Lösungen wurde je ein Tropfen auf die Haut des ventralen Unterarms appliziert und mit einer Lanzette in die Cutis eingebracht. Nach ca. 15 Minuten wurde die lokale Hautreaktion erfasst und mit „keine Reaktion“ (Ø) bis zu einer vierfachen positiven Reaktion (++++), im Vergleich zur Histaminkontrolle, je nach Stärke des Effekts bewertet. Dabei zeigten sich IgE-

vermittelte allergische Reaktionen als Quaddelbildung mit lokalem Juckreiz [Moll 2005].

### 2.3.3 Immunglobulin-Messung

Die Ig-Messung wurde mit dem Phadia ImmunoCap System nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde Gesamt-IgE, Birkenpollen-spezifisches IgE, Bet v 1-spezifisches IgE und Bet v 1-spezifisches IgG4 gemessen.

Für diese Studie wurde sowohl Birkenpollen-spezifisches IgE als auch Bet v 1-spezifisches IgE bestimmt, um sicherzustellen, dass der Patient auch auf das Majorallergen reagiert. Alle weiteren experimentellen Untersuchungen wurden daraufhin mit dem Allergen Bet v 1 durchgeführt..

Zur Bestimmung der Menge des spezifischen Ig sind beim FEIA die Allergene, auf deren spezifische Antikörper getestet werden soll, kovalent an das ImmunoCAP gebunden. Die Serumproben werden auf Platten gegeben und anschließend inkubiert. Während dieser Inkubationszeit können die spezifischen Ig an die Allergene binden. Das ungebundene Material wird durch einen Waschschritt entfernt. Um die gebundenen spezifischen Ig-Moleküle darstellen zu können, werden anschließend enzymmarkierte Anti-Ig hinzugegeben. Nach Inkubation und erneutem Waschgang wird eine Entwicklungslösung hinzugefügt. Diese bewirkt eine Farbreaktion, die für eine Konzentrationsbestimmung herangezogen wird. Dabei ist die Farbreaktion proportional zur gebundenen Ig-Konzentration und wird automatisch mit parallel ermittelten Referenzwerten verglichen.

### 2.3.4 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen

Im Vollblut finden sich viele verschiedene Zelltypen wie Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten. Unter dem Sammelbegriff PBMC werden Lymphozyten und Monozyten zusammengefasst. Die Auftrennung der PBMC erfolgt über die unterschiedliche Dichte der Zellen. Die Dichtezentrifugation mittels Ficoll (Dichte 1,077g/cm³) basiert darauf, dass Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten eine geringere, Granulozyten und Erythrozyten dagegen eine höhere Dichte als Ficoll besitzen. Während der Zentrifugation sammeln sich PBMC demnach über dem Ficoll an, während

Granulozyten und Erythrozyten durch das Ficoll hindurch auf den Boden des Röhrchens sinken (vgl. Abb.7). Die Thrombozyten bleiben auf Grund ihrer sehr geringen Dichte im Plasmaüberstand.

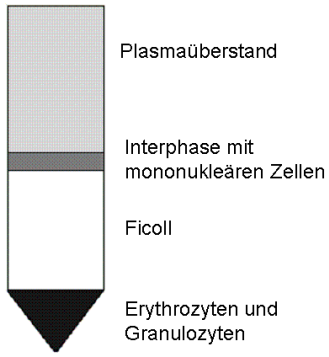


Abb. 7: Dichtezentrifugation mittels Ficoll.

Peripher venöses Blut der Patienten wurde bei 1300rpm und 22℃ für 10min zentrifugiert und danach das Plasma abpipettiert. Anschließend wurde das Blut mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und auf Pancoll-Lösung im Verhältnis 1:2 geschichtet. Auf Grund der Leukozyten-aktivierenden Wirkung der Pancoll-Lösung sollte ein Vermischen unbedingt vermieden werden [Sack 2007]. Dafür wurde das Röhrchen in einem Winkel von ungefähr 45° zur Tischebene ausgerichtet und das Blut vorsichtig entlang der Gefäßwand auf das Pancoll aufgeschichtet. Dort bildete sich zwischen dem Pancoll und dem Blut eine Phasengrenze aus. Die Dichtezentrifugation erfolgte bei 1500rpm und 22℃ für 30min unter Ausschaltung der Rotorbremse. Die Interphase mit den PBMC konnte nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Die entnommenen PBMC wurden in 50ml Falcon-Röhrchen mit 15ml vorgelegtem kalten PBS überführt und anschließend mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1800rpm und 4℃ für 10 min. Danach wurde der Überstand dekantiert und die Röhrchen wieder mit 4°C kaltem PBS auf 50ml aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1300rpm und 4℃ für 10 min wurden die Zellen in insgesamt 50ml $RPMI^{++}$ gepoolt. Die mittels PBMC-Isolation gewonnenen Zellen wurden anschließend anhand einer Vitalfärbung mit Trypanblau quantifiziert (vgl. Kap. 2.3.5).

### 2.3.5 Trypanblaufärbung

Trypanblau kann durch die Zellmembran in das Zytosol der Zellen eindringen und dieses anfärben. Gesunde lebende Zellen verfügen über einen Transportmechanismus, der den Farbstoff aktiv aus der Zelle heraus transportiert. Da dieser Mechanismus in toten Zellen nicht mehr ausgeprägt ist, werden diese selektiv angefärbt.

Zur Zellzählung wurde das Zellsuspendat 1:1 mit Trypanblau vermischt und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop die Zellzahl bestimmt. Dabei wurden jeweils vier Großquadranten mit einer Fläche von $1mm^2$ ausgezählt. Die Zellzahl errechnete sich aus dem durchschnittlichen Ergebnis pro Großquadrant x 2 (Verdünnung mit Trypanblau) x $10^4$ (Faktor für die Zählkammer) x Gesamtvolumen der Zellsuspension.

### 2.3.6 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der PBMC wurden diese bei 1300rpm und 4℃ für 10 min zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgegossen. Die Zellen wurden in FCS mit 10% DMSO ($10^7$ Zellen/ml) aufgenommen und eingefroren. Danach wurden die Proben in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter auf -80℃ heruntergekühlt. Der Einfrierbehälter bewirkt dabei eine Temperatursenkung von ungefähr 1℃ pro Stunde. Abschließend konnten die Proben für eine längerfristige Lagerung in einen Stickstofftank überführt werden.

### 2.3.7 Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat -Lyse

Die ACK-Lyse ist ein vorbereitender Schritt für die durchflusszytometrische Messung. Die Messung dient der Erfassung von Fluoreszenzeigenschaften vorher markierter Zellen (vgl. Kap. 2.3.8). Da Erythrozyten einerseits in Vollblut in deutlich höherer Zahl vorliegen und andererseits unspezifisch fluoreszenzmarkierte Antikörper binden können, kann es zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen. Um diese Fehlerquelle zu umgehen, wurden die Erythrozyten mittels ACK-Lyse entfernt. Grundprinzip ist der osmotische Schock. bei dem Flüssigkeit die Erythrozytenmembran durchdringt und dadurch zu einer Membranschwächung mit Quellung der Zelle bis hin zum Platzen der Zelle führt [Van Agthoven 2004].

Pro Probe wurde Vollblut im Verhältnis 1:10 mit ACK-Lysis-Puffer vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1200rpm und 4℃ für 8 min. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit dem gleich Volumen an ACK-Puffer resuspendiert. Es folgte erneut eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit anschließender Zentrifugation bei 1200rpm und 4℃ für 8 min. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in $RPMI^{++}$ aufgenommen und wiederum für 5 min bei 1600rpm und 4℃ zentrifugiert. Der Überstand konnte abgegossen und das Zellpellet für die Durchflusszytometrie verwendet werden.

### 2.3.8 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Fluoreszenzeigenschaften von Zellen gemessen werden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine sehr weit verbreitete Messmethode, da eine Vielzahl zellspezifischer Parameter über Fluoreszenz markiert werden und mit diesem Ansatz untersucht werden kann [Darzynkiewicz 1994].

Die zu untersuchenden Zellen wurden in ein Schlauchsystem des *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Gerätes aufgesaugt und mit Druck in einen Mantelstrahl injiziert. Dadurch kommt es zu einer Beschleunigung der Zellen, so dass sie hintereinander aufgereiht werden und einzeln in die Messkammer gelangen. Dort trifft ein Laserstrahl auf jede einzelne Zelle und wird zellspezifisch gestreut. Dabei wird das gestreute Licht bei 180° Vorwärtsstreuung (*forward scatter*; FSC) und bei 90° Seitwärtsstreuung (*side scatter*; SSC) gemessen. Der FCS gibt Auskunft über die Zellgröße und die Oberflächenstruktur, der SSC über die Granularität. Auch die Unterscheidung Antikörper-markierter Zellen von unmarkierten Zellen wird mit Hilfe dieser Messung vorgenommen. Durch Anregung der an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe emittieren diese Licht einer bestimmten Wellenlänge. Am häufigsten werden Antikörper an Floureszeinisothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) gekoppelt (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Häufig verwendete Fluoreszenzfarbstoffe bei durchflusszytometrischen Messungen.

| Fluoreszenz-farbstoff | Emission [nm] | Farbe |
|---|---|---|
| FITC | 530 | Grün |
| PE | 578 | Gelb |
| APC | 650 | Rot |

FITC: Floureszeinisothiozyanat, PE: Phycoerythrin, APC: Allophycocyanin

Da mittels Durchflusszytometrie nur relative Messergebnisse ermittelt werden können, müssen immer Isotypkontrollen mitgeführt werden. Diese Isotypkontrollen sind Proben, die mit einem nicht bindenden Antikörper des gleichen Isotyps wie der spezifische Antikörper versetzt werden [Shapiro 2003]. Die Fluoreszenz, die in den Isotypkontrollen gemessen werden kann, beruht auf einer unspezifischen Bindung der Antikörper.

Die bei der ACK-Lyse gewonnenen Zellen wurden in 1ml FACS-Puffer pro 500µl CPDA-Blut Ausgangsmaterial aufgenommen. Das Zellsuspendat wurde auf FACS-Röhrchen verteilt, wobei in jedes Röhrchen 1ml Zelllösung gegeben wurde. Die Zellen wurden nochmals für 5 min bei 1600rpm und 4℃ zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das gebildete Zellpellet wurde kurz resuspendiert und konnte im Anschluss mit den FACS-Antikörpern versehen werden. Dabei verteilten sich die Antikörper auf die in dieser Arbeit gemessenen Proben wie in Tabelle 8 gezeigt.

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei der Durchflusszytometrie.

| Probe | Antikörper | Menge |
|---|---|---|
| I | Ø | |
| II | Iso-FITC | 5µl |
| III | Iso-PE | 2,5µl |
| IV | Iso-APC | 5µl |
| V | CD4-FITC | 5µl |
| | CD127-PE | 2,5µl |
| | CD25-APC | 5µl |

Iso: Isotyp, CD: *cluster of differentiation*, FITC: Floureszeinisothiozyanat, PE: Phycoerythrin, APC: Allophycocyanin

Nach Zugabe der Antikörper zu den Zellen wurden diese für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, da die Antikörper lichtempfindlich sind. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgten zwei Waschschritte mit jeweils 1ml FACS-Puffer pro Probe und Zentrifugation bei 1600rpm und 4℃ für 5 min. Damit wurden die nicht gebundenen Antikörper aus der Probe entfernt. Zuletzt wurde der Überstand abgegossen und die Zellen (je nach Größe des Pellets) in 200 bis 300µl FACS-Puffer zur Messung aufgenommen.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Beobachtung potentieller Veränderungen der $Foxp3^+$ Treg unter SIT. Diese tragen, wie in der Einleitung bereits erörtert, CD4- und CD25-Oberflächenmarker (vgl. Kap. 1.5), die mittels Fluoreszenz dargestellt werden können. Charakteristisch für Treg ist die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3, der auf Grund seiner intrazellulären Lage eine Lyse der Zellen vor seiner Markierung erfordern würde. Alternativ kann die Frequenz der Treg ausschließlich über Oberflächenmarker bestimmt werden. Neuere Studien zeigen, dass die Präsentation von CD127 auf der Zelloberfläche invers mit der Expression von foxp3 korreliert. Liu et. Al haben bspw. festgestellt, dass es sich bei $CD4^+CD25^+CD127^{low}$-Zellen zu 95% um Foxp3-positive Zellen handelt [Liu 2006].

Um eine Standardisierung der Untersuchungsbedingungen zu erzielen, wurden die Zellen jeweils am Tag der Blutentnahme untersucht, da eine Kryokonservierung von PBMC mit anschließender Messung zu stark erniedrigten Ergebnissen führt [Elkord 2009, Möbs 2010]. Zudem liegt keine Korrelation der Expression von CD4, CD25 und CD127 zwischen frischen

unmittelbar gemessenen Zellen und PBMC nach Einfrier- und Auftauprozedur vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde pro Zeitpunkt und Patient der prozentuale Anteil der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ T-Zellen als eine Subpopulation aller in der Peripherie vorkommenden $CD4^+$-Zellen bestimmt.

### 2.3.9 Proliferationsassay

Mit dem Proliferationsassay kann die Reaktion von PBMC auf verschiedene Antigene getestet werden. Maß für die Stimulation der Zellen ist der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen.

In dieser Studie interessierte vornehmlich die Reaktion der Zellen auf das Birkenpollen-Hauptallergen Bet v 1. Um Referenzwerte zu erhalten, wurden die Zellen der Patienten zusätzlich mit Tetanus Toxin, PHA und IL-2 stimuliert. IL-2 dient als Wachstumsfaktor für aktivierte Lymphozyten. PHA aktiviert Lymphozyten als Mitogen unspezifisch. Tetanus Toxin dagegen wird als weitere Positivkontrolle für antigenspezifische Stimulation mitgeführt.

Pro Versuchsansatz wurden 1 x $10^6$ PBMC/ml eingesetzt und entsprechend unten anstehender Tabelle als Triplikat in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten stimuliert (vgl. Tab. 9).

Tab. 9: Verwendete Antigene für den Proliferationsassay.

| Antigen | Konzentration im Ansatz | Zugegebene Menge |
|---|---|---|
| Kontrolle | / | / |
| Bet v 1 | 10 µg/ml | 6,2 µl (Stocklsg.: 1 mg/ml) |
| Tetanus Toxin | 2 µg/ml | 12,4 µl (Stocklsg.: 100 µg/ml) |
| PHA | 1% | 6,2 µl (Stocklsg.: 100%) |
| IL-2 | 10 u/ml | 2,48 µl (Stocklsg.: 2500 u/ml) |

Bet v 1: Majorallergen der Birke, PHA: Phytohämagglutinin, IL: Interleukin

Die so vorbereiteten Proben wurden sechs Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% $CO_2$ inkubiert. Am sechsten Tag wurden die Zellen mit $^3$H-Thymidin versetzt und für weitere 18 h im Brutschrank bei 37°C inkubi ert. In dieser Zeit wurde das Thymidin von proliferierenden Zellen eingebaut und konnte anschließend

nachgewiesen werden. Dabei war die Aufnahme von Thymidin proportional zum Wachstum der Zellen.

Ausgewertet wurden die Platten mit einem Szintillations-Meßgerät. Mittels Zellharvester wurde die Probe auf einen Glasfaser-Filter übertragen. Nach Trocknung wurde der Filter zur Auswertung in eine entsprechende Kassette eingepasst, pro Kavität mit 25 µl Scintillationsflüssigkeit benetzt und mit Hilfe eines Szintillationsmeßgerätes ausgewertet. Dabei wurde die Thymidinaufnahme in Zählimpulsen (*counts per minute, cpm*) ermittelt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Zeitpunkten bzw. den Patienten zu erreichen, wurde ein Stimulationsindex (SI) ermittelt. Dieser errechnet sich aus dem Verhältnis spezifisch stimulierter und unstimulierter Zellen: SI = cpm Bet v 1-stimulierter Zellen / cpm unstimulierter Zellen

### 2.3.10 *Enzyme-linked Immunospot* (ELISPOT) *Assay*

Entwickelt wurde der *enzyme-linked immunospot assay* (ELISPOT) 1983 zum Nachweis Antikörper-produzierender B-Zellen [Czerkinsky 1983]. Mit Hilfe von Weiterentwicklungen konnte 1988 diese Methode bereits zur Erfassung einzelner Zytokin-sezernierender Zellen aus dem peripheren Blut eingesetzt werden [Czerkinsky 1988]. Mittlerweile wird das Verfahren auch zur Diagnostik atopischer Erkrankungen und zur Verlaufskontrolle z.B. bei SIT eingesetzt [Gabrielsson 2001, Lindemann 2003].

Der ELISPOT dient bei dieser Arbeit zum Nachweis allergenspezifischer T-Zellen über die von ihnen produzierten und sezernierten Zytokine. Die Methode des ELISPOT stellt eine Modifikation des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dar. Mittels ELISA können nur quantitative Angaben zu der sezernierten Zytokinmenge gemacht werden, wohingegen der ELISPOT einen Nachweis auf Einzelzellebene bietet.

Praktisch wird dies erreicht, indem die verwendeten 96-Kavitäten-ELISPOT-Nitrocellulose-Platten über Nacht mit monoklonalen Antikörpern gegen ein spezifisches zu detektierendes Zytokin beschichtet werden (vgl. Abb. 8). Ungebundene Antikörper werden am folgenden Tag mittels eines Waschschrittes entfernt. Die zu untersuchenden Zellen werden direkt auf der Platte mit dem entsprechenden Antigenen stimuliert und somit zur Zytokinproduktion angeregt. Als Negativkontrollen dienen Zellen ohne

Antigenstimulus und als Positivkontrolle bspw. PHA-stimulierte PBMC. Um eine ausreichende Zytokinproduktion sicherzustellen wird eine Inkubationszeit von 6 bis 48 Stunden in der Literatur beschrieben. Die von einer Zelle produzierten Zytokine können an die Antikörper am Boden der Platte in der unmittelbaren Umgebung binden und dadurch die Zellen einzeln detektiert werden. Nach der Inkubation werden die zellulären Bestandteile entfernt. Die gebundenen Zytokine werden mit einem zweiten Enzym-gekoppelten Anti-Zytokin-Antikörper markiert. Durch Zugabe des Enzymsubstrates können diese Komplexe durch spezielle Farbreaktionen sichtbar gemacht werden. Jedes durch diese Reaktion sichtbar gewordene Farbareal (*spot*) repräsentiert ein Gebiet, innerhalb dessen eine T-Zelle Zytokine produziert hat, d.h. jeder einzelne *spot* entspricht einer T-Zelle.

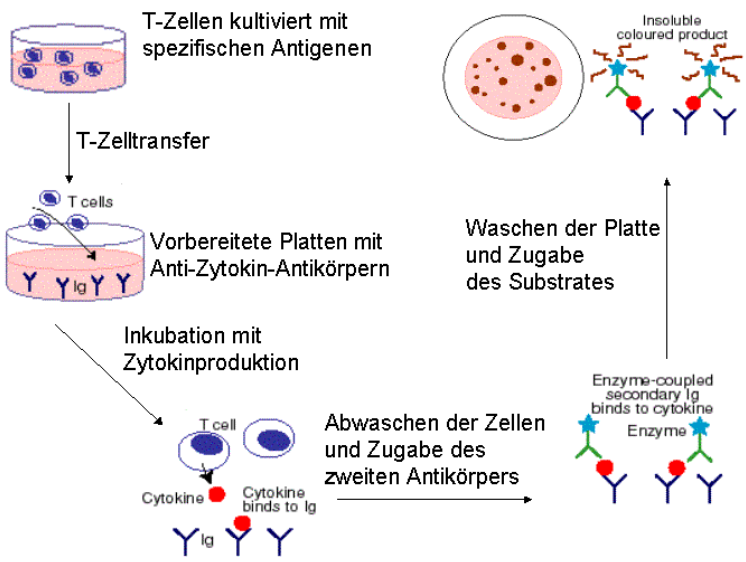


Abb. 8: Prinzip des *Enzyme-linked Immunospot* (ELISPOT) *Assay*.
Ig: Immunglobulin
[modifiziert nach Julian K. Hickling]

**Praktische Durchführung**

**Tag 1**

Für die Durchführung des ELISPOT wurden eingefrorene PBMC im Wasserbad bei 37℃ aufgetaut. Diese wurden tröpfchenweise in 4℃ kaltes RPMI $^{++}$ überführt, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Anschließend folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 1300rpm bei 4℃. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer Konzentration von $10^6$ Zellen/ml in RPMI$^{++}$ mit

10% PHS resuspendiert. Die Zellen der Zellsuspension wurden nach der Trypanblau-Methode quantifiziert (vgl. Kap. 2.3.5). Der erste Ansatz blieb dabei unstimuliert, während die anderen beiden Ansätze mit jeweils 10µg/ml Bet v 1 stimuliert wurden. Anschließend wurde die Platte für zwei Tage bei 37℃ und 5% $CO_2$ im Brutschrank inkubiert.

**Tag 3**

Um eine Expansion Bet v 1-spezifischer T-Zellen zu erreichen, wurden diese an Tag 3 mit IL-2 und IL-7 versetzt. IL-2 induziert ein Zellwachstum bereits aktivierter Zellen, während IL-7 eine antiapoptotische Wirkung besitzt.

**Tag 7**

Am siebten Tag wurden die ELISPOT-Platten mit den entsprechenden Capture Antibodies benetzt. Dafür wurden die Capture Antibodies für IL-5, IL-10 und IFN-γ jeweils nach Herstellerangaben 1:200 mit sterilem PBS verdünnt. Pro Kavität der ELISPOT-Platte wurde 100 µl des verdünnten Capture Antibody vorgelegt und über Nacht bei 4℃ inkubiert.

**Tag 8**

Der Capture Antibody wurde von den Platten entfernt und jede Kavität mit 200µl Blocking Solution ($RPMI^{++}$ mit 10% FCS) gewaschen. Anschließend wurde die Platten mit 200µl Blocking Solution pro Kavität für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die inkubierten Zellen wurden in $RPMI^{++}$ aufgenommen und für 8 min bei 1200rpm und 4℃ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 2x $10^6$/ml $RPMI^{++}$ + 10% PHS eingestellt.

Die Blocking Solution in den ELISPOT-Platten wurde verworfen und je 100 µl der folgenden Medien vorgelegt:

- $RPMI^{++}$ mit 10% PHS (unstimuliert)
- $RPMI^{++}$ mit 10% PHS + 20µg/ml Bet v 1 (Restimulation mit Betv1)
- $RPMI^{++}$ mit 10% PHS + 2% PHA (Restimulation mit PHA)

Anschließend wurde in die entsprechenden Kavitäten je 100µl Zellsuspension hinzugetropft. Es folgte eine weitere Inkubationsphase von 20 h im Brutschrank bei 37℃ und 5% $CO_2$.

**Tag 9**

Nach der 20 h Inkubation wurden die Zellen verworfen und die Platten danach zweimal mit Millipore-Wasser (200µl pro Kavität) bei jeweils vier Minuten Einwirkzeit gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Platten dreimal mit 200µl pro Kavität Waschpuffer 1 (vgl. Kap. 2.2.7) gewaschen. In jede Kavität wurde danach 100µl des verdünnten Detection Antibody (1:250; mit PBS + 10% FCS) pipettiert und die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach Ende der Inkubationszeit folgten erneut drei Waschschritte mit Waschpuffer 1 (100µl pro Kavität) und 1 ½ Minuten Einwirkzeit. Es folgte das Verdünnen der Enzyme Conjugate-Stocklösung mit Dilution Buffer (1:100). Von dieser verdünnten Lösung wurden 100µl pro Kavität auf die Platte gegeben und wiederum für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die Platten viermal mit Waschpuffer 1 (200µl pro Kavität) und 1 ½ Minuten Einwirkzeit gewaschen. Danach folgten noch 2 Waschschritte mit Waschpuffer 2 (200µl pro Kavität). Als letzter Schritt wurde 500µl Aminoethylcarbazol-Stocklösung mit 15ml 0,1M Acetat-Lösung und 7,5µl 30% $H_2O_2$ angesetzt. Von dieser wurde 100µl pro Kavität auf die Platten gegeben. Daraufhin konnte die Ausbildung von Spots beobachtet werden, wobei die Platten auf Grund der Lichtempfindlichkeit des sich entwickelnden Farbstoffs im Dunkeln stehen sollten. Um eine Überentwicklung zu vermeiden, wurde die Entwicklung der Platten bei ausreichender Farbintensität bzw. spätestens nach 40 Minuten mit 200µl pro Kavität Millipore-Wasser abgestoppt. Alle Membranen wurden mit 200µl Millipore-Wasser nachgewaschen und anschließend nach Entfernung des Bodens der Platte im Dunkeln über Nacht trocknen gelassen.

**Tag 10**

Am zehnten Tag fand das Einlesen der Platten in den Computer sowie die Auswertung mittels der Software Eli.Analyse® V 4.2 statt.

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Fragebögen

### 3.1.1 Klinischer Score A

Der subjektive Verlauf des Schweregrads der allergischen Erkrankung eines jeweiligen Patienten im Verlauf über zwölf Monate unter SIT wird in Abb. 9 wiedergegeben. Zum Vergleich wurde der Zeitpunkt M-6 hinzugezogen, der den individuellen Schweregrad der Allergie innerhalb der letzten Birkenpollensaison vor Therapiebeginn angibt. Dadurch ergibt sich zwischen den Untersuchungen M-6 und M6 der Vergleich zweier aufeinander folgender Birkenpollensaisons. Hierbei zeigt sich in der subjektiven Einschätzung ein Rückgang der allergischen Symptome von „deutlich krank“ zu „nur leicht krank“ (vgl. Abb. 9). Hervorzuheben ist, dass kein Proband eine Zunahme des Schweregrads seiner allergischen Erkrankung angab.

Auf Grund von vergessenen Terminen oder erst später begonnener Therapie konnten nicht für alle Patienten Werte an allen Messzeitpunkten erfasst werden. Dadurch ist eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich. Darüber hinaus kann bei der kleinen Probandenzahl ohnehin nur eine Aussage über die Tendenz der beobachteten Entwicklung gemacht werden.

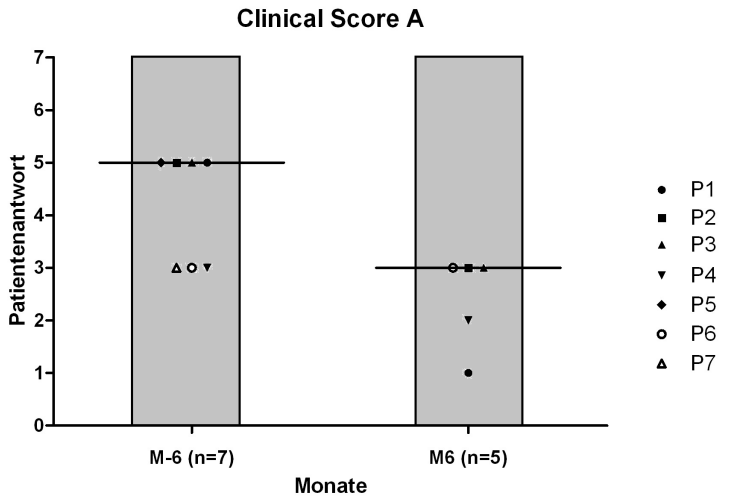


Abb. 9: Ergebnisse des Klinischen Score A, subjektive Einschätzung des aktuellen Schweregrades der allergischen Erkrankung.
Die grau hinterlegten Boxen symbolisieren die Messwerte innerhalb einer Birkenpollensaison.
–: Median

Die Angaben zu den Zeitpunkten M1 und M3, die außerhalb der Birkenpollen-Saison liegen, sind erwartungsgemäß niedriger als innerhalb der Saison (M-6).

### 3.1.2 Medikamentenscore

Der Medikamentenscore dient der Verlaufsbeobachtung der benötigten symptomatischen Medikation der Patienten unter der SIT. Der Wert zum Zeitpunkt M-6 wurde mit 0 („unverändert“) festgelegt. Da es sich bei der Birkenpollenallergie um eine saisonale Erkrankung handelt, entsprechen die Werte M0, M3 und M12 der Zeit außerhalb der Saison, zu der die Patienten keine Medikamente benötigt haben. Die Werte zum Befragungszeitpunkt M6 zeigen, dass sich bei den meisten Patienten der Medikamentenverbrauch im Vergleich zur letzten Birkenpollensaison nicht verändert hat.

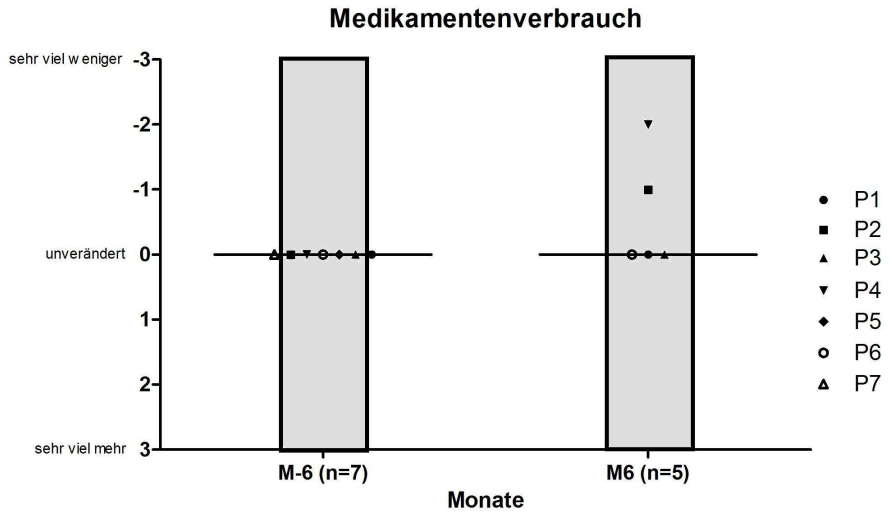


Abb. 10: Ergebnisse des Medikamentenscores innerhalb der Birkenpollensaisons.
–: Median

## 3.2 Pricktest

Vor Beginn der Therapie zeigt sich im Pricktest bei der einen Hälfte der Patienten eine stärkere Reaktion auf die Birkenpollen-Lösung zeigt, während die andere Hälfte im Test sehr schwach reagiert. Nach zwölf Monaten weisen alle Patienten einheitlich eine schwache Reaktion auf das Birkenpollenextrakt

auf. Damit zeigen nach einem Jahr die Patienten mit einer anfangs stärkeren Reaktion eine klinische Verbesserung, während Patienten, die schon zu Therapiebeginn nur eine sehr schwache Reaktion gezeigt haben, keine verminderte Hautreaktion nach Allergenapplikation aufweisen.
Insgesamt zeigten sich die Hautreaktionen dennoch bereits vor Therapiebeginn als gering ausgeprägt.

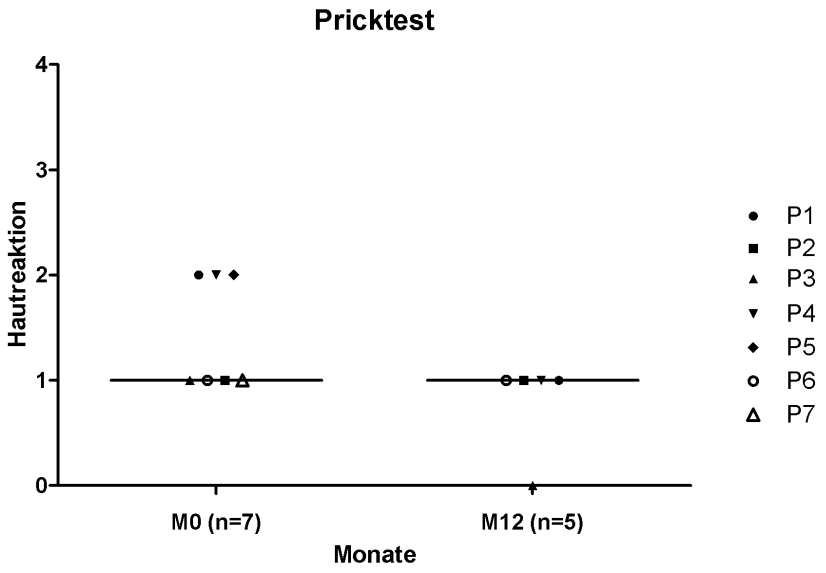


Abb. 11: Ergebnisse des Pricktests.
–: Median

## 3.3 Immunglobulin-Messung

Zu den wichtigsten Parametern der Allergie-Diagnostik zählt die Bestimmung von Immunglobulinen, wobei erhöhte Spiegel von allergenspezifischem IgE bei diesen Beobachtungen im Vordergrund stehen. In vielen vorangegangenen Studien konnten charakteristische Veränderungen der Immunglobuline im Verlauf einer SIT beobachtet werden und wurden sogar als Parameter für den Therapieerfolg herangezogen (vgl. Kap. 1.7.2).

### 3.3.1 Birkenpollen-spezifisches Immunglobulin E

Die Bestimmung des Birkenpollen-spezifischen IgE ergibt einen tendenziellen Abfall der Werte über den Verlauf des ersten Therapiejahres. Auffällig zeigen

sich die extrem hohen Birkenpollen-spezifischen IgE-Werte des Patienten 6, welche auch im Therapieverlauf oberhalb der Nachweisgrenze bleiben.

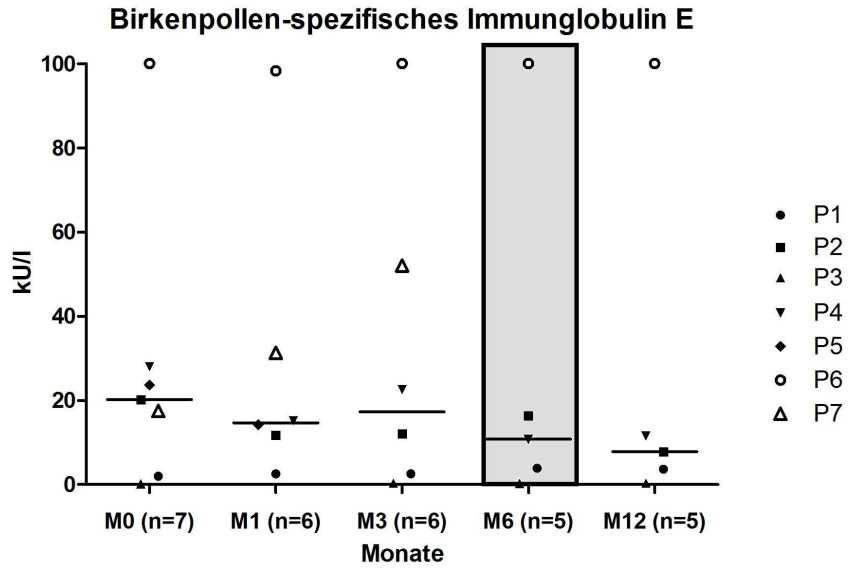


Abb. 12: Ergebnisse der Messung des Birkenpollen-spezifischen Immunglobulin E (in kU/l).
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

### 3.3.2 Bet v 1-spezifisches Immunglobulin E

Bei der Bestimmung des Bet v 1-spezifischen IgE finden sich mit der Birkenpollen-spezifischen IgE-Messung vergleichbare Werte, d.h. das Birkenpollen-spezifische IgE der Patienten ergibt sich fast ausschließlich aus Bet v 1-spezifischem IgE. Aus der Messung kann entnommen werden, dass auch diese IgE-Werte während der SIT über das Jahr leicht abfallend sind.

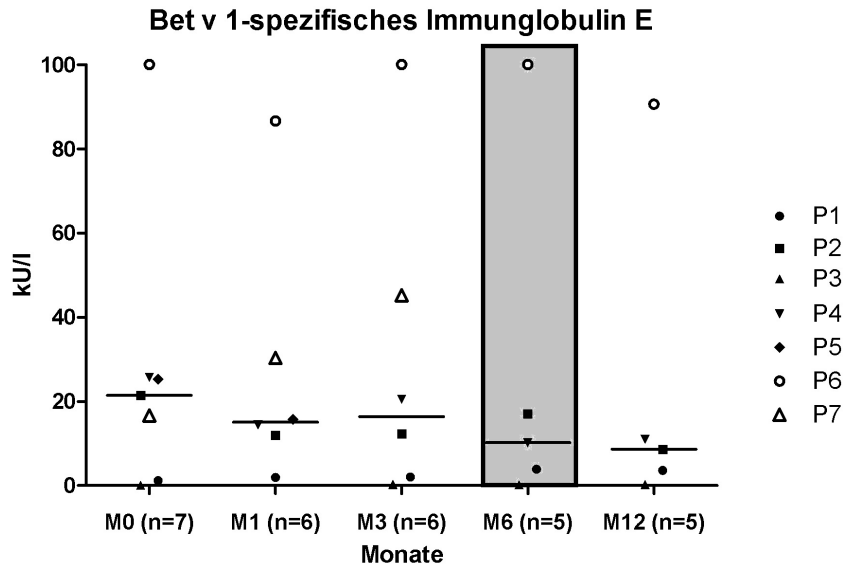


Abb. 13: Ergebnisse der Messung des Bet v 1-spezifischen Immunglobulin E (in kU/l).
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

### 3.3.3 Gesamt-Immunglobulin E

Die Bestimmung des Gesamt-IgE ist ein sehr häufiger Bestandteil der Allergie-Diagnostik. Erhöhte IgE-Werte belegen dabei aber weder eine Allergie, noch kann bei niedrigen Werten eine Allergie ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 10). Dennoch lassen sich die Messwerte von spezifischem IgE besser interpretieren, wenn der Spiegel des Gesamt-IgE bekannt ist.

Tab. 10: Beurteilung der Aussagekraft des Gesamt-Immunglobulin E-Spiegels.

| Gesamt-IgE-Spiegel | Beurteilung |
|---|---|
| < 20kU/l | Allergie unwahrscheinlich |
| 20 – 100kU/l | Allergie möglich |
| > 100kU/l | Allergie wahrscheinlich |

Ig: Immunglobulin

Bei der Bestimmung des Gesamt-IgE über den Therapieverlauf zeigt sich in dieser Studie ein sehr stabiler Verlauf (vgl. Abb. 14). Auffällig ist allein, dass nur drei der an der Patienten, die an der Studie teilgenommen haben, stark erhöhte Gesamt-IgE-Werte zu Therapiebeginn aufweisen, so wie Patient 6, der nicht nur das am stärksten erhöhte spezifische sondern auch Gesamt-IgE aufweist

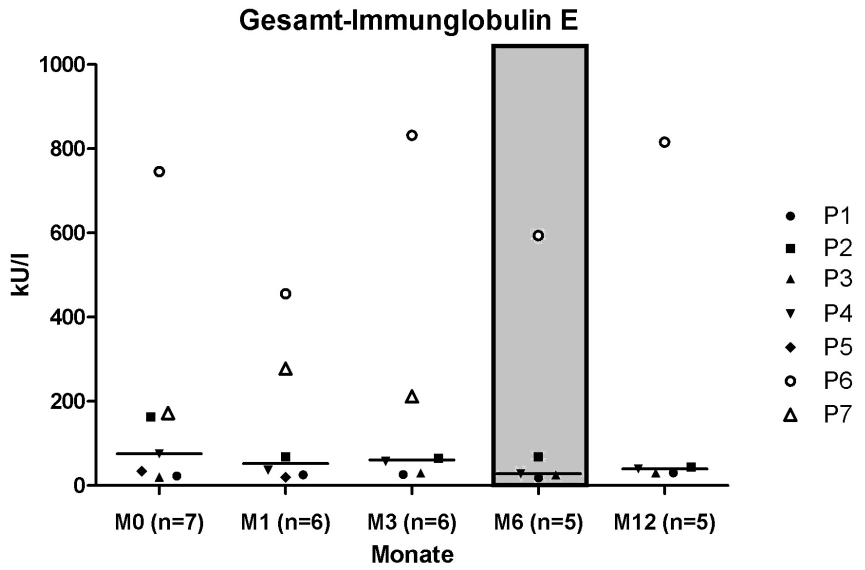


Abb. 14: Ergebnisse der Messung des Gesamt-Immunglobulin E (in kU/l).
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

### 3.3.4 Birkenpollen-spezifisches Immunglobulin G4

In vorangegangenen Studien hatten sich unter konventioneller SIT Anstiege der IgG4-Antikörper verzeichnen lassen [Djurup 1985, Urbanek 1986]. Um diesen Effekt auch unter Therapie mit Allergoiden zu untersuchen, wurden diese Antikörper unter Therapie ebenfalls bestimmt. Dabei zeigen sich keine Effekte der Immuntherapie auf den IgG4-Antikörper-Spiegel der Patienten (vgl. Abb. 15). Ausgehend von den von Schauer et al. veröffentlichten Normalwerten für IgG4 bei Erwachsenen von 0,052 – 1,250g/l [Schauer 2003] fällt auf, dass der Median während der gesamten beobachteten Therapiezeit innerhalb des Referenzbereiches bleibt. Auffällig ist allein ein starker saisonalen Anstieg des IgG4 von Patient P1.

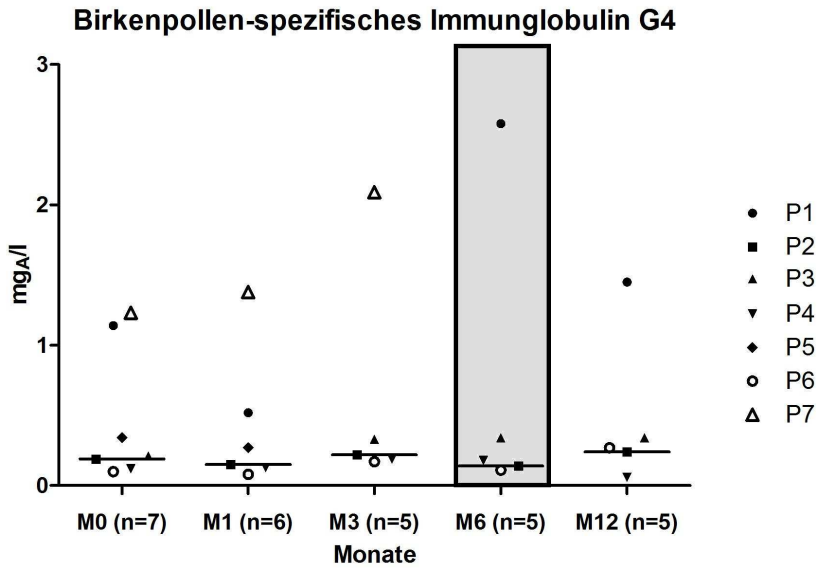


Abb. 15: Ergebnisse der Messung des Birkenpollen-spezifischen Immunglobulin G4 (in $mg_A/l$).
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

### 3.3.5 Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnis

Um die bei den Messungen des spezifischen IgE und IgG4 erzielten Werte besser beurteilen zu können, wird das Verhältnis der Einzelergebnisse zu den untersuchten Zeitpunkten gebildet. Dadurch werden potentielle quantitative Veränderungen der beiden Antikörperklassen zueinander deutlicher hervorgehoben.

Das Verhältnis von Bet v 1-spezifischem IgE zu IgG4 zeigt sich im Therapieverlauf relativ konstant. Das bedeutet, dass es zu keiner relevanten Zunahme von Betv1-spezifischem IgG4 im Vergleich zum IgE kommt.

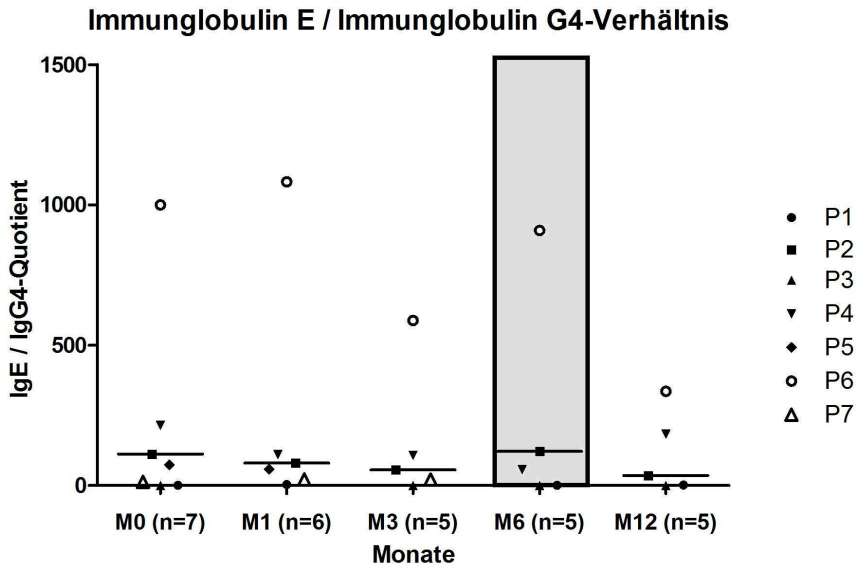


Abb. 16: Ergebnisse der Berechnung des Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnisses.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

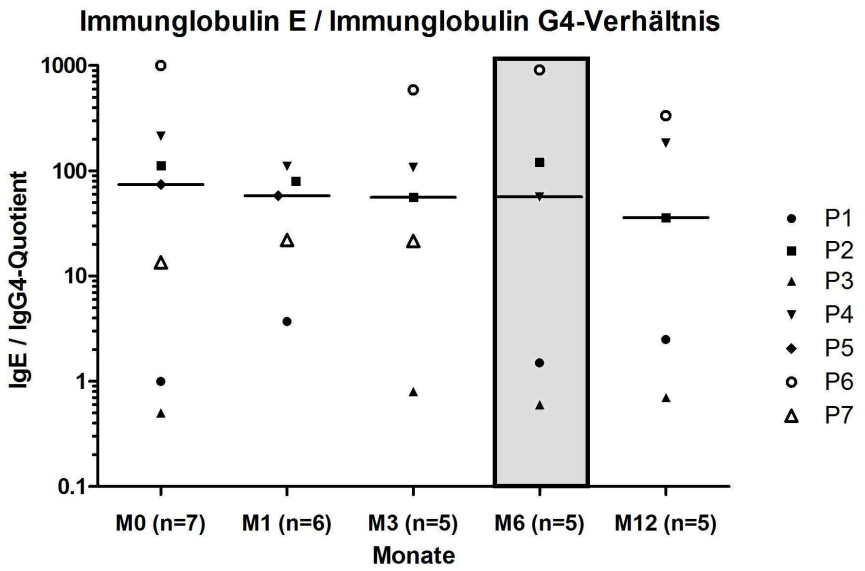


Abb. 17: Ergebnisse der Berechnung des Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnisses in logarithmischer Darstellung.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

## 3.4 T-Zell-Analytik

### 3.4.1 Durchflusszytometrie

Ziel der Durchflusszytometrie ist die Identifikation der Foxp3$^+$Treg im Verlauf der SIT und die Bestimmung ihres Anteils an peripheren CD4$^+$-Zellen. Dies erfolgt, wie in Kap. 2.3.7 bereits geschildert, über die Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127. Wie aus Abb. 18 zu entnehmen ist, zeigt sich im Verlauf der einjährigen Therapiephase ein fast gleichbleibender prozentualer Anteil von CD4$^+$CD25$^+$CD127$^{low}$ Treg.

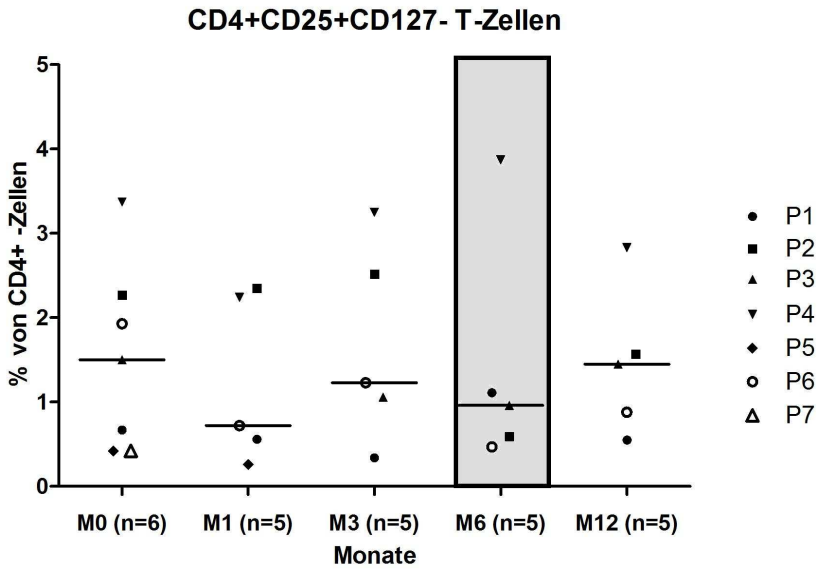


Abb. 18: Ergebnisse der Durchflusszytometrie (angegeben als prozentualer Anteil der CD4$^+$CD25$^+$CD127$^{low}$-Zellen an allen CD4$^+$-Zellen).
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median

### 3.4.2 Proliferationsassay

Die Proliferation der PBMC wurde durch die Messung der [3H]-Thymidininkorporation in die DNA sich teilender Zellen ermittelt. Die höchsten Werte ergaben sich in den mit PHA und IL-2 stimulierten Positivkontrollen.

In dieser Arbeit wurde der Stimulationsindex berechnet (vgl. Kap 2.3.9), um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungszeitpunkte und

Patienten zu erhalten. Ein Wert des Stimulationsindex von unter 1 bedeutet, dass eine Aktivierung der PBMC mit Bet v 1 zu einer geringeren Stimulation führt als keine Stimulation (Negativkontrolle). Dies würde bedeuten, dass der Kontakt mit Bet v 1 dann zu einer Hemmung der Zellproliferation geführt hat. Ein Stimulationsindex größer 1 zeigt dagegen das Bet v 1 eine vermehrte Zellproliferation bewirkte.

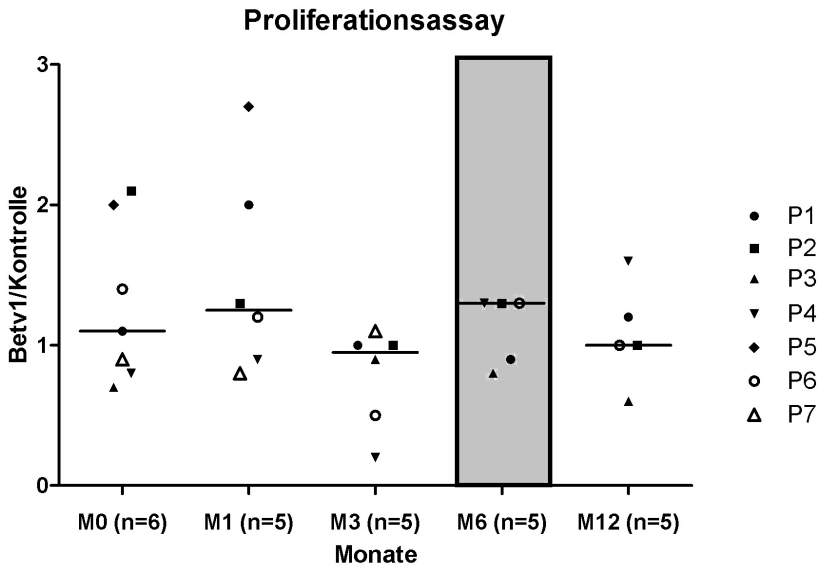


Abb. 19: Ergebnisse des Proliferationsassays, Übersicht über die Stimulationsindices.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb einer Birkenpollensaison.
–: Median

### 3.4.3 *Enzyme-linked immunospot assay* (ELISPOT)

#### 3.4.3.1 Interleukin 5-sezernierende Zellen

IL-5 gehört zu den typischen Th2-Zytokinen. Methodisch erfolgte die Messung wie in Kap. 2.3.9 geschildert. Ziel der Bestimmung von IL-5 produzierenden Zellen mittels ELISPOT ist somit die Beobachtung der Th2-Zellfrequenzen unter der SIT. Auch andere PBMC als Th2-Zellen produzieren IL-5, wie Versuche mit CD4+ depletierten PBMC zeigten, stellt dies jedoch nur eine sehr geringe Menge dar [Möbs 2010]. Darüber hinaus wurden diese Zellen unter T-Zell-propagierenden Kulturbedingungen gehalten.

Wie aus der Abb. 20 entnommen werden kann, zeigt sich zu Beginn der Therapie (M1) ein leichter Anstieg der Betv1-spezifischen Th2-Zellfrequenzen,

der bis zu M6, also der Birkenpollensaison, allerdings wieder auf den Ausgangswerte fällt. Die Werte zu den Zeitpunkten M1 und M12 stellen das Maximum der beobachteten Werte dar, wobei zum Zeitpunkt M1 Extremwerte (P5 und P7) beobachtet werden können, welche im Verlauf nicht mehr vorkommen. Insgesamt sieht man nahezu keinen Unterschied in den Th2-Zellfrequenzen in der Birkenpollensaison (M6) im Vergleich zum Therapiebeginn außerhalb der Saison (M0).

Zu erwähnen ist jedoch, dass uns keine Vergleiche zu Th2-Frequenzen der Birkenpollensaison vor SIT vorliegen.

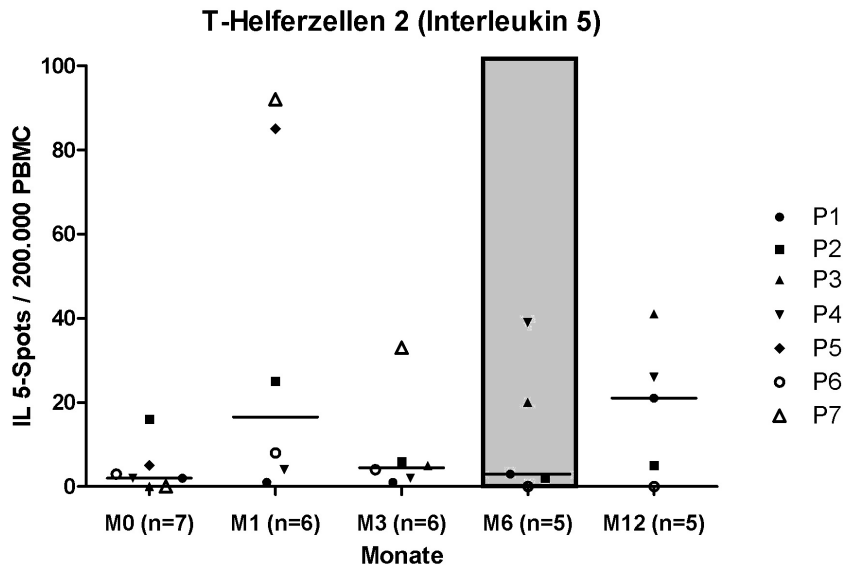


Abb. 20: Verlauf der Bet v 1-spezifischen T-Helfer 2-Zellfrequenzen unter spezifischer Immuntherapie. Die verglichenen Ergebnisse werden anhand des *enzyme-linked immunospot assays* (ELISPOT) für Interleukin 5 ermittelt.

Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.

–: Median, IL: Interleukin, PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*

### 3.4.3.2 Interleukin 10-sezernierende T-Zellen

IL-10 wird von vielen verschiedenen Zelltypen produziert, wobei Tr1-Zellen zu den Hauptproduzenten zählen. Uns dient es in dieser Versuchsreihe als Marker für allergenspezifische Tr1-Zellen, nachdem bereits durchgeführte Versuche den Einfluss anderer IL-10-produzierender Zeller untersucht haben [Möbs 2010]. So konnte gezeigt werden, dass unsere Messungen tatsächlich IL-10 von Tr1-Zellen nachweist [Möbs 2010].

In Verlauf der Therapie zeigt sich ein leichter Anstieg an Betv1-spezifischen Tr1-Zellen (vgl. Abb. 21). Ab dem Zeitpunkt M6 liegen tendenziell erhöhte Werte im Vergleich zu Therapiebeginn vor. Insgesamt scheinen 3 Patienten (P1, P2 und P4) auf die Therapie anzusprechen, während zwei weitere Patienten (P3 und P6) nicht zu reagieren scheinen.

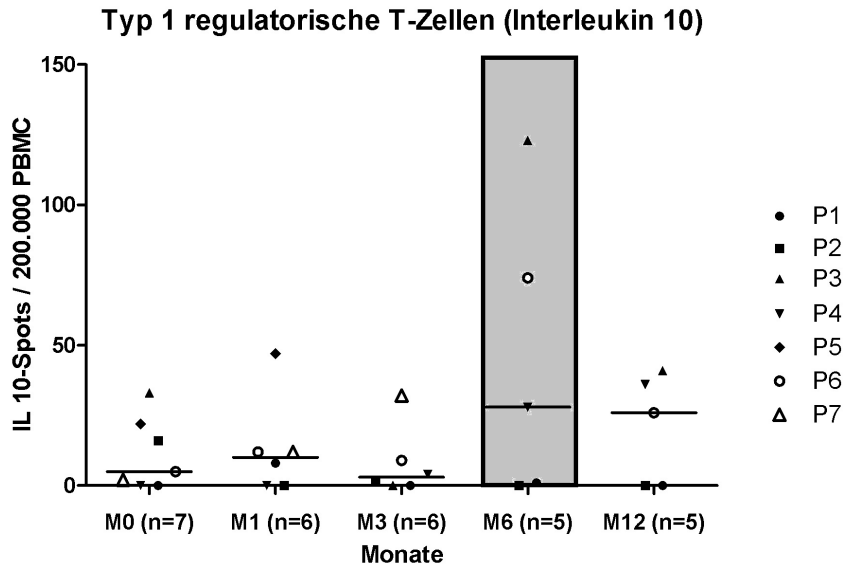


Abb. 21: Verlauf der Typ 1 regulatorischen T-Zellfrequenzen unter der spezifischen Immuntherapie anhand der Ergebnisse des *enzyme-linked immunospot assay* (ELISPOT) für Interleukin 10.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median, IL: Interleukin, PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*

### 3.4.3.3 Interferon γ-sezernierende Zellen

Bei IFN-γ handelt es sich um ein Th1-typisches Zytokin, welches zur Bestimmung der Th1-Zellfrequenzen über die Therapiedauer hinweg genutzt wird. Die Abb. 22 verdeutlicht den Rückgang der Th1-Zellfrequenzen innerhalb eines Jahres, dabei fällt besonders der starke Abfall innerhalb des ersten Monats der Therapie auf.

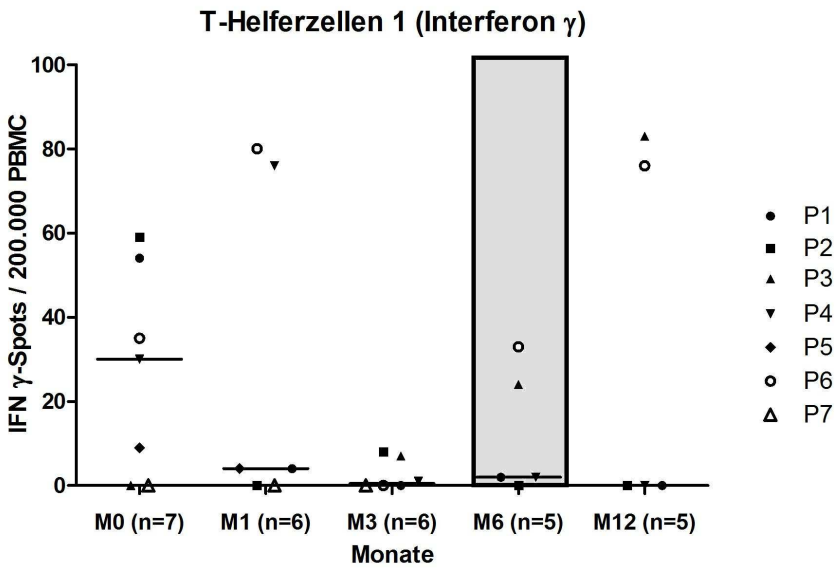


Abb. 22: Verlauf der T-Helfer 1-Zellfrequenzen unter der spezifischen Immuntherapie. Die vorliegenden Ergebnisse wurden anhand des *enzyme-linked immunospot assays* (ELISPOT) für Interferon γ ermittelt.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median, IFN: Interferon, PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*

### 3.4.3.4 T-Helfer 2 / T-Helfer 1 Zell-Verhältnis

Die Berechnung des Th2/Th1-Verhältnisses dient der Feststellung des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zellen, welches in der Literatur im Falle eines Wertes deutlich über eins als Zeichen eines gestörten Gleichgewichts der T-Helferzellen und als ausschlaggebender Faktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen gesehen wird [Deo 2010].

Für die hier beobachtete Patientengruppe zeigt sich interessanterweise ein Anstieg des Quotienten über die gesamte einjährige Beobachtungsperiode. Auffällig ist der sprunghafte aber nicht signifikante Anstieg bereits von M0 zu M1, wobei an M12 der Maximalwert erreicht wird (vgl. Abb. 23).

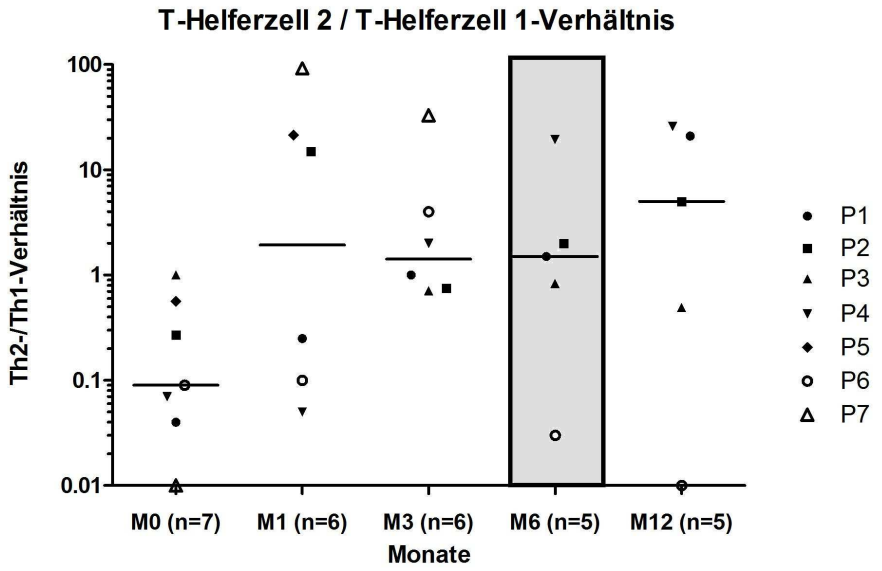


Abb. 23: Verlauf des T-Helfer 2 / T-Helfer 1-Zellverhältnisses unter der spezifischen Immuntherapie. Die vorliegenden Ergebnisse wurden anhand des *enzyme-linked immunospot assays* (ELISPOT) für Interleukin 5 und Interferon γ ermittelt.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median, Th: T-Helferzelle

### 3.4.3.5 T-Helfer 2 / Typ 1 regulatorische T-Zell-Verhältnis

Die Bestimmung des Th2/Tr1-Quotienten dient der Veranschaulichung der Verhältnisse zwischen Th2-Zellen und Tr1-Zellen, die beide einen entscheidenden Einfluss auf atopische Erkrankungen haben. Dabei begünstigt ein Ungleichgewicht zu Seiten der Th2-Zellen vermutlich eine atopische Diathese, wohingegen ein Überwiegen der Tr1-Zellen dieser entgegen wirken könnte.

Insgesamt zeigt sich bei der Auswertung der erhobenen Messwerte ein nicht signifikanter Anstieg des Quotienten während der frühen Therapiephase, der sich innerhalb der ersten sechs Monate allerdings wieder auf das Ausgangsniveau zurückbildet (vgl. Abb. 24).

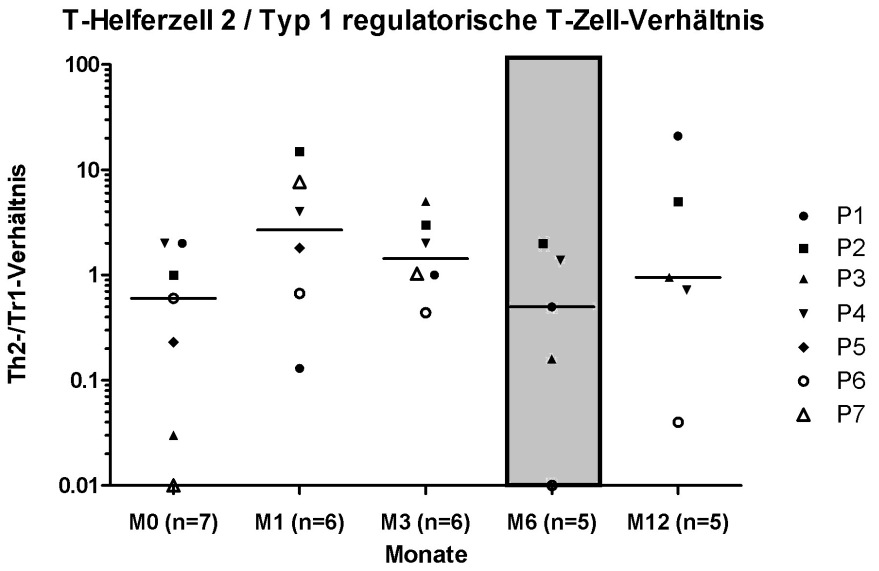


Abb. 24: Verlauf des T-Helfer 2 / Typ 1 regulatorische T-Zellverhältnisses unter der spezifischen Immuntherapie. Die vorliegenden Ergebnisse wurden anhand des *enzyme-linked immunospot assays* (ELISPOT) für Interleukin 5 und Interleukin 10.
Die grau hinterlegten Box symbolisiert die Messwerte innerhalb der Birkenpollensaison.
–: Median, Th: T-Helferzelle, Tr 1: Typ 1 regulatorische T-Zelle

# 4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung und nähere Charakterisierung der durch SIT mit Allergoiden induzierten immunologischen Veränderungen und ihre mögliche therapeutische Relevanz. Zusätzlich sollen die Befunde in den Kontext bisher publizierter Ergebnisse, insbesondere auch im Vergleich mit den bekannten immunologischen Veränderungen der konventionellen SCIT, eingeordnet werden. Bereits veröffentlichte Studien weisen bisher kontroverse Ergebnisse auf. So gibt es u.a. Hinweise auf eine verminderte Allergenität der Allergenoide, aber zum Teil auch von reduzierter Immunogenität im Vergleich zu intakten Allergenen [Lund 2007].

Während der SIT wurde der klinische Verlauf der an der Studie teilnehmenden Patienten regelmäßig mittels Fragebögen evaluiert und sowohl vor SIT-Beginn als auch nach einem Therapiejahr die Hautreaktivität nach Allergenapplikation im Pricktest getestet. Parallel dazu wurden an definierten Zeitpunkten allergenspezifische Antikörper sowie das Gesamt-IgE bestimmt. Zudem sollten mögliche durch die Therapie induzierte Veränderungen in Frequenzen der $Foxp3^+$ Treg und der allergenspezifischen Tr1-Zellen unter SIT untersucht werden. Darüber hinaus wurden der zeitliche Verlauf der Betv1-spezifischen Th-Zellsubpopulationen und das Verhältnis dieser zueinander evaluiert.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass es durch die angewandte Therapie mit Allergoiden zu einer leichten Verbesserung der klinischen Symptomatik, aber nicht zu einer nachweisbaren Induktion immunologischer Allergentoleranz gekommen ist. Aus der Literatur bekannte Parameter, die in Verbindung mit einer erfolgreichen konventionellen SIT stehen, ergaben während der Induktions- oder Aufrechterhaltungsphase der Therapie keine klaren Veränderungen, die in Zusammenhang mit einem positiven Therapieerfolg gebracht werden können.

## 4.1. Wirkmechanismen der Spezifischen Immuntherapie

Zu den genauen immunologischen Wirkmechanismen der Hyposensibilisierung existieren verschiedene Theorien. Zum einem wird angenommen, dass die SIT

eine Th1-Immunantwort zur Gegenregulation einleitet (vgl. Abb. 25). Durch vermehrte IL-12-Produktion von APC wird die IFN-γ-Produktion durch Th1-Zellen stimuliert. Auf diesem Wege kommt es zu einer Hemmung der Th2-Antwort und der Produktion von IgE durch aktivierte B-Zellen [Akdis 2000, Klein-Tebbe 2003].

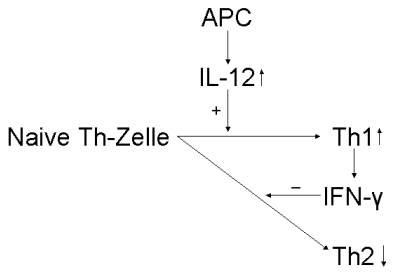


Abb. 25: Rolle der antigenpräsentierenden Zelle (APC) bei der spezifischen Immuntherapie.
IL: Interleukin, Th: T-Helferzelle, IFN: Interferon
[Akdis 1996, Akdis 2000, Klein-Tebbe 2003, Muller 1998, Segura 1998]

In einigen Studien wurde jedoch, ähnlich wie in dieser Arbeit auch eine Reduktion der Th1-Zytokine gemessen [Akdis 1996, Muller 1998, Segura 1998]. Eine andere Theorie geht daher von einer Treg-vermittelten Hemmung der Th2-Immunreaktion aus (vgl. Abb. 26). Hohe Allergenmengen begünstigen die Entwicklung von Treg, die zur Ausbildung einer immunologischen Toleranz führen. Demgegenüber bewirken geringe Allergenmengen eine Proliferation von Th2-Zellen (vgl. Kap. 1.4). Diese These wird gestützt durch Untersuchungen, die zeigen, dass nur eine ausreichend hohe Allergenkonzentration zum Erfolg einer SIT führt [Bohle 2007, De Blay 2007, Cox 2007]. Unter der SIT konnte eine gesteigerte Produktion der Zytokine TGF-β und IL-10 durch Treg nachgewiesen werden. Dadurch kommt es zu einem inhibitorischen Effekt auf die Th2-Zellen, denen eine Schlüsselrolle in der allergischen Pathogenese zukommt (vgl. Kap. 1.4) [Bellinghausen 1997, Klein-Tebbe 2003]. Die Freisetzung von IL-5 aus T-Zellen wird über IL-10 gehemmt und vermindert darüber die Proliferation von eosinophilen Granulozyten [Akdis 2000, Akdis 2004, Pierkes 1999]. Zudem hemmen erhöhte Konzentrationen von TGF-β und IL-10 die IgE-Produktion durch Plasmazellen und induzieren eine erhöhte Produktion von IgG4 und IgA [Akdis 2004, Blaser 1998]. Insgesamt kommt es

dadurch zu einer Schwächung der allergischen Reaktion [Akdis 2004, Van Neerven 1999]. Auch andere an der Typ-I-Reaktion beteiligte Zellen, wie basophile und eosinophile Granulozyten, werden über diese Zytokinproduktion supprimiert [Wilson 2001]. Radulovic et al. konnten eine positive Korrelation zwischen der klinischen Effektivität einer SIT und dem Anstieg $CD25^+Foxp3^+$ Treg in der nasalen Schleimhaut feststellen [Radulovic 2008].

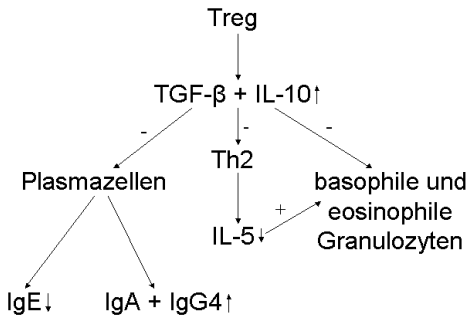


Abb. 26: Wirkung regulatorischer T-Zellen (Treg) bei der spezifischen Immuntherapie.
TGF: *transforming growth factor*, IL: Interleukin, Th: T-Helferzelle, Ig: Immunglobulin
[Akdis 2000, Akdis 2004, Bellinghausen 1997, Klein-Tebbe 2003, Pierkes 1999, Van Neerven 1999, Wilson 2001]

Blaser et al. postulieren, dass natürliche niedrige Allergenkonzentrationen zu einer Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper führen, wohingegen der Kontakt mit größeren Allergenmengen, wie z.B. im Rahmen einer SIT, zu einer protektiven Antikörperantwort führt [Blaser 1996]. Zusätzlich zu der Veränderung der Ig-Konzentrationen wurde in einigen Studien eine Veränderung der Epitopspezifität der Antikörper während der Hyposensibilisierung nachgewiesen [Michils 1998, Michils 2000]. Das vor der SIT bestehende veränderte Spektrum an Antikörper-Spezifitäten im Vergleich zu Gesunden könnte somit durch die Therapie zumindest partiell aufgehoben werden. Ob dies einer der entscheidenden Therapieschritte ist, konnte allerdings noch nicht belegt werden.

## 4.2 Klinische Parameter

Zur Erfassung der klinischen Wirksamkeit der Therapie wurden die an der Studie teilnehmenden Patienten mittels standardisierter Fragebögen zur körperlichen Symptomatik sowie dem Bedarf an symptomatischer Medikation befragt. Zudem wurde bei jedem Patienten vor Therapiebeginn und nach einem Jahr ein Pricktest durchgeführt. Insgesamt schätzten die Patienten ihre Erkrankung in der ersten Birkenpollen-Saison unter Therapie bereits als weniger ausgeprägt ein. Ein Medikamentenrückgang bezogen auf symptomatische Therapie der allergischen Symptome war im ersten Therapiejahr jedoch noch nicht zu verzeichnen. Mögliche Ursachen dafür sind die erst kurze Therapiedauer oder der ohnehin nur geringe Medikamentenbedarf der Patienten. Verschiedene bislang durchgeführte Studien konnten hingegen zeigen, dass unter einer SIT eine deutliche Medikamentenreduktion bereits in der ersten Pollensaison zu beobachten ist [Blumberga 2006, Ferreira 1993].

Die Ergebnisse des Pricktests zeigen nur bei der Hälfte der Patienten einen Rückgang der Reaktion, während die andere Hälfte der Patienten keine Veränderung aufweist. Offensichtlich haben nur Patienten mit zu Therapiebeginn stark ausgeprägter Reaktion auf den Pricktest eine Reduktion des Effektes erfahren. Demgegenüber scheinen Patienten mit bereits zu Therapiebeginn schwächer ausgeprägter Hautreaktion keine Verbesserung aufzuweisen.

Insgesamt zeigen die klinischen Parameter somit nach einem Jahr Therapie nur eine leicht positive Tendenz der Besserung, welche durch Fortführung der klinischen Überwachung gesichert werden sollte. Auffällig ist, dass die Patienten ihren Gesundheitszustand subjektiv als gebessert empfunden haben, sich dieser Effekt jedoch weder an der Medikamenteneinnahme noch durch den Pricktest in dieser Stärke nachvollziehen lässt.

Wichtig bei der Auswertung aller erhobenen klinischen Parameter ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass es sich bei der vorliegenden Untersuchung um keine placebokontrollierte verblindete Untersuchung handelt. Ziel der Studie war die Erhebung von Veränderungen immunologischer Parameter unter der SIT, wobei sich die klinischen Kenngrößen auf Grund der geringen

Patientenzahl und des Studiendesigns nicht uneingeschränkt mit den Veränderungen korrelieren lassen.

Bei der Erhebung von subjektiven Einschätzungen sollte daher immer der Placebo-Effekt mitberücksichtigt werden, wenngleich dieser deutlich geringer als die tatsächliche Medikamentenwirkung ausfällt [Calderon 2007]. Dadurch, dass die Patienten wissen, dass sie sich einer Therapie unterziehen, die ihnen von ihren behandelnden Ärzten empfohlen wurde, ist es möglich, dass es zu einer Überschätzung des klinischen Effekts kommt. Ebenso waren auch die teilnehmenden Ärzte und das Fachpersonal der durchführenden Klinik nicht gegenüber der angewandten Therapie verblindet. Der sich daraus möglicherweise ergebende Rosenthal-Effekt ist gekennzeichnet durch eine veränderte Wahrnehmung und beeinflusstes Verhalten durch die Erwartungen des Versuchsdurchführenden. Damit kann das Ergebnis unbewusst durch Suggestionseinflüsse oder auch Beurteilungsfehler in Richtung der Erwartung des Versuchsdurchführenden verfälscht werden. In der vorliegenden Studie sind die Versuchsdurchführenden die Mitarbeiter der allergologischen Ambulanz, die von einem positiven Effekt der SIT ausgehen könnten und dies auch dem Patienten wiederspiegeln würden.

## 4.3 Immunglobulinmessungen

### 4.3.1 Immunglobulin E-Messung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten für das Gesamt-IgE zwar eine große Varianz in den Ausgangswerten. Dennoch ergibt sich sowohl bei Auswertung der Einzelverläufe als auch in der Gesamtbeurteilung kein Rückgang der Messwerte, was auf Grund des geringen Anteils von Birkenpollenspezifischem IgE am Gesamt-IgE auch nicht zu erwarten wäre. Ebenso fanden sich keine signifikanten Änderungen der fast identischen Kurvenverläufe von Birkenpollen-spezifischem und Bet v 1-spezifischem IgE, allerdings zeigte sich über den Zeitverlauf eine leicht abnehmende Tendenz.

Die Immunglobulinbestimmung spielt in der Diagnostik allergischer Erkrankungen eine zentrale Rolle. Im klinischen Alltag stehen dabei die Bestimmung des allergenspezifischen IgE sowie des Gesamt-IgE im

Vordergrund. In vielen vorangegangenen Studien konnten divergierende Veränderungen der Immunglobuline im Verlauf einer SIT beobachtet werden. Einige Studien propagieren, dass ein Abfall des spezifischen IgE, z.T. nach initialem Anstieg, eine positive Wirkung der SIT wiederspiegele [Akdis 1996, Durham 1998, Fennerty 1988, Jutel 1995, Kowalski 1998, Lerch 1998, Van Ree 1997]. Andere Studien hingegen beschreiben eine Zunahme allergenspezifischer IgE-Antikörper unter der Therapie [Antunez 2008, Muller 1998]. Gehlhar et al. konnten wie auch in dieser Studie eine eher gleichbleibende Konzentration allergenspezifischer IgE-Antikörper während einer SIT nachweisen, wobei sich gleichzeitig eine Verbesserung der klinischen Symptomatik zeigte [Gehlhar 1999]. Der IgE-Anstieg in der Pollensaison wurde durch eine SIT vermindert bzw. aufgehoben [Mothes 2003]. Bei Allergoiden wurde in einer Studien im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten ein Anstieg der IgE-Werte vergleichbar mit denen einer unbehandelten Vergleichspopulation [Hoiby 2010] gesehen. Eine abschließende Aussage über den Konzentrationsverlauf von spezifischem IgE unter einer SIT, insbesondere in Korrelation zu klinischen Effekt, lässt sich somit anhand der vorliegenden Daten nicht treffen. Somit scheint die Wirksamkeit der Hyposensibilisierung nicht allein anhand der spezifischen IgE-Antikörperkonzentrationen zu erklären zu sein.

### 4.3.2 Immunglobulin G4-Messung

Zur Klärung möglicher Mechanismen der SIT mit Allergoiden im Vergleich zur klassischen Immuntherapie wurden in dieser Studie zusätzlich Betv1-spezifische IgG4-Antikörper bestimmt. Nachdem ein Anstieg von Antikörpern der IgG4-Subklasse unter einer SIT bereits in diversen Arbeiten belegt werden konnte [Akdis 2004, Antunez 2008, Djurup 1985, Gallego 2010, Gehlhar 1999, Hoiby 2010, Jutel 2003, Keskin 2006, Meriney 1986, Van Neerven 1999, Urbanek 1986], zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchung kein entsprechender Therapieeffekt auf dieser Ebene. Ebenso blieb das IgE/IgG4-Verhältnis unbeeinflusst durch die SIT (vgl. Kap. 3.3.5).

Aus Untersuchungen ist bekannt, dass die Struktur des Antigens einen entscheidenden Einfluss auf die Induktion der IgG-Antwort hat [Aalberse 1993, Dormann 1998]. Eine veränderte Struktur der bei der SIT eingesetzten

Allergene könnte somit zu einem verringerten Effekt auf die IgG4-Bildung führen. Diese Strukturveränderung ist Grundlage der therapeutischen Idee einer Therapie mit Allergoiden. Durch die Zerstörung der räumlichen Struktur soll, wie bereits in der Einleitung beschrieben (vgl. Kap. 1.8.2), bei der Annahme einer erhaltenen Immunogenität eine reduzierte Allergenität bewirkt werden. Dies bedeutet einen Verlust der IgE-Bindung bei Erhalt der T-zellulären Reaktivität. Der vermutete verringerte Effekt auf die IgG4-Bildung durch die veränderte räumliche Konfiguration der Allergoide und die damit fehlende Erkennung durch B-Zellen konnte in verschiedenen humanen Studien nicht bestätigt werden [Corrigan 2005, Gallego 2010, Keskin 2006]. Es zeigte sich bereits im ersten Therapiejahr ein Anstieg der allergenspezifischen IgG4-Antikörper. Eine weitere Studie zur SIT mit Allergoiden bei Graspollenallergie zeige, dass der Anstieg von spezifischem IgG bzw. IgG4 im zweiten Therapiejahr nochmals deutlicher zunimmt als im ersten Jahr zu beobachten war [Rosewich 2010]. Allerdings hat sich in anderen murinen und humanen Studien der Effekt der Allergoide auf die IgG-Synthese zeigen lassen [Cosmi 2006, Henmar 2008, Wurtzen 2007]. Ein möglicher Grund könnte ein unterschiedliches Ausmaß der Konformationsänderung der jeweiligen Allergoide sein, das abhängig von der hierfür eingesatzen Substanz (Formaldehyd oder Glutaraldehyd) und der Expositionsdauer ist [Heydenreich 2012].

Das Verhältnis von IgE zu IgG4 scheint laut aktueller Studienlage einer der spezifischsten humoralen Parameter zur Beschreibung der Toleranzinduktion zu sein, wobei eine Abnahme mit der Verbesserung der klinischen Symptomatik korrelierte [Antunez 2008, Gallego 2010, Keskin 2006]. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich das Verhältnis von IgE zu IgG4 relativ konstant, was somit auch der nur marginalen klinischen Beschwerdeabnahme der untersuchten Patienten entspricht.

## 4.4 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg

Die Durchflusszytometrie dient der Bestimmung des Anteils $Foxp3^+$ Treg mittels Markierung der Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127. Ziel dieser

Untersuchung ist die Beobachtung eventuell induzierter Veränderungen in den Treg-Frequenzen bei Birkenpollenallergikern unter einer SIT mit Allergoiden.
CD127 korreliert neueren Studien zufolge invers mit dem für Treg typischen Foxp3, so dass die quantitative Erfassung des Oberflächenmarkers CD127 eine geeignete Alternative zur Bestimmung von Foxp3 darstellt [Liu 2006, Seddiki 2006]. Diese dadurch erfassten Treg setzen sich somit aus zwei Gruppen zusammen (vgl. Kap. 1.5): Natürliche $Foxp3^+$ Treg und peripher induzierte $Foxp3^+$ Treg [Fontenot 2003, Hori 2003]. $Fop3^+$ Treg vermitteln über direkten Zellkontakt mittels IL-2-Rezeptor (CD25) ihre hemmende Wirkung [Ko 2005, Takahashi 1998]. Diese Form der direkten Kontaktaufnahme unterscheidet sie grundlegend von Tr1-Zellen, welche über IL-10 agieren.
Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ergeben eine fast gleichbleibende Frequenz von Treg im Behandlungsverlauf. Studien zufolge wurde wiederholt unter SIT ein Anstieg der Treg beobachtet [Jutel 2003, Pereira-Santos 2008, Radulovic 2008]. Ebenso konnte eine Korrelation zwischen klinischem Therapieerfolg und Anstieg von Treg gefunden werden [Radulovic 2008]. Andere Untersuchungen zeigten diesen Effekt jedoch nicht [Grindebacke 2009, Möbs 2010]. Ebenso zeigten Studien keinen quantitativen Unterschied der Treg zwischen gesunden Kontrollpersonen und Birkenpollenallergikern [Bellinghausen 2003, Yamanaka 2009]. Unklar ist, ob diese beobachteten Unterschiede auf unterschiedliche Allergene, Therapieungleichheiten oder Abweichungen der labormedizinischen Bestimmung zurückzuführen sind. Möglicherweise ist auch nicht die zahlenmäßige Veränderung, sondern eher die qualitative Änderung von Zelleigenschaften die Wirkursache der SIT. Treg von Allergikern üben eine geringere Hemmung auf Th2-Zellen aus im Vergleich zu Treg von gesunden Kontrollpersonen [Ling 2004, Thunberg 2007]. Dieses zeigt sich innerhalb der Pollenflugsaison deutlich stärker ausgeprägt, wofür eine verminderte Effizienz der Wirkung von Treg ursächlich ist [Anderson 2009, Grindebacke 2009, Ling 2004]. Grindebacke et al. konnten jedoch keine durch eine SIT induzierten Unterschiede nachweisen [Grindebacke 2009], d.h. nach der Therapie zeigte sich die Th2-supprimierende Wirkung der $CD25^+$ Treg trotz erhöhter IL-10-Produktion nicht verbessert.

Denkbar ist auch, dass die in dieser Arbeit unbeeinflusste Frequenz von $Foxp3^+$ Treg als Zeichen eines fehlenden immunmodulatorischen Effekts der Allergoid-SIT auf regulatorische T-Zellen zu werten ist, wobei anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend zu klären ist, ob nicht erfaßte funktionelle statt quantitative Änderungen bedeutsam sind.

## 4.5 Bet v 1-spezifische T-Zell-Subsets

### 4.5.1 T-Zell-Proliferation

Der Proliferationsassay dient der Überprüfung einer generellen Stimulierbarkeit von PBMC mit Bet v 1 unter der SIT. Bei vorliegender Sensibilisierung kann von einer gesteigerten Proliferation im Vergleich zu gesunden Probanden ausgegangen werden [Stevens 1998, Von Baehr 2005]. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass eine Proliferation stärker ausfällt, wenn die untersuchten Zellen bereits durch exogenen Allergenkontakt in Wachstumsbereitschaft gebracht wurden. Dieser Allergenkontakt liegt im vorliegenden Fall der Birkenpollenallergie nur während eines kurzen Zeitfensters im Jahr, nämlich während der Pollenflugzeit (Messzeitpunkt M6), vor. Insgesamt fanden sich jedoch zu allen Zeitpunkten ähnliche Werte. Ausgehend von den erhobenen Werten der mitogenen Stimuli sowie der Negativkontrollen zeigte sich eine relativ gleichbleibende Stimulierbarkeit der PBMC und somit kein Anhalt für die Ausbildung einer prinzipiellen T-Zellanergie gegenüber Bet v 1 als Resultat der SIT.

T-Zellanergie bedeutet, dass eine Verringerung der antigenspezifischen Proliferation vorliegt [Schwartz 2003]. In verschiedenen Studien fanden sich Hinweise auf eine verminderte Proliferation allergenspezifischer Th-Zellen nach einer SIT [Ebner 1997, Pilette 2007]. Es wurde postuliert, dass diese durch Stimulation mit hohen Dosen des betreffenden Allergens, wie z.B. unter SIT, erreicht werden kann [Akdis 1996, Gardner 2004, Jutel 1995, O´Brien 1997, Till 1997]. Gardner beobachtete eine Anergie von Th2-Zellen unter klassischer SCIT mit nativen Allergen in vitro bei gleichzeitger Zunahme von IFN-$\gamma^+CD4^+$ T-Zellen.

Zur Überprüfung der allergenspezifischen Stimulierbarkeit einzelner T-Zellsubpopulationen wurden entsprechende Bet v 1-spezifischen Zytokin-basierte ELISPOT-Assays durchgeführt.

### 4.5.2 T-Helfer 2- Zellfrequenzen

Die Bestimmung IL5-produzierender T-Zellen, d.h. der Th2-Zell-Frequenzen, zeigte zu Beginn der Therapie (M1) einen leichten Anstieg, der dann jedoch wieder rückläufig war und auch zum Zeitpunkt des saisonalen Pollenflugs auf Höhe des Ausgangswertes lag. Eine erneute Zunahme fand sich am Ende der einjährigen Beobachtungsphase, die jedoch auch keine ausgeprägte Abweichung zum Ausgangswert zeigte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulierbarkeit der Th2-Zellen unter Allergoid-SIT prizipiell nicht verloren geht, also keine Anergie besteht, jedoch zur Zeit des Pollenflugs durchaus schwächer ausfällt, als es bei unbehandelten Birkenpollenallergikern zu erwarten wäre [Möbs 2010].

Studien zur Veränderung allergenspezifischer Th2-Zellen unter einer klassischen SIT zeigen, wie auch in dieser Arbeit, einen Anstieg der Th2-Zellen gegen Ende der Einleitungsphase, der sich vermutlich durch die Dosissteigerung unter Therapie erklären lässt [Benjaponpitak 1999, Moverare 1998]. Ebenfalls wurde vereinzelt ein weiterer Th2-Zellanstieg durch saisonale Pollenexposition beobachtet [Möbs 2010, Moverare 1998]. Dieser in der vorliegenden Arbeit ausbleibende Anstieg während des erhöhten Allergenkontakts in der Pollensaison könnte somit als klinische Besserung der Patienten unter Allergoidtherapie bei fehlender Ausbildung einer IgG4-Antwort gewertet werden.

Zwar zeigen andere SCIT-Studien, dass eine Besserung des klinischen Beschwerdebildes auch ohne begleitende Veränderungen der IL-5-Produktion erfolgen kann, sofern andere Toleranzmechanismen wirksam sind wie die Induktion von Tr1-Zellen oder allergen-spezifische IgG4-Antikörper [Möbs 2010, Moverare 2000, Till 1997], es liegen aber auch Untersuchungen vor, die einen klaren Zusammenhang zwischen Therapieeffektivität und Abfall der Th2-Zytokine postulieren [Benson 2000]. Ebenso zeigen Studien zur Veränderung von Th2-Zellfrequenzen unter Allergoid-SLIT divergierende Ergebnisse. Sowohl ein Abfall der Th2-Zellfrequenzen [Dormann 1998] als auch ausbleibende T-

Zellreaktionen [Klimek 1999] bei klinischer Beschwerdebesserung konnten unter der Therapie beobachtet werden.

Die Zusammenfassung aller bisherigen Studienergebnisse bei der konventionellen Immuntherapie lässt darauf schließen, dass allein die Beobachtung der Th2-Zellen keine abschließende Erklärung zum Mechanismus der Toleranzentstehung liefern kann, sondern diese auch im Verhältnis zu anderen T-Zellpopulationen (Tr1, Th1) beurteilt werden muss. Zudem muss beim Vergleich unterschiedlicher Studien beachtet werden, dass die Untersuchungszeitpunkte im Unterschied zu dieser Arbeit oft große Abstände aufweisen und nicht konsistent innerhalb bzw. außerhalb der Pollenflugsaisons gelegen haben. Wichtig ist weiterhin, dass wie bereits dargelegt ein deutlicher Unterschied der Pollenflugstärke sowie Pollenkonzentration zwischen verschiedenen Jahren beobachtet werden kann (vgl. Kap. 1.2) und dieser sich auch in den Frequenzen der stimulierten Zellen wiederspiegeln wird.

### 4.5.3 Typ 1 regulatorische T-Zellfrequenzen

Zahlreiche Studien zeigen Hinweise auf einen Einfluss von Treg auf die Ausbildung einer immunologischen Toleranzentwicklung. Besonders Tr1-Zellen wird hier eine besondere Rolle zugesprochen [Akdis 2011, Palomares 2010]. Allergenspezifische (wie z.B. Bet v 1-spezifische) Tr1-Zellen können über die Produktion von IL-10 die Proliferation von $CD4^+$-T-Zellen supprimieren [Akdis 1998, Akdis 1999, Groux 1996, Möbs 2010]. Die dadurch bewirkte Reduktion von typischen Th2-Zytokinen [Pilette 2007] unterstreicht die mögliche Bedeutung dieser Subpopulation an SIT-induzierter Immuntoleranz [Larche 2007, Möbs 2008, Wu 2007].

In der vorliegenden Arbeit kann insgesamt ein tendenzieller Anstieg der Tr1-Frequenzen unter der Therapie mit Allergoiden beobachten werden. Erkennbar ist, dass nach einem halben Jahr Therapie die individuellen Werte von drei Patienten höher als zu Therapiebeginn lagen. Diese verzögerte Entwicklung steht möglicherweise mit der geringeren Immunogenität von Allergoiden in Zusammenhang. Andere Gruppen hatten unter SIT mit nativen Allergenen einen signifikanten Anstieg allergenspezifischer Tr1-Zellen bereits während der Aufdosierungsphase beobachten können [Akdis 1998, Bohle 2007, Möbs 2010]. Allerdings zeigten Verlaufsstudien, dass die Tr1-Zunahme nur passager ist

[Bohle 2007, Möbs 2010, Moverare 2000]. Der vorübergehende initiale Tr1-Anstieg und die damit verbundene Hemmung peripherer Th2-Zellen könnte somit die zu Therapiebeginn noch vorherrschende allergische Immunantwort eindämmen und damit zu einer Besserung klinischer Symptome führen.
Studien zum Vergleich der Wirkung von nativen Allergenen und Allergoiden auf die Stimulation von T-Zellen zeigen, dass Allergoide eine reduzierte T-Zellstimulation aufweisen, da möglicherweise im Rahmen der Konformationsänderung unter Aldehydbehandlung auch T-Zellepitope verloren gehen [Kalinski 2003]. Interessanterweise war dieser ausbleibende Stimulationseffekt Patienten-abhängig, was sowohl die unterschiedlichen Tr1-Antworten der Patienten der hier vorliegenden Studie als auch die diviergierenden Resultate anderer Studien (Zunahme der IL-10-Transkription [Burastero 2009] bzw. keine Induktion von Tr1 [Hoiby 2010]) erklären könnte.
In einigen Studien wird der Th2/Tr1-Quotient zur Veranschaulichung des direkten Verhältnisses zwischen „Allergie-fördernden“ Th2-Zellen und „Toleranz-fördernden“ Tr1-Zellen gebildet. Insgesamt zeigt sich bei der Auswertung der ermittelten Messwerte ein gleichbleibendes Verhältnis über den gesamten Beobachtungszeitraum. Im Detail ergibt sich in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg des Quotienten an M1 auf Grund transient erhöhter Th2-Zellfrequenzen und danach ein zum Ausgangspunkt relativ unveränderter Quotient durch einen Anstieg von Tr1-Zellfrequenzen. Zum Zeitpunkt M1 kommt es zu einem Anstieg des Medians, der zu Zeiten der natürlichen Allergenexposition wieder auf Ausgangsniveau absinkt. Dieses spiegelt die, auch in den Einzelbetrachtungen der IL-5- und IL-10-Produktion gefundenen, geringen Auswirkungen der SIT auf zellulärer Ebene wieder.

### 4.5.4 T-Helfer 1-Zellfrequenzen

Th1-Zellen stellen im klassischen Allergiemodell den direkten Gegenspieler der allergischen Th2-Antwort dar. Angesichts dieser Vorstellung ist bei allergischen Erkrankungen mit einem verschobenen Th1/Th2-Gleichgewicht zu rechnen. Da das von Th1-Zellen produzierte IFN-γ über eine Reihe verschiedener Mechanismen die Th2-Antwort unterdrücken kann (beispielsweise durch Hemmung der Th2-Zelldifferenzierung und -rekrutierung [Elser 2002]), wird eine vermehrte Aktivierung dieser Zellen als ein Mechanismus der SIT diskutiert.

So beobachteten verschiedene Studiengruppen Veränderungen von Th1-Zell-Frequenzen unter einer klassischen SCIT mit nativen Allergenen [Durham 1996, Varney 1993]. Dabei zeigt sich ein starker Anstieg der IFN-γ-Produktion insbesondere während der Aufdosierungsphase [Akoum 1996, Jutel 1995, McHugh 1995]. Daten von Allergikern ohne SIT zeigen hingegen konstante IFN-γ-Werte mit zeitlich beschränkten Anstiegen während der Pollenflugsaison [Benson 2000, Wang 2009]. Bereits veröffentliche Studien zeigen, dass unter klassischer SIT, bei Bestimmung des Th2/Th1-Quotienten, eine Änderung des Immungleichgewichts zur Th1-Seite hin zu beobachten ist [Benjaponpitak 1999, Bohle 2007]. Im Gegensatz dazu wurde bei nicht behandelten Birkenpollenallergikern eine Verstärkung des Th2-Übergewichts während der Pollensaison beschrieben [Gabrielsson 1997]. Dennoch gibt es auch gegenteilige Meinungen: O´Brien et al. berichten über eine reduzierte IFN-γ-Antwort bei Patienten nach abgeschlossener SIT [O'Brien 1997].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen einen raschen Rückgang der Th1-Zell-Frequenzen innerhalb des ersten Therapiejahres mit besonders deutlichem Abfall während der Aufdosierungsphase. Das Th2/Th1-Verhältnis zeigt einen ähnlichen, genau inversen, Verlauf mit einem Anstieg im ersten Monat der SIT. Dieses zeigt, dass in der beobachteten Patientengruppe der durch die SIT angestrebte Umschwung einer dominierenden Th2-Antwort zu einem ausgewogenen Gleichgewicht nicht stattgefunden hat.

Für Allergoide wurde immer wieder neben der gewünschten Reduktion der Allergenität auch ein Abfall der Immunogenität durch Verlust von T-Zellepitopen diskutiert. Daraus ergab sich die Fragestellung, in wieweit eine T-Zellmodulation durch Allergoide überhaupt durchgeführt werden kann. T-Zellepitope sind HLA (*human leukocyte antigen*)-Typ-abhängig, wobei jedes Allergen von mehreren T-Zellepitopen erkannt wird. Um dieser Vielfalt gerecht zu werden, muss die Therapie aus sehr kurzen Allergenabschnitten mit mehrfach überschneidenden MHC-Bindungsmotiven bestehen [Janeway 2009]. Klimek konnte zeigen, dass ähnlich wie bei der konventiellen SIT mit nativen Allergenen auch eine Allergoid Therapie zu einem Anstieg der Th1-Zellfrequenzen führen kann [Klimek 1999]. Andere Studien zur T-Zellreaktivität unter Allergoid-SIT zeigten jedoch, dass Allergoide im Vergleich zu nativen Allergenen eine verminderte T-Zellstimulation zeigen [Kalinski 2003, Pfaar 2012]. Auch in murinen Studien

fand sich eine verringerte Immunogenität für Allergoide [Lund 2007, Wurtzen 2007].

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

Allergische Erkrankungen haben in den letzten Jahren in Industrie- sowie Entwicklungsländern kontinuierlich zugenommen. Die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich hauptsächlich auf symptomatische Therapieverfahren. Die einzige kurative Therapieform ist derzeit die spezifische Immuntherapie (SIT).

Verschiedene Applikationsschemata und Aufbereitungsformen von Allergenen sind im Handel erhältlich. Allergoide stellen dabei eine modifizierte Form von Allergenen dar und sollen sich durch reduzierte Allergenität bei erhaltener Immunogenität auszeichnen. Dadurch sei eine sicherere und schnellere Dosissteigerung im Vergleich zu unbehandelten Allergenen möglich.

Obwohl in den vergangenen Jahrzehnten die Grundlagenforschung zu Mechanismen der Allergieentstehung viele Fortschritte gemacht hat, ist der genaue Mechanismus einer durch SIT induzierten Immuntoleranz nicht endgültig geklärt. Besonders die Unterschiede der Immunmodulation durch Allergoide im Vergleich zu unbehandelten Allergenen ist noch zu klären. Möglicherweise sind die beobachteten klinischen Effekte der Allergoidtherapie durch andere Mechanismen als die der SIT mit nativen Allergenen zu erklären.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung immunologischer Grundlagen bei einer SIT mit Allergoiden (Depigoid®) von Birkenpollenallergikern über den Zeitraum des ersten Therapiejahres. Sieben Patienten mit klinisch wie auch immunologisch nachgewiesener Birkenpollenallergie konnten in die Studie eingeschlossen werden. Es wurden allergenspezifisches IgE, Gesamt-IgE und allergenspezifisches IgG4 mittels ImmunoCap gemessen. Parallel dazu erfolgte die Erfassung von Veränderungen der Frequenzen Bet v 1 (Hautallergen der Birke)-spezifischer Th1-, Th2- und Tr1-Zellen nach Allergenstimulation mittels ELISPOT. Als weitere Population regulatorischer T-Zellen (Treg) wurden $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ Treg mittels durchflusszytometrischer Messungen charakterisiert. Der Bestimmung einer veränderten Reaktionsbereitschaft nach Allergenkontakt diente die Erfassung der Proliferation von PBMC nach Betv1-Stimulation. Parallel zu den immunologischen Parametern wurde die klinische Effektivität mittels unterschiedlicher Fragebögen ermittelt und durch zwei im Jahresabstand durchgeführte Pricktests ergänzt.

Die Studienergebnisse zeigen eine marginale Verbesserung klinischer Beschwerden, wobei nur verschwindend geringe immunologische Veränderungen detektiert werden können. Die Messungen der Immunglobuline ergeben einen lediglich tendenziellen Abfall spezifischer IgE-Antikörper bei nahezu gleichbleibenden Werten für Gesamt-IgE und allergenspezifisches IgG4. Die Frequenzen für Betv1-spezifische Th2-Zellen weisen einen Anstieg im ersten Therapiemonat sowie am Ende des ersten Therapiejahres auf. Demgegenüber zeigt sich ein leichter Abfall von Th1-Zellen und somit ein Anstieg des Th2/Th1-Verhältnisses. Bei den Treg kann ein leichter Anstieg von Tr1-Zellen bei gleichbleibendem Anteil von $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$-Treg beobachtet werden.

Insgesamt sprechen die erhobenen Daten gegen eine Toleranzinduktion durch die Allergoidtherapie, so dass neben einer für Allergoide typischen Allergenitätsreduktion auch von einer Verringerung der Immunogenität ausgegangen werden muss. Alternativ könnten andere immunologische Mechanismen als die bei einer konventionellen SIT mit nativen Allergenen für die Toleranzinduktion unter einer SIT mit Allergoiden verantwortlich sein. Zu beachten ist bei diesen Hypothese, dass eine abschließende Klärung auf Grund der geringen Patientenzahl in dieser Studie nicht möglich ist. In Zukunft durchgeführte Studien mit höheren Patientenzahlen sollten daher die Frage nach den immunologischen Mechanismen einer SIT mit Allergoiden eingehender untersuchen.

# ABSTRACT

There is a continuous increase of allergic diseases in industrial countries as well as in developing countries. While most available therapies are constricted to symptomatic treatments, only the specific immunotherapy (SIT) can be considered as curative.

Different forms of allergens and modes of application are utilized. Allergoids are modified types of allergens. They should be characterized by a reduced allergenicity and received immunogenicity. Thereby a saver and faster escalation of the application rate in comparison to natural allergens should be possible.

Although fundamental research has progressed in the past decades elucidating the development of allergic diseases, the definite mechanism of how SIT induces immuntolerance is still a focus of intensive research.

The aim of this study was the exploration of immune alterations during the first-year SIT with an allergoid (Depigoid®) in birch-pollen allergic persons. Seven patients with birch-pollen allergy were included in this study. The clinical efficiency of SIT was evaluated by different questionnaires and skin tests. Allergen-specific IgE, total IgE and allergen-specific IgG4 was detected by ImmunoCap. In addidtion changes of the quantity of Bet v 1- (major-allergen of birch) specific Th1-, Th2- and Tr1-cells were detected by ELISPOT assay after allergenspecific-stimulation. Furthermore $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg were quantified by cytometric measurement and the proliferation of PBMC after stimulation with Bet v 1 measured.

While patients showed an improvement of their medical condition, there were only marginal immunologic changes detected. Immunglobulin measurements showed only a trend of decrease for allergenspecific IgE antibodies, but almost constant data for total IgE and allergen-specific IgG4. Counts for Bet v 1-specific cells showed an increase in the first month of therapy and at the end of the first therapy year. In contrast, a decrease of Th1-cells and consequently an increase of Th2/Th1-quotient could be detected. Tr1-measurements showed an increase of Tr1-cells, but no changes of the fraction of $CD4^+CD25^+CD127^{low}$-Treg.

In summary the present study suggest that in comparison to the results of SIT-studies with native allergens different immune mechanisms are responsible for tolerance induction through SIT with allergoid. Further studies with a greater number of subjects should help to elucidate these mechanisms in more detail.

# 6 TABELLENANHANG

Tab. 11: Ergebnisse der Messung des birkenpollenspezifischen Immunglobulin E (in kU/l).

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 1,97 | 2,55 | 2,56 | 3,92 | 3,66 |
| P2 | 20,2 | 11,7 | 12,1 | 16,4 | 7,84 |
| P3 | 0,13 | - | 0,33 | 0,28 | 0,29 |
| P4 | 28 | 15,2 | 22,6 | 10,8 | 11,6 |
| P5 | 23,6 | 14,2 | - | - | - |
| P6 | 100 | 98,3 | 100 | 100 | 100 |
| P7 | 17,5 | 31,3 | 52 | - | - |

Tab. 12: Ergebnisse der Messung des Bet v 1-spezifischen Immunglobulin E (in kU/l).

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 1,18 | 1,91 | 2,08 | 3,89 | 3,64 |
| P2 | 21,4 | 12 | 12,3 | 17 | 8,62 |
| P3 | 0,1 | - | 0,26 | 0,21 | 0,25 |
| P4 | 25,7 | 14,4 | 20,5 | 10,2 | 11 |
| P5 | 25,3 | 15,7 | - | - | - |
| P6 | 100 | 86,6 | 100 | 100 | 90,6 |
| P7 | 16,6 | 30,3 | 45,2 | - | - |

Tab. 13: Ergebnisse der Messung des Gesamt-Immunglobulin E (in kU/l).

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 | 22,9 | 25,6 | 26,5 | 18,1 | 30,1 |
| P2 | 164 | 68,4 | 65,3 | 69,3 | 44,6 |
| P3 | 20 | - | 29,7 | 25,1 | 30,2 |
| P4 | 75,5 | 36,6 | 57,4 | 28,1 | 39,8 |
| P5 | 34,4 | 19,1 | - | - | - |
| P6 | 746 | 456 | 832 | 594 | 816 |
| P7 | 172 | 278 | 212 | - | - |

Tab. 14: Ergebnisse der Messung des birkenpollenspezifischen Immunglobulin G4 (in $mg_A/l$).

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 1,14 | 0,52 | - | 2,58 | 1,45 |
| **P2** | 0,19 | 0,15 | 0,22 | 0,14 | 0,24 |
| **P3** | 0,21 | - | 0,33 | 0,34 | 0,34 |
| **P4** | 0,12 | 0,13 | 0,19 | 0,18 | 0,06 |
| **P5** | 0,34 | 0,27 | - | - | - |
| **P6** | 0,1 | 0,08 | 0,17 | 0,11 | 0,27 |
| **P7** | 1,23 | 1,38 | 2,09 | - | - |

Tab. 15: Ergebnisse der Berechnung des Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnisses.

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 1,0 | 3,7 | - | 1,5 | 2,5 |
| **P2** | 112,6 | 80,0 | 55,9 | 121,4 | 35,9 |
| **P3** | 0,5 | - | 0,8 | 0,6 | 0,7 |
| **P4** | 214,2 | 110,8 | 107,9 | 56,7 | 183,3 |
| **P5** | 74,4 | 58,1 | - | - | - |
| **P6** | 1000 | 1082,5 | 588,2 | 909,1 | 335,6 |
| **P7** | 13,5 | 22,0 | 21,6 | - | - |

Tab. 16: Ergebnisse des Pricktests.
Ø: keine Reaktion, +: minimale Reaktion bis ++++: maximale Reaktion

| | U0 | | | U12 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Histamin | NaCl | Birke | Histamin | NaCl | Birke |
| **P1** | ++ | Ø | ++ | ++ | Ø | + |
| **P2** | ++ | Ø | + | ++ | Ø | + |
| **P3** | ++ | Ø | + | Ø | Ø | Ø |
| **P4** | ++ | Ø | ++ | ++ | Ø | + |
| **P5** | ++ | Ø | ++ | - | - | - |
| **P6** | ++ | Ø | + | ++ | Ø | + |
| **P7** | + | Ø | + | - | - | - |

Tab. 17: Ergebnisse der Durchflusszytometrie (angegeben in prozentualem Anteil der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$-Zellen an allen $CD4^+$-Zellen).

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 0,67 | 0,56 | 0,34 | 1,11 | 0,55 |
| **P2** | 2,27 | 2,35 | 2,52 | 0,59 | 1,57 |
| **P3** | 1,5 | - | 1,06 | 0,96 | 1,45 |
| **P4** | 3,37 | 2,24 | 3,25 | 3,87 | 2,83 |
| **P5** | 0,42 | 0,26 | - | - | - |
| **P6** | 1,93 | 0,72 | 1,23 | 0,47 | 0,88 |
| **P7** | 0,42 | | | - | - |

Tab. 18: Ergebnisse des Proliferationsassays (in *counts per minute*).

| *Patient* | *Untersuchung* | *Kontrolle* | *Bet v 1* | *Tetanus* | *PHA* | IL-2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | M0 | 2582 | 2774 | 2390 | 23328 | 6559 |
| | M1 | 906 | 1848 | 5203 | 32315 | 20238 |
| | M3 | 69 | 66 | 125 | 28803 | 1260 |
| | M6 | 685 | 612 | 4356 | 11244 | 48394 |
| | M12 | 1343 | 1564 | 3010 | 28646 | 19207 |
| | | | | | | |
| **P2** | M0 | 682 | 1411 | 2029 | 4896 | 8502 |
| | M1 | 662 | 853 | 651 | 15075 | 1340 |
| | M3 | 128 | 122 | 245 | 2697 | 1367 |
| | M6 | 641 | 846 | 866 | 24276 | 3690 |
| | M12 | 4453 | 4446 | 2907 | 15837 | 8362 |
| | | | | | | |
| **P3** | M0 | 1195 | 799 | 7534 | 42356 | 8088 |
| | M3 | 369 | 347 | 6118 | 48733 | 24569 |
| | M6 | 1258 | 1034 | 21073 | 48445 | 17972 |
| | M12 | 3304 | 2109 | 13492 | 37857 | 13473 |

| *Patient* | *Untersuchung* | *Kontrolle* | *Bet v 1* | *Tetanus* | *PHA* | IL-2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **P4** | M0 | 1007 | 817 | 1406 | 27627 | 1731 |
| | M1 | 796 | 695 | 1520 | 32492 | 3632 |
| | M3 | 618 | 103 | 5802 | 17763 | 7840 |
| | M6 | 1205 | 1578 | 2015 | 42168 | 3137 |
| | M12 | 2101 | 3423 | 7109 | 16425 | 4763 |
| | | | | | | |
| **P5** | M0 | 4157 | 8284 | 5597 | 39938 | 16913 |
| | M1 | 1603 | 4372 | 4272 | 26806 | 7188 |
| | | | | | | |
| **P6** | M0 | 189 | 272 | 5520 | 23064 | 13543 |
| | M1 | 767 | 900 | 3521 | 23247 | 11953 |
| | M3 | 725 | 353 | 7666 | 34023 | 18395 |
| | M6 | 1793 | 2277 | 4973 | 19113 | 18092 |
| | M12 | 519 | 512 | 5746 | 27054 | 7884 |
| | | | | | | |
| **P7** | M0 | 1573 | 1444 | 1517 | 5718 | 8712 |
| | M1 | 1790 | 1518 | 1911 | 4164 | 8850 |
| | M3 | 1758 | 1926 | 1577 | 5168 | 7731 |

[Bet v 1: Hauptallergen der Birke, PHA: Phytohämagglutinin, IL: Interleukin]

Tab. 19: Ergebnisse des Proliferationsassays (angegeben als Stimulationsindices; Quotient aus Betv1-stimulierter und unstimulierter Probe).

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 1,1 | 2,0 | 1,0 | 0,9 | 1,2 |
| **P2** | 2,1 | 1,3 | 1,0 | 1,3 | 1,0 |
| **P3** | 0,7 | - | 0,9 | 0,8 | 0,6 |
| **P4** | 0,8 | 0,9 | 0,2 | 1,3 | 1,6 |
| **P5** | 2,0 | 2,7 | - | - | - |
| **P6** | 1,4 | 1,2 | 0,5 | 1,3 | 1,0 |
| **P7** | 0,9 | 0,8 | 1,1 | - | - |

Tab. 20: Ergebnisse des ELISPOTs für Interleukin 5.

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 2 | 1 | 1 | 3 | 21 |
| **P2** | 16 | 25 | 6 | 2 | 5 |
| **P3** | 0 | - | 5 | 20 | 41 |
| **P4** | 2 | 4 | 2 | 39 | 26 |
| **P5** | 5 | 85 | - | - | - |
| **P6** | 3 | 8 | 4 | 0 | 0 |
| **P7** | 0 | 92 | 33 | - | - |

Tab. 21: Ergebnisse des ELISPOTs für Interleukin 10.

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 0 | 8 | 0 | 1 | 0 |
| **P2** | 16 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| **P3** | 33 | - | 0 | 123 | 41 |
| **P4** | 0 | 0 | 4 | 28 | 36 |
| **P5** | 22 | 47 | - | - | - |
| **P6** | 5 | 12 | 9 | 74 | 26 |
| **P7** | 2 | 12 | 32 | - | - |

Tab. 22: Ergebnisse des ELISPOTs für Interferon γ.

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 54 | 4 | 0 | 2 | 0 |
| **P2** | 59 | 0 | 8 | 0 | 0 |
| **P3** | 0 | - | 7 | 24 | 83 |
| **P4** | 30 | 76 | 1 | 2 | 0 |
| **P5** | 9 | 4 | - | - | - |
| **P6** | 35 | 80 | 0 | 33 | 76 |
| **P7** | 0 | 0 | 0 | - | - |

Tab. 23: Ergebnisse des ELISPOTs für das Verhältnis von Th2- zu Th1-Zellen.

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 0,04 | 0,25 | 1,00 | 1,50 | 21,00 |
| **P2** | 0,27 | 15,00 | 0,75 | 2,00 | 5,00 |
| **P3** | 1,00 | - | 0,71 | 0,83 | 0,49 |
| **P4** | 0,07 | 0,05 | 2,00 | 19,50 | 26,00 |
| **P5** | 0,56 | 21,25 | - | - | - |
| **P6** | 0,09 | 0,10 | 4,00 | 0,03 | 0,01 |
| **P7** | 0,00 | 92,00 | 33,00 | - | - |

Tab. 24: Ergebnisse des ELISPOTs für das Verhältnis von Th2- zu Tr1-Zellen.

| | U0 | U1 | U3 | U6 | U12 |
|---|---|---|---|---|---|
| **P1** | 2,00 | 0,13 | 1,00 | 0,50 | 21,00 |
| **P2** | 1,00 | 15,00 | 3,00 | 2,00 | 5,00 |
| **P3** | 0,03 | - | 5,00 | 0,16 | 0,95 |
| **P4** | 2,00 | 4,00 | 2,00 | 1,39 | 0,72 |
| **P5** | 0,23 | 1,81 | - | - | - |
| **P6** | 0,60 | 0,67 | 0,44 | 0,01 | 0,04 |
| **P7** | 0,00 | 7,67 | 1,03 | - | - |

# 7 LITERATURVERZEICHNIS


Aalberse, R. C.; Van Der Gaag, R.; Van Leeuwen, J.: Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *In: J Immunol* 130 (1983) Nr. 2, S. 722-6

Aalberse, R.C.; Van Milligen, F.; Tan, K.J.; Stapel, S. O.: Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *In: Allergy* 48 (1993) Nr. 8, S. 559-69

Abbas, Abul K. ; Lichtman, Andrew H. ; Pober, Jordan S.: Immunologie. Bern [u.a.]: Huber, 1996. ISBN: 345682596X

Aberg, N.; Hesselmar, B.; Aberg, B., Eriksson, B.: Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *In: Clin Exp Allergy.* 25 (1995) Nr. 9, S. 815-9

Abramson, M. J.; Puy, R. M.; Weiner, J.M.: Allergen immunotherapy for asthma. *In: Cochrane Database Syst Rev* (2000) Nr. 2, S. CD001186

Adkinson, N.F. Jr : Immunotherapy for allergic rhinitis. *In: N Engl J Med* 341 (1999) Nr. 7, S. 522-4

Agresti, A.; Vercelli, D.: Analysis of gamma4 germline transcription in human B cells. *In: Int Arch Allergy Immunol* 118 (1999) Nr. 2-4, S. 279-81

Akbari, O.; DeKruyff, R. H.; Umetsu, D. T.: Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *In: Nat. Immunol* 2 (2001) Nr. 8, S. 725-31

Akdis, C. A.; Akdis, M.; Blesken, T.; Wymann, D.; Alkan, S. S.; Muller, U.; Blaser, K.: Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *In: J Clin Invest* 98 (1996) Nr. 7, S. 1676-83

Akdis, C. A.; Blesken, T.; Akdis, M.; Wuthrich, B.; Blaser, K.: Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *In: J Clin Invest* 102 (1998) Nr. 1, S. 98-106

Akdis, C. A.; Blaser, K.: IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *In: FASEB J* 13 (1999) Nr. 6, S. 603-9

Akdis, C.A. ; Blaser, K. : Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *In: Allergy* 55 (2000) Nr. 6, S. 522-30

Akdis, C. A.; Blaser, K.: Laser, K.: Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens. *In: Microbes Infect* 3 (2001) Nr. 11, S. 891-8

Akdis, Mubeccel; Verhagen, Johan; Taylor, Alison; Karamloo, Fariba; Karagiannidis, Christian; Crameri, Reto; Thunberg, Sarah; Deniz, Gunnur; Valenta, Rudolf; Fiebig, Helmut; Kegel, Christian; Disch, Rainer; Schmidt-Weber, Carsten B.; Blaser, Kurt; Akdis, Cezmi A.: Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *In: J Exp Med* 199 (2004) Nr. 11, S. 1567-75

Akdis, M.; Schmidt-Weber, C.; Jutel, M.; Akdis, C. A.; Blaser, K.: Mechanisms of allergen immunotherapy. *In: Clin Exp All Rev* (2004) Nr. 4, S. 56-60

Akdis, C. A.; Blaser, K.; Akdis, M.: T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *In: J Allergy Clin Immunol* 116 (2005) Nr. 5, S. 961-8; quiz 969

Akdis, M.: Immune tolerance in allergy. *In: Curr Opin Immunol* (2009) Nr. 6, S. 700-7

Akdis, Mubeccel; Akdis, Cezmi A.: Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *In: Nat Rev Drug Discov* 8 (2009) Nr. 8, S. 645-60

Akdis, Cezmi A.; Akdis, Mubeccel: Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 127 (2011) Nr. 1, S. 18-27; quiz 28-9

Akoum, H.; Tsicopoulos, A.; Vorng, H.; Wallaert, B.; Dessaint, J. P.; Joseph, M.; Hamid, Q.; Tonnel, A. B.: Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *In: Immunology* 87 (1996) Nr. 4, S. 593-8

Aleksza, M.; Lukacs, A.; Antal-Szalmas, P.; Hunyadi, J.; Szegedi, A.: Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *In: Br J Dermatol* 147 (2002) Nr. 6, S. 1135-41

Allanore, Y.; Hilliquin, P.; Coste, J.; Renoux, M.; Menkes, C. J.: Decreased prevalence of atopy in rheumatoid arthritis. *In: Lancet* 351 (1998) Nr. 9101, S. 497

Allavena, P.; Piemonti, L.; Longoni, D.; Bernasconi, S.; Stoppacciaro, A.; Ruco, L.; Mantovani, A: IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *In: Eur J Immunol* 28 (1998) Nr. 1, S. 359-69

Altmeyer, Peter; Bacharach-Buhles, Martina; Buhles, N.: Springer-Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. Berlin [u.a.]: Springer, 2002. ISBN: 3540413618

Anderson, A. E.; Mackerness, K. J.; Aizen, M.; Carr, V. A.; Nguyen, D.; Du Pre, F.; Durham, S. R.; Robinson, D. S. : Seasonal changes in suppressive capacity of CD4+ CD25+ T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25+ population. *In: Clin Exp Allergy* 39 (2009) Nr. 11, S. 1693-9

Andus, T.; Bauer, J.; Gerok, W.: Effects of cytokines on the liver. *In: Hepatology* 13 (1991) Nr. 2, S. 364-75

Anhoej, C.; Backer, V.; Nolte, H.: Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome. *In: Allergy* 56 (2001) Nr. 6, S. 548-52

Antunez, Cristina; Mayorga, Cristobalina; Corzo, Jose Luis; Jurado, Antonio; Torres, Maria Jose: Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *In: Pediatr Allergy Immunol* 19 (2008) Nr. 3, S. 210-8

Apostolou, Irina; von Boehmer, Harald: In vivo ionstruction of suppressor commitment in naive T cells. *In: J Exp Med* 199 (2004) Nr. 10, S. 1401-8

Asano, M.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Sakaguchi, S.: Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *In: J Exp Med* 184 (1996) Nr. 2, S. 387-96

Asher, M. Innes; Montefort, Stephen; Bjorksten, Bengt; Lai, Christopher K. W.; Strachan, David P.; Weiland, Stephan K.; Williams, Hywel: Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *In: Lancet* 368 (2006) Nr. 9537, S. 733-43

Atkinson, Helen; Aktinson, Larsson: 'A 10-year record of the arboreal airborne pollen in stockholm, sweden'. *In: Grana* 29 (1990) Nr.3, S. 229 — 237

AWMF Nationale Versorgungsleitlinie Asthma Langfassung, 2. Auflage, November 2010

Balkwill, F. R.; Burke, F.: The cytokine network. *In: Immunol today* 10 (1989) Nr. 9, S. 299-304

Bangsgaard, Nannie; Carlsen, Berit C.; Johansen, Jeanne Duus; Menne, Torkil; Skov, Lone: Susceptibility and reactivity in polysensitized individuals following controlled induction. *In: Contact dermatitis* 63 (2010) Nr. 1, S. 10-4

Barnes, P. J.: Endogenous inhibitory mechanismus in asthma. *In: Am J Resp Crit Care Med* 161 (2000) Nr. 3 Pt 2, S. S176-81

Barrat, Franck J.; Cua, Daniel J.; Boonstra, Andre; Richards, David F.; Crain, Chad; Savelkoul, Huub F.; De Waal-Malefyt, Rene; Coffman, Robert L.; Hawrylowicz, Catherine M.; O'Garra, Anne: In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *In: J Exp Med* 195 (2002) Nr. 5, S. 603-16

Beasley, R.; Crane, J.; Lai, C. K.: Prevalence and etiology of asthma. *In: J Allergy Clin Immunol* 105 (2000) Nr. 2, S. 466-72

Behrendt, H.; Becker, W. M.; Fritzsche, C.; Sliwa-Tomczok, W.; Tomczok, J.; Friedrichs, K. H.; Ring, J.: Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *In: Int Arch Allergy Immunol* 113 (1997) Nr. 1-3, S. 69-74

Behrendt, H.; Kasche, A.; Ebner von Eschenbach, C.; Risse, U.; Huss-Marp, J.; Ring, J.: Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *In: Int Arch Immunol* 124 (2001) Nr. 1-3, S. 121-5

Bellinghausen, I.; Metz, G.; Enk, A. H.; Christmann, S.; Knop, J.; Saloga, J.: Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *In: Eur J Immunol* 27 (1997) Nr. 5, S. 1131-9

Bellinghausen, I.; Klostermann, B.; Knop, J.; Saloga, J.: Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *In: J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) Nr. 4, S. 862-8

Bellinghausen, I.; Knop, J.; Saloga, J.: Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie. *In: Der Hautarzt* 57 (2006) Nr. 10, S. 855-9

Benjaponpitak, S.; Oro, A.; Maguire, P.; Marinkovich, V.; DeKruyff, R. H.; Umetsu, D. T.: The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 103 (1999) Nr. 3 Pt 1, S. 468-75

Bennett, C. L.; Christie, J.; Ramsdell, F.; Brunkow, M. E.; Ferguson, P. J.; Whitesell, L.; Kelly, T. E.; Saulsbury, F. T.; Chance, P. F.; Ochs, H. D.: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *In: Nature genetics* 27 (2001) Nr. 1, S. 20-1

Benson, M.; Strannegard, I. L.; Strannegard, O.; Wennergren, G.: Topical steroid treatment of allergic rhinitis decreases nasal fluid TH2 cytokines, eosinophils, eosinophil cationic protein, and IgE but has no significant

effect on IFN-gamma, IL-1beta, TNF-alpha, or neutrophils. *In: J Allergy Clin Immunol* 106 (2000) Nr. 2, S. 307-12

Bergmann, K. C.; Müsken, H.: Durchführung und Bewertung des Pricktests. *In: Allergo J* (1992) S. 56-60

Bergmann, K. C.; Müsken, H.: Durchführung und Bewertung des nasalen Provokationstest. *In: Allergo J* (1994) S. 103-106.

Billiau, A.: Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *In: Adv Immunol* 62 (1996) S. 61-130

Blair, H.; Herbert, R. L.: The use of disodium cromoglycate in seasonal rhinitis. *In: Practitioner* 208 (1972) Nr. 247, S. 671-6

Blair, H.; Herbert, R. L.: Treatment of seasonal allergic rhinitis with two percent sodium cromoglycate (BP) solution. *In: Clin Allergy* 3 (1973) Nr. 3, S. 283-8

Blaser, K.: Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production. *In: Adv Exp Med Biol* 409 (1996) S. 295-303

Blumberga, G.; Groes, L.; Haugaard, L.; Dahl, R.: Steroid-sparing effect of subcutaneous SQ-standardised specific immunotherapy in moderate and severe house dust mite allergic asthmatics. *In: Allergy* 61 (2006) Nr. 7, S. 843-8

Bodtger, U.; Poulsen, L. K.; Jacobi, H. H.; Malling, H.-J.: The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *In: Allergy* 57 (2002) Nr. 4, S. 297-305

Boguniewicz, M.; Martin, R. J.; Martin, D.; Gibson, U.; Celniker, A.; Williams, M.; Leung, D. Y.: The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *In: J Allergy Clin Immunol* 95 (1995) Nr. 1 Pt 1, S. 133-5

Bohle, Barbara; Kinaciyan, Tamar; Gerstmayr, Marianne; Radakovics, Astrid; Jahn-Schmid, Beatrice; Ebner, Christof: Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *In: J Allergy Clin Immunol* 120 (2007) Nr. 3, S. 707-13

Bohle, Barbara: T cell responses during allergen-specific immunotherapy of Type I allergy. *In: Front Biosci* 13 (2008) S. 6079-85

Bonsmann, U.; Bachert, C.; Delank, K. W.; Rohdewald, P.: Presence of fluticasone propionate on human nasal mucosal surface and in human nasal tissue over a period of 24 h after intranasal application. *In: Allergy* 56 (2001) Nr. 6, S. 532-5

Borish, L.: IL-10: evolving concepts. *In: J Allergy Clin Immunol* 101 (1998) Nr. 3, S. 293-7

Borish, Larry C.; Steinke, John W.: 2. Cytokines and chemokines. *In: J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) Nr. 2 Suppl, S. S460-75

Bousquet, J.; Hejjaoui, A.; Skassa-Brociek, W.; Guerin, B.; Maasch, H. J.; Dhivert, H.; Michel, F. B.: Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. *In: J Allergy Clin Immunol* 80 (1987) Nr. 4, S. 591-8

Bousquet, J.; Maasch, H.; Martinot, B.; Hejjaoui, A.; Wahl, R.; Michel, F. B.: Double blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. II. Comparison between parameters assessing the efficacy of

immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 82 (1988) Nr. 3 Pt 1, S. 439-46

Bousquet, J.; Hejjaoui, A.; Soussana, M.; Michel, F. B.: Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. IV. Comparison of the safety and efficacy of two dosages of a high-molecular-weight allergoid. *In: J Allergy Clin Immunol* 85 (1990) Nr. 2, S. 490-7

Bousquet, J.; Lockey, R.; Malling, H. J.: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *In: J Allergy Clin Immunol* 102 (1998) Nr. 4 Pt 1, S. 558-62

Bousquet, J.; Van Cauwenberge, P.; Khaltaev, N.: Allergic rhinitis and its impact on asthma. *In: J Allergy Clin Immunol* 108 (2001) Nr. 5 Suppl, S. S147-334

Bousquet, P.-J.; Chinn, S.; Janson, C.; Kogevinas, M.; Burney, P.; Jarvis, D.: Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *In: Allergy* 62 (2007) Nr. 3, S. 301-9

Bowles, D. J.: Defense-related proteins in higher plants. *In: Annu Rev Biochem* 59 (1990) S. 873-907

Branco-Ferreira, M.; Spinola Santos, A.; Pereira Santos, M. C.; Palma Carlos, M. L.; Pereira Barbosa, M. A.; Palma Carlos, A. G.: Efficacy and safety of specific immunotherapy with a modified mite extract. *In: Allergol et Immunopathol (Madr)* 33 (2005) Nr. 2, S. 80-5

Brunkow, M. E.; Jeffery, E. W.; Hjerrild, K. A.; Paeper, B.; Clark, L. B.; Yasayko, S. A.; Wilkinson, J. E.; Galas, D.; Ziegler, S. F.; Ramsdell, F.: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *In: Nature genetics* 27 (2001) Nr. 1, S. 68-73

Bufe, A.; Spangfort, M. D.; Kahlert, H.; Schlaak, M.; Becker, W. M.: The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *In: Planta* 199 (1996) Nr. 3, S. 413-5

Burastero, Samuele E.; Mistrello, Gianni; Falagiani, Paolo; Paolucci, Clara; Breda, Daniela; Roncarolo, Daniela; Zanotta, Stefania; Monasterolo, Giorgio; Rossi, Renato E.: Effect of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid on allergen-specific T-cell proliferation and interleukin 10 production. *In: Ann Allergy Asthma Immunol* 100 (2008) Nr. 4, S. 343-50

Burastero, S. E.; Mistrello, G.; Paolucci, C.; Breda, D.; Roncarolo, D.; Zanotta, S.; Falagiani, P.: Clinical and immunological correlates of pre-co-seasonal sublingual immunotherapy with birch monomeric allergoid in patients with allergic rhinoconjunctivitis. *In: Int J Immunopathol Pharmacol* 22 (2009) Nr. 2, S. 343-52

Bussmann, C.; Maintz, L.; Hart, J.; Aallam, J.-P.; Vrtala, S.; Chen, K.-W.; Bieber, T.; Thomas, W. R.; Valenta, R.; Zuberbier, T.; Sager, A.; Novak, N.: Clinical improvement and immunological changes in atopic dermatitis patients undergoing subcutaneous immunotherapy with a house dust mite allergoid: a pilot study. *In: Clin Exp Allergy* 37 (2007) Nr. 9, S. 1277-85

Canonica, Giorgio Walter; Passalacqua, Giovanni: Noninjection routes for immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) Nr. 3, S. 437-48; quiz 449

Carballido, J. M.; Carballido-Perrig, N.; Oberli-Schrammli, A.; Heusser, C. H.; Blaser, K.: Regulation of IgE and IgG4 responses by allergen specific T-cell clones to bee venom phospholipase A2 in vitro. *In: J Allergy Clin Immunol* 93 (1994) Nr. 4, S. 758-67

Carnes, J.; Himly, M.; Gallego, M.; Iraola, V.; Robinson, D. S.; Fernandez--Caldas, E.; Briza, P.: Detection of allergen composition and in vivo immunogenicity of depigmented allergoids of Betula alba. *In: Clin Exp Allergy* 39 (2009) Nr. 3, S. 426-34

Calderon, M. A.; Alves, B.; Jacobson, M.; Hurwitz, B.; Sheikh, A.; Durham, S.: Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *In: Cochrane Database Syst Rev* (2007) Nr. 1, S. CD001936

Casanovas, M.; Gómez, M.; Alamar, R.; Fernández-Caldas, E.; Basomba, A.: Safety evaluation and comparison of a chemically modified allergenic extract and a native unmodified vaccine of Dermatophagoides pteronyssinus. *In: Allergy* 57 (2002) Nr. 73, S. 50

Casanovas, Miguel; Fernandez-Caldas, Enrique; Alamar, Remedios; Basomba, Antonio: Comparative study of tolerance between unmodified and high doses of chemically modified allergen vaccines of Dermatophagoides pteronyssinus. *In: Int Arch Allergy Immunol* 137 (2005) Nr. 3, S. 211-8

Casanovas, M.; Gomez, M. J.; Carnes, J.; Fernandez-Caldas, E.: Skin tests with native, depigmented and glutaraldehyde polymerized allergen extracts. *In: J Invest Allergol Clin Immunol* 15 (2005) Nr. 1, S. 30-6

Casanovas, M.; Carnes, J.; Giesler, R. K.: Correspondence re commercially available allergoid products for birch pollen immunotherapy. *In: Clin Exp Allergy* 37 (2007) Nr. 10, S. 1576; author reply 1576-7

Caux, C.; Massacrier, C.; Vanbervliet, B.; Dubois, B.; Van Kooten, C.; Durand, I.; Banchereau, J: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *In: J Exp Med* 180 (1994) Nr. 4, S. 1263-72

Cella, M.; Scheidegger, D.; Palmer-Lehmann, K.; Lane, P.; Lanzavecchia, A.; Alber, G.: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *In: J Exp Med* 184 (1996) Nr. 2, S. 747-52

Cella, M.; Salio, M.; Sakakibara, Y.; Langen, H.; Julkunen, I.; Lanzavecchia, A.: Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by doublestranded RNA. *In: J Exp Med* 189 (1999) Nr. 5, S. 821-9

Chatila, T. A.; Blaeser, F.; Ho, N.; Lederman, H. M.; Voulgaropoulos, C.; Helms, C.; Bowcock, A. M.: JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome. *In: J Clin Invest* 106 (2000) Nr. 12, S. R75-81

Chehade, Mirna; Mayer, Lloyd: Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *In: J Allergy Clin Immunol* 115 (2005) Nr. 1, S. 3-12; quiz 13

Chen, Y.; Kuchroo, V. K.; Inobe, J.; Hafler, D. A.; Weiner, H. L.: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *In: Science* 265 (1994) Nr. 5176, S. 1237-40

Chen, WanJun; Jin, Wenwen; Hardegen, Neil; Lei, Ke-Jian; Li, Li; Marinos, Nancy; McGrady, George; Wahl, Sharon M.: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-ß induction of transcription factor Foxp3. *In: J Exp Med* 198 (2003) Nr. 12, S. 1875-86

Choy, E. H.; Panayi, G. S.: Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *In: N Engl J Med* 344 (2001) Nr. 12, S. 907-16

Ciprandi, G.; Marseglia, G. L.; Tosca, M. A.: Allergen-specific immunotherapy: an update on immunological mechanisms of action. *In: Monaldi Arch Chest Dis* 65 (2006) Nr. 1, S. 34-7

Claes, Christa; Mittendorf, Thomas; Graf von der Schulenburg, J.-Matthias: Persistenz und Frequenz von Verordnungen im Bereich der subkutanen allergenspezifischen Immuntherapie (SCIT) bei GKV-Patienten in Deutschland. *In: Med Klin* 104 (2009) Nr. 7, S. 536-42

Clutterbuck, E. J.; Hirst, E. M.; Sanderson, C. J.: Human interleukin-5 (IL-5) regulates the produktion of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GMCSF. *In: Blood* 73 (1989) Nr. 6, S. 1504-12

Cobbold, Stephen P.; Castejon, Raquel; Adams, Elizabeth; Zelenika, Diana; Graca, Luis; Humm, Susan; Waldmann, Herman: Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. In: *J Immunol* 172 (2004) Nr. 10, S. 6003-10

Coffman, R. L.; Carty, J.: A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *In: J Immunol* 136 (1986) Nr. 3, S. 949-54

Cohen, Sheldon G.; Frankland, A. W.; Dworetzky, Murray: Noon and Freeman on prophylactic inoculation against hay fever. *In: J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) Nr. 5, S. 1142-50

Cooke, R. A.; Barnard, J. H.; Hebald, S.; Stull, A.: Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *In: The J Exp Med* 62 (1935) Nr. 6, S. 733-50

Corrigan, C. J.; Kettner, J.; Doemer, C.; Cromwell, O.; Narkus, A.: Efficacy and safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six-grass pollen allergoid. *In: Allergy* 60 (2005) Nr. 6, S. 801-7

Cortesini, R.; Lemaoult, J.; Ciubotariu, R.; Cortesini, N. S.: CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *In: Immunol Rev* 182 (2001) S. 201-6

Cosmi, L.; Santariasci, V.; Angeli, R., Liotta, F.; Frosali, F.; Rossi, O.; Falagiani, P.; Riva, G.; Romagnani, S.; Annunziato, F.; Maggi, E.: Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-γ- and interleukin-10-production. *In: Clin Exp Allergy* 36 (2006) Nr. 3, S. 261-272

Cottrez, F.; Hurst, S. D.; Coffman, R. L.; Groux, H.: T regulatory cells 1 inhibit a TH2-specific response in vivo. *In: J Immunol* 165 (2000) Nr. 9, S. 4848-53

Cox, Linda: Sublingual immunotherapy in pediatric allergic rhinitis and asthma: efficacy, safety, and practical considerations. *In: Curr Allergy Asthma Rep* 7 (2007) Nr. 6, S. 410-20

Coyle, A. J.; Tsuyuki, S.; Bertrand, C.: Mice lacking the IFN-γ receptor have an impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *In: J Immunol* 156 (1996) Nr. 8, S. 2680-5

Crameri, R.; Kundig, T. M.; Akdis, C. A.: Modular antigen-translocation as a novel vaccine strategy for allergen-specific immunotherapy. *In: Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2009)

Creticos, P. S.; Adkinson, N. F. Jr.; Kagey--Sobotka, A.; Proud, D.; Meier, H. L.; Naclerio, R. M.; Lichtenstein, L. M.; Norman, P. S.: Nasal challenge with ragweed pollen in hay fever patients. Effect of immunotherapy. *In: J Clin Invest* 76 (1985) Nr. 6, S. 2247-53

Czerkinsky, C. C.; Nilsson, L. A.; Nygren, H.; Ouchterlony, O.; Tarkowski, A.: A solidphase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *In: J Immunol Methods* 65 (1983) Nr. 1-2, S. 109-21

Czerkinsky, C.; Andersson, G.; Ekre, H. P.; Nilsson, L. A.; Klareskog, L.; Ouchterlony, O.: Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *In: J Immunol Methods* 110 (1988) Nr. 1, S. 29-36

D´Amato, G.; Spieksma, F. T.; Liccardi, G.; Jager, S.; Russo, M.; Kontou-Fili, K.; Nikkels, H.; Wüthrich, B.; Bonini, S.: Pollen-related allergy in Europe. *In: Allergy* 53 (1998) Nr. 6, S. 567-78

D'Amato, G.; Bonini, S.; Bousquet, J.; Durham, S. R.; Platts-Mills, T. A. E.: Pollenosis 2000: Global Approach. JGC Editions, Naples, Italy (2001)

D'Anneo, R. W.; Arena, A.; Gammeri, E.; Bruno, M. E.; Falagiani, P.; Riva, G.; Leonardi, S.; La Rosa, M.: Parietaria sublingual allergoid immunotherapy with a co-seasonal treatment schedule. *In: Allergol Immunopathol* 36 (2008) Nr. 2, S. 79-84

Daftarian, P. M.; Kumar, A.; Kryworuchko, M.; Diaz-Mitoma, F.: IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *In: J Immunol* 157 (1996) Nr. 1, S. 12-20

Darzynkiewicz, Z.; Li, X.; Gong, J.: Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *In: Methods Cell Biol* 41 (1994) S. 15-38

De, Asit K.; Laudanski, Krzysztof; Miller-Graziano, Carol L.: Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation. *In: J Immunol* 170 (2003) Nr. 12, S. 6355-62

De Blay, Frederic; Barnig, Cindy; Kanny, Gisele; Purohit, Ashok; Leynadier, Francisque; Tunon De Lara, J. Manuel; Chabane, Habib; Guerin, Laurence: Sublingual-swallow immunotherapy with standardized 3-grass pollen extract: a double-blind, placebo-controlled study. *In: Ann Allergy Asthma Immunol* 99 (2007) Nr. 5, S. 453-61

De Jong, Esther C.; Vieira, Pedro L.; Kalinski, Pawel; Schuitemaker, Joost H.; Tanaka, Yuetsu; Wierenga, Eddy A.; Yazdanbakhsh, Maria; Kapsenberg, Martien L.: Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *In: J Immunol* 168 (2002) Nr. 4, S. 1704-9

De Smedt, T.; Van Mechelen, M.; De Becker, G.; Urbain, J.; Leo, O.; Moser, M.: Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *In: Eur J Immunol* 27 (1997) Nr. 5, S. 1229-35

De Vries, J. E.: The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *In: J Allergy Clin Immunol* 102 (1998) Nr. 2, S. 165-9

De Waal, M. R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G.; De Vries, J. E.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes:

an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *In: J Exp Med* 174 (1991) Nr. 5, S. 1209-20

Del Prete, G. F.; De Carli, M.; D'Elios, M. M.; Maestrelli, P.; Ricci, M.; Fabbri, L.; Romagnani, S.: Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *In: Eur J Immunol 23* (1993) Nr. 7, S. 1445-9

Del Prete, G.: The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *In: Int Rev Immunol* 16 (1998) Nr. 3-4, S. 427-55

Deo, Sudha S.; Mistry, Kejal J.; Kakade, Amol M.; Niphadkar, Pramod V.: Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *In: Lung India* 27 (2010) Nr. 2, S. 66-71

Des Roches, A. ; Paradis, L. ; Menardo, J. L. ; Bouges, S. ; Daures, J. P. ; Bousquet, J. : Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *In: J Allergy Clin Immunol* 99 (1997) Nr. 4, S. 450-3

Detandt, M.; Nolard, N.: The fluctuations of the allergenic pollen content of the air in Brussels (1982 to 1997). *In: Aerobiologia* 16 (2000) S. 55-61

Deutsche Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf-Hals-Chirurgie: Leitlinien Allergische Rhinokonjunktivitis. 08.2003

Devey, M. E.; Wilson, D. V.; Wheeler, A. W.: The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. *In: Clin Allergy* 6 (1976) Nr. 3, S. 227-36

Di Gioacchino, M.; Perrone, A.; Petrarca, C.; Di Claudio, F.; Mistrello, G.; Falagiani, P.; Dadorante, V.; Verna, N.; Braga, M.; Ballone, E.; Cavallucci, E.: Early cytokine modulation after the rapid induction phase of sublingual immunotherapy with mite monomeric allergoids. *In: Int J Immunopathol Pharmacol* 21 (2008) Nr. 4, S. 969-76

Diepgen, T.L.: Is the prevalence of stopic dermatitis increasing? *In: Epidemiology of Atopic Dermatitis* (2000). Williams, H.C. Cambridge University Press, Cambridge. S.: 96-109.

Djurup, R.; Malling, H. J.; Sondergaard, I.; Weeke, B.: The IgE and IgG subclass antibody response in patients allergic to yellow jacket venom undergoing different regimens of venom immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 76 (1985) Nr. 1, S. 46-55

Dokic, D.; Schnitker, J.; Narkus, A.; Cromwell, O.; Frank, E.: Spezifische Immuntherapie mit einem neu entwickelten Hausstaubmilbenallergoid (Acaroid®). *In: Allergo J* 14 (2005) S. 337-343

Donahue, J. G.; Greineder, D. K.; Connor-Lacke, L.; Canning, C. F.; Platt, R.: Utilization and cost of immunotherapy for allergic asthma and rhinitis. *In: Ann Allergy Asthma Immunol* 82 (1999) Nr. 4, S. 339-47

Dormann; Ebner; Jarman; Montermann; Kraft; Reske-Kunz: Responses of human birch pollen allergen-reactive T cells to chemically modified allergens (allergoids). *In: Clin Exp Allergy* 28 (1998) Nr. 11, S. 1374-83

Douek, I. F.; Leech, N. J.; Gillmor, H. A.; Bingley, P. J.; Gale, E. A.: Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of Asthma. *In: Lancet* 353 (1999) Nr. 9167, S. 1850

Durham, S. R.; Ying, S.; Varney, V. A.; Jacobson, M. R.; Sudderick, R. M.; Mackay, I. S.; Kay, A. B.; Hamid, Q. A.: Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells

expressing messenger RNA for interferon-gamma. *In: J Allergy Clin Immunol* 97 (1996) Nr. 6, S. 1356-65

Durham, S. R.; Till, S. J.: Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 102 (1998) Nr. 2, S. 157-64

Durham, S. R.; Walker, S. M.; Varga, E. M.; Jacobson, M. R.; O'Brien, F.; Noble, W.; Till, S. J.; Hamid, Q. A.; Nouri-Aria, K. T.: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *In: N Engl J Med* 341 (1999) Nr. 7, S. 468-75

Dykewicz, M. S.; Fineman, S.; Skoner, D. P.; Nicklas, R.; Lee, R.; Blessing-Moore, J.; Li, J. T.; Bernstein, I. L.; Berger, W.; Spector, S.; Schuller, D.: Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *In: Ann Allergy Asthma Immunol* 81 (1998) Nr. 5 Pt 2, S. 478-518

Ebner, C.; Schenk, S.; Najafian, N.; Siemann, U.; Steiner, R.; Fischer, G. W.; Hoffmann, K.; Szepfalusi, Z.; Schreiner, O.; Kraft, D.: Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *In: J Immunol* 154 (1995) Nr. 4, S. 1932-40

Ebner, C.; Siemann, U.; Bohle, B.; Willheim, M.; Wiedermann, U.; Schenk, S.; Klotz, F.; Ebner, H.; Kraft, D.; Scheiner, O.: 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. *In: Clin Exp Allergy* 27 (1997) S. 1007-1015.

Elkord, Eyad: Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *In: J Immunol Methods* 347 (2009) Nr. 1-2, S. 87-90

Elser, Bernd; Lohoff, Michael; Kock, Sonja; Giaisi, Marco; Kirchhoff, Sabine; Krammer, Peter H.; Li-Weber, Min: IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *In: Immunity* 17 (2002) Nr. 6, S. 703-12

Epple, P.; Apel, K.; Bohlmann, H.: Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against Fusarium oxysporum. *In: Plant Cell* 9 (1997) Nr. 4, S. 509-20

Eriksson, N. E.; Holmen, A.: Skin prick tests with standardized extracts of inhalant allergens in 7099 adult patients with asthma or rhinitis: cross-sensitizations and relationships to age, sex, month of birth and year of testing. *In: J Invest Allergol Clin Immunol* 6 (1996) Nr. 1, S. 36-46

Estaquier, J.; Ameisen, J. C.: A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *In: Blood* 90 (1997) Nr. 4, S. 1618-25

European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI): Position paper: Immunotherapy with hymenoptera venoms. *In: Allergy* 48 (1993) S. 36-46.

Ewan, P. W.; Alexander, M. M.; Snape, C.; Ind, P. W.; Agrell, B.; Dreborg, S.: Effective hyposensitization in allergic rhinitis using a potent partially purified extract of house dust mite. *In: Clin Allergy* 18 (1988) Nr. 5, S. 501-8

Fennerty, A. G.; Jones, K. P.; Davies, B. H.; Fifield, R.; Edwards, J.: Immunological changes associated with a successful outcome of pollen immunotherapy. *In: Allergy* 43 (1988) Nr. 6, S. 415-9

Fernández-Caldas, E. F.; Casanovas, M.; Gallego, M.: T-cell proliferation studies with a depigmented, polymerized extract of Phleum pratense. *In: Allergy* s73 (2002) S. 65-6

Ferreira, N.; Trindade, J. C.: Specific immunotherapy 3 years follow-up in asthmatic children. *In: Allergol Immunopathol* 21 (1993) Nr. 5, S. 185-92

Ferrer, A.; Garcia-Sellés, J.: Significant improvement in symptoms, skin test, and specific bronchial reactivity after 6 months of treatment with a depigmented, polymerized extract of Dermatophagoides pteronyssinus and D. farinae. *In: J Investig Allergol Clin Immunol* 13 (2003) Nr. 4, S. 244-51

Fiebig, H.: Allergenextrakte - Allergoide - Peptide. *In: Allergologie* 20 (1997) S. 599-606.

Fiocchi, Alessandro; Pajno, Giovanbattista; La Grutta, Stefania; Pezzuto, Francesco; Incorvaia, Cristoforo; Sensi, Laura; Marcucci, Francesco; Frati, Franco: Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children aged 3 to 7 years. *In: Ann Allergy Asthma Immunol* 95 (2005) Nr. 3, S. 254-8

Fiorentino, D. F.; Bond, M. W.; Mosmann, T. R.: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *In: J Exp Med* 170 (1989) Nr. 6, S. 2081-95

Flores-Romo, L.; Shields, J.; Humbert, Y.; Graber, P.; Aubry, J. P.; Gauchat, J. F.; Ayala, G.; Allet, B.; Chavez, M.; Bazin, H.: Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23. *In: Science* 261 (1993) Nr. 5124, S. 1038-41

Fontenot, Jason D. ; Gavin, Marc A.; Rudensky, Alexander Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *In: Nat Immunol* 4 (2003) Nr. 4, S. 330-6

Frei, T.; Leuschner, R. M.: A change from grass pollen induced allergy to tree pollen induced allergy: 30 years of pollen observation in Switzerland. *In: Aerobiologia* 16 (2000) S. 407-416

Fuchs, T.; Klimek, L.: Die allergenspezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung). Teil 2. Orale, sublinguale und nasale Applikation. *In: HNO* 48 (2000) S. 158-164.

Fujiwara, H.; Kikutani, H.; Suematsu, S.; Naka, T.; Yoshida, K.; Yoshida, K.; Tanaka, T.; Suemura, M.; Matsumoto, N.; Kojima, S.: The absence of IgE antibody-mediated augmentation of immune responses in CD23-deficient mice. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) Nr. 15, S. 6835-9

Gabrielsson, S.; Paulie, S.; Roquet, A.; Ihre, E.; Lagging, E.; van Hage-Hamsten, M.; Harfast, B.; Troye-Blomberg, M.: Increased allergen-specific Th2 responses in vitro in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge. *In: Allergy* 52 (1997) Nr. 8, S. 860-5

Gabrielsson, S.; Sonderlund, A.; Paulie, S.; Van Der Pouw Kraan, T. C.; Troye-Blomberg, M.; Rak, S.: Specific immunotherapy prevents increased levels of allergenspecific IL-4- and IL-13-producing cells during pollen season. *In: Allergy* 56 (2001) Nr. 4, S. 293-300

Gabrielsson, S.; Soderlund, A.; Paulie, S.; van der Pouw Kraan, T. C.; Troye-Blomberg De, A. K.; Laudanski, K.; Miller-Graziano, C. L.: Failure of monocytes of trauma patients to convert to immature dendritic cells is related to preferential macrophage-colony-stimulating factor-driven macrophage differentiation. *In: J Immunol* 170 (2003) S. 6355-6362.

Gagliardi, M. C.; Sallusto, F.; Marinaro, M.; Langenkamp, A.; Lanzavecchia, A.; De Magistris, M. T.: Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licences them for Th2 priming. *In: Eur J Immunol* 30 (2000) Nr. 8, S. 2394-403

Gallego, M. T.; Iraola, V.; Himly, M.; Robinson, D. S.; Badiola, C.; Garcia-Robaina, J. C.; Briza, P.; Carnes, J.: Depigmented and polymerised house dust mite allergoid: allergen content, induction of IgG4 and clinical response. *In: Int Arch Allergy Immunol* 153 (2010) Nr. 1, S. 61-9

Gardner, L. M.; O'Hehir, R. E.; Rolland, J. M.: High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-gamma+ T Cells, apoptosis of CD4+IL-4+ T cells and T cell anergy. *In: Int Arch Allergy Immunol* 133 (2004) S. 1-13.

Gascan, H.; Gauchat, J. F.; Roncarolo, M. G.; Yssel, H.; Spits, H.; De Vries, J. E.: 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. *In: J Exp Med* 173 (1991) Nr. 3, S. 747-50

Gazzinelli, R. T.; Wysocka, M.; Hieny, S.; Scharton-Kersten, T.; Cheever, A.; Kuhn, R.; Muller, W.; Trinchieri, G.; Sher, A.: In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immun response dependent on CD4+ T cells and accompaniet by overproduktion of IL12, IFN-gamma and TNF-alpha. *In: J Immunol* 157 (1996) Nr. 2, S. 798-805

Gehlhar, K.; Schlaak, M.; Becker, W.; Bufe, A.: Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *In: Clin Exp Allergy* 29 (1999) Nr. 4, S. 497-506

Gell, P. G. H. and Coombs, R. R. A.: Clinical Aspects of Immunology. 3. Auflage, Blackwell, Oxford 1975. ISBN: 0632097000

Gershon, R. K.; Kondo, K.: Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *In: Immunology* 18 (1970) Nr. 5, S. 723-37

Giacomini, P.; Fisher, P. B.; Duigou, G. J.; Gambari, R.; Natali, P. G.: Regulation of class II MHC gene expression by interferons: insights into the mechanism of action of interferon (review). *In: Anticancer Res* 8 (1988) Nr. 6, S. 1153-61

Giordano, T.; Quarta, C.; Bruno, M. E.; Falagiani, P.; Riva, G.: Safety, tolerability and efficacy of sublingual allergoid immunotherapy with a 4-day shortened build-up phase. *In: Eur Ann Allergy Clin Immunol* 38 (2006) Nr. 9, S. 310-2

Golden, D. B.; Meyers, D. A.; Kagey-Sobotka, A.; Valentine, M. D.; Lichtenstein, L. M.: Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 69 (1982) Nr. 6, S. 489-93

Gordon, J. R.; Galli, S. J.: Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *In: Nature* 346 (1990) Nr. 6281, S. 274-6

Grammer, L. C.; Zeiss, C. R..; Suszko, I. M.; Shaughnessy, M. A.; Patterson, R.: A double-blind, placebo-controlled trial of polymerized whole ragweed for immunotherapy of ragweed allergy. *In: J Allergy Clin Immunol* 69 (1982) Nr. 6, S. 494-9

Grembiale, R. D.; Camporta, L.; Naty, S.; Tranfa, C.M.; Djukanovic, R.; Marsico, S.A.: Effects of specific immunotherapy in allergic rhinitic individuals with

bronchial hyperresponsiveness. *In: Am J Respir Crit Care Med* 162 (2000) Nr. 6, S. 2048-52

Grindebacke, Hanna; Larsson, Pia; Wing, Kajsa; Rak, Sabina; Rudin, Anna: Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season. *In: J Clin Immunol* 29 (2009) Nr. 6, S. 752-60

Gros, E.; Petzold, S.; Maintz, L.; Bieber, T.; Novak N.: Reduced IFN-γ receptor expression and attenuated IFN-γ response by dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *In:* J Allergy Clin Immunol, in press

Groux, H. ; Bigler, M. ; de Vries, J. E. ; Roncarolo, M. G. : Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *In: J Exp Med* 184 (1996) Nr. 1, S. 19-29

Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; De Vries, J. E.; Roncarolo, M. G. : A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *In: Nature* 389 (1997) Nr. 6652, S. 737-42

Guerra, F.; Daza, J. C.; Almeda, E.: Immunotherapy with a depigmented, polymerized vaccine of Olea europaea pollen allergens. Significantly reduces specific bronchial and skin test reactivity in sensitized patients after one year of treatment. *In: J Investig Allergol Clin Immunol* 13 (2003) Nr. 2, S. 108-17

Hadeiba, Husein; Locksley, Richard M.: Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *In: J Immunol* 170 (2003) Nr. 11, S. 5502-10

Hammad, H.; Charbonnier, A. S.; Duez, C.; Jacquet, A.; Stewart, G. A.; Tonnel, A. B.; Pestel, J.: Th2 polarization by Der p 1-pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *In: Blood* 98 (2001) Nr. 4, S. 1135-41

Hansen, G.; Berry, G.; DeKruyff, R. H.; Umetsu, D. T.: Allergen-specific TH1 cells fail to counterbalance TH2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *In: J Clin Invest* 103 (1999) Nr. 2, S. 175-83

Hansen, G.; McIntire, J. J.; Yeung, V. P.; Berry, G.; Thorbecke, G. J.; Chen, L.; DeKruyff, R. H.; Umetsu, D. T.: CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergeninduced airway hyperreactivity and inflammation. *In: J Clin Invest* 105 (2000) Nr. 1, S. 61-70

Hart, P. H.; Jones, C. A.; Finlay-Jones, J. J.: Monocytes cultured in cytokinedefined environments differ from freshly isolated monocytes in their responses to IL-4 and IL-10. *In: J Leukoc Biol* 57 (1995) Nr. 6, S. 909-18

Hartmann, G.; Weiner, G. J.; Krieg, A. M.: CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) Nr. 16, S. 9305-10

Haugaard, L.; Dahl, R.: Immunotherapy in patients allergic to cat and dog dander. I. Clinical results. *In: Allergy* 47 (1992) Nr. 3, S. 249-54

Haugaard, L.; Dahl, R.; Jacobsen, L.: A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *In: J Allergy Clin Immunol* 91 (1993) Nr. 3, S. 709-22

Hedlin, G.; Graff-Lonnevig, V.; Heilborn, H.; Lilja, G.; Norrlind, K.; Pegelow, K.; Sundin, B.; Lowenstein, H.: Immunotherapy with cat- and dog-dander

extracts. V. Effects of 3 years treatment. *In: J Allergy Clin Immunol* 87 (1991) Nr. 5, S. 955-64

Henmar, H.; Lund, G.; Lund, L.; Petersen, A.; Wurtzen, P. A.: Allergenicity, immunogenicity and dose-relationship of three intact allergen vaccines and four allergoid vaccines for subcutaneous grass pollen immunotherapy. *In: Clin Exp Immunol* 153 (2008) Nr. 3, S. 316-23

Hepner, M. J.; Ownby, D. R.; Anderson, J. A.; Rowe, M. S.; Sears-Ewald, D.; Brown, E. B.: Risk of systemic reactions in patients taking beta-blocker drugs receiving allergen immunotherapy injections. *In: J Allergy Clin Immunol* 86 (1990) Nr. 3 Pt 1, S. 407-11

Herz, U.; Gerhold, K.; Gruber, C.; Braun, A.; Wahn, U.; Renz, H.; Paul, K.: BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *In: J Allergy Clin Immunol* 102 (1998) Nr. 5, S. 867-74

Heydenreich, B.; Bellinghausen, I.; Lorenz, S.; Henmar, H.; Strand, D.; Würtzen, P. A.; Saloga, J.: Reduced in vitro T-cell responses induced by glutaraldehyde-modified allergen extracts are caused mainly by retarded internalization of dendritic cells. *In: J Immunol* 136 (2012) Nr. 2, S. 208-17

Hoiby, A-S; Strand, V.; Robinson, D. S.; Sager, A.; Rak, S.: Efficacy, safety, and immunological effects of a 2-year immunotherapy with Depigoid birch pollen extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *In: Clin Exp Allergy* 40 (2010) Nr. 7, S. 1062-70

Holopainen, E.; Backman, A.; Salo, O. P.: Effect of disodium cromoglycate on seasonal allergic rhinitis. *In: Lancet* 1 (1971) Nr. 7689, S. 55-7

Hori, Shohei; Nomura, Takashi; Sakaguchi, Shimon: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *In: Science* 299 (2003) Nr. 5609, S. 1057-61

Horst, M.; Hejjaoui, A.; Horst, V.; Michel, F. B.; Bousquet, J.: Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized Alternaria extract. *In: J Allergy Clin Immunol* 85 (1990) Nr. 2, S. 460-72

Høst, A.; Andrae, S.; Charkin, S.; Diaz-Vázquez, C.; Dreborg, S.; Eigenmann, P. A.; Friedrichs, F.; Grinsted, P.; Lack, G.; Meylan, G.; Miglioranzi, P.; Muraro, A.; Nieto, A.; Niggemann, B.; Pascual, C.; Pouech, M.-G.; Rance, F.; Rietschel, E.; Wickman, M.: Allergy testing in children: why, who, when and how? *In: Allergy* 58 (2003) Nr. 7, S. 559-69

Hsieh, C. S.; Macatonia, S. E.; Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; O'Garra, A.; Murphy, K. M.: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeriainduced macrophages. *In: Science* 260 (1993) Nr. 5107, S. 547-9

Hu, Dan; Ikizawa, Koichi; Lu, Linrong; Sanchirico, Marie E.; Shinohara, Mari L.; Cantor, Harvey: Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *In: Nat Immunol* 5 (2004) Nr. 5, S. 516-23

Huang, S. W.: Asthma and diabetes. *In: Lancet* 354 (1999) Nr. 9177, S. 515

Huber, Samuel; Schramm, Christoph; Lehr, Hans A.; Mann, Amrit; Schmitt, Steffen; Becker, Christoph; Protschka, Martina; Galle, Peter R., Neurath, Markus F., Blessing, Manfred: Cutting edge: TGFbeta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *In: J Immunol* 173 (2004) Nr. 11, S. 6526-31

Hussain, R.; Poindexter, R. W.; Ottesen, E. A.: Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass. *In: J Immunol* 148 (1992) Nr. 9, S. 2731-7

Ibarrola, I.; Sanz, M. L.; Gamboa, P. M.; Mir, A.; Benahmed, D.; Ferrer, A.; Arilla, M. C.; Martinez, A.; Asturias, J. A.: Biological characterization of glutaraldehyde-modified Parietaria judaica pollen extracts. *In: Clin Exp Allergy* 34 (2004) Nr. 2, S. 303-9

Ikeda, N.; Ishiguro, A.; Uno, K.; Inaba, Y.; Ishikita, T.; Takahashi, H.; Shimbo, T.: Serum levels and in vitro production of IL-5 in children with bronchial asthma. *In: Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 20 (1997) Nr. 3, S. 159-65

Imura, H.; Fukata, J.; Mori, T.: Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *In: Clin Endocrinol* 35 (1991) Nr. 2, S. 107-15

Issar, M.; Sahasranaman, S.; Buchwald, P.; Hochhaus, G.: Differences in the glucocorticoid to progesterone receptor selectivity of inhaled glucocorticoids. *In: Europ Resp J* 27 (2006) Nr. 3, S. 511-6

Jacobsen, L.; Niggemann, B.; Dreborg, S.; Ferdousi, H. A.; Halken, S.; Host, A.; Koivikko, A.; Norberg, L. A.; Valovirta, E.; Wahn, U.; Moller, C.: Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *In: Allergy* 62 (2007) Nr. 8, S. 943-8

Jäger, S.; Th, E.; Spieksma, M.; Nolard, N.: Fluctuations and trends in airborne concentrations of some abundant pollen types, monitored at Vienna, Leiden, and Brussels. *In: Grana* 30 (1991) Nr. 2, S. 309 - 312

Janeway, Charles A.; Beginnen, Kurt; Rajewsky, Klaus: Immunologie. Heidelberg [u.a.]: 7. Aufl. Aufl. Spektrum, Akad. Verl, 2009. ISBN: 9783827420473

Jayasekera, Nivenka P.; Toma, Tudor P.; Williams, Andrew ; Rajakulasingam, K.: Mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis. *In: Biomed Pharmacother* 61 (2007) Nr. 1, S. 29-33

Jeannin, P.; Lecoanet, S.; Delneste, Y.; Gauchat, J. F.; Bonnefoy, J. Y.: IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *In: J Immunol* 160 (1998) Nr. 7, S. 3555-61

Jeep, S.; Kirchhof, E.; O'Connor, A.; Kunkel, G.: Comparison of the Phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom. *In: Allergy* 47 (1992) Nr. 3, S. 212-7

John, M.; Lim, S.; Seybold, J.; Jose, P.; Robichaud, A.; O`Conner, B.; Barnes, P. J.; Chung, K. F.: Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *In: Am J Respir Crit Care Med* 157 (1998) Nr. 1, S. 256-62

Jonuleit, H.; Schmitt, E.; Schuler, G.; Knop, J.; Enk, A. H.: Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *In: J Exp Med* 192 (2000) Nr. 9, S. 1213-22

Jonuleit, Helmut; Schmitt, Edgar; Kakirman, Hacer; Stassen, Michael; Knop, Jurgen; Enk, Alexander H.: Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *In: J Exp Med* 196 (2002) Nr. 2, S. 255-60

Jung, T.; Moessner, R.; Dieckhoff, K.; Heidrich, S.; Neumann, C.: Mechanisms of deficient interferon-gamma production in atopic diseases. *In: Clin Exp Allergy* 29 (1999) Nr. 7, S. 912-9

Jutel, M.; Pichler, W. J.; Skrbic, D.; Urwyler, A.; Dahinden, C.; Muller, U.R.: Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *In: J Immunol* 154 (1995) Nr. 8, S. 4187-94

Jutel, Marek; Akdis, Mubeccel; Budak, Ferah; Aebischer-Casaulta, Carmen; Wrzyszcz, Maria; Blaser, Kurt; Akdis, Cezmi A.: IL-10 and TGF-ß cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *In: Eur J Immunol* 33 (2003) Nr. 5, S. 1205-14

Jutel, Marek; Jaeger, Lothar; Suck, Roland; Meyer, Hanns; Fiebig, Helmut; Cromwell, Oliver: Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *In: J Allergy Clin Immunol* 116 (2005) Nr. 3, S. 608-13

Jutel, M.; Akdis, M.; Blaser, K.; Akdis, C. A.: Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *In: Allergy* 61 (2006) Nr. 7, S. 796-807

Jutel, Marek; Akdis, Cezmi A.: T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *In: Chem Immunol Allergy* 94 (2008) S. 158-77

Kahlert, H.; Cromwell, O.; Fiebig, H.: Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c. *In: Clin Exp Allergy* 33 (2003) Nr. 9, S. 1266-72

Kaiser, H.; Findlay, S.; Georgitis, J.; Grossman, J.; Ratner, P.; Tinkelman, D.; Roszko, P.; Zegarelli, E.; Wood, C.: Long-term treatment of perennial allergic rhinitis with ipratropium bromide nasal spray 0.06%. *In: J Allergy Clin Immunol* 95 (1995) Nr. 5 Pt 2, S. 1128-32

Kalinski, P.; Schuitemaker, J. H.; Hilkens, C. M.; Kapsenberg, M. l.: Prostaglandin E2 induces the final maturation of Il-12- deficient $CD1a^{+}$ $CD83^{+}$ dendritic cells: the levels of Il-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistent to further modulation. *In: J Immunol* 161 (1998) Nr. 6, S. 2804-9

Kalinski, P.; Lebre, M. C.; Kramer, D.; De Jong, E. C.; Van Schijndel, J. W. P. M.; Kapsenberg, M. L.: Analysis of the CD4+ T cell responses to house dust mite allergoid. *In: Allergy* 58 (2003) Nr. 7, S. 648-56

Kapsenberg, M. L.: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *In: Nat Rev Immunol* 3 (2003) Nr. 12, S. 984-93

Kasperska-Zajac, Alicja; Brzoza, Zenon; Rogala, Barbara: Effect of allergen-specific immunotherapy on platelet secretory activity in patients with grass-pollen allergy. *In: Vaccine* 24 (2006) Nr. 47-48, S. 6990-3

Kelso, J. M.; Jones, R. T.; Tellez, R.; Yunginger, J. W.: Oral allergy syndrome successfully treated with pollen immunotherapy. *In: Ann Allergy Asthma Immunol* 74 (1995) Nr. 5, S. 391-6

Keskin, Ozlem; Tuncer, Ayfer; Adalioglu, Gonul; Sekerel, Bulent E.; Sackesen, Cansin; Kalayci, Omer: The effects of grass pollen allergoid immunotherapy on clinical and immunological parameters in children with allergic rhinitis. *In: Pediatr Allergy Immunol* 17 (2006) Nr. 6, S. 396-407

Khattri, Roli; Cox, Tom; Yasayko, Sue-Ann; Ramsdell, Fred: An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *In: Nat Immunol* 4 (2003) Nr. 4, S. 337-42

Kilshaw, P. J.; Brent, L.; Pinto, M.: Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *In: Nature* 255 (1975) Nr. 5508, S. 489-91

King, T. P.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D. G.; Platts-Mills, T. A.; Thomas, W.: Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *In: Int Arch Allergy Immunol* 105 (1994) Nr. 3, S. 224-33

Kitani, A.; Strober, W.: Regulation of C gamma subclass germ-line transcripts in human peripheral blood B cells. *In: J Immunol* 151 (1993) Nr. 7, S. 3478-88

Kleine-Tebbe, J.; Fuchs, T.; Klimek, L.; Kühr, J.; Lepp, U.; Niggemann, B.; Rakoski, J.; Renz, H.; Saloga, J.; Simon, J.: Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie inhaltlich abgestimmt mit dem Ärzteverband Deutscher Allergologen. *In: Pneumologie* 55 (2000) S. 438-444

Kleine-Tebbe, J.; Fuchs, T.; Klimek, L.; Kühr, J.; Kunkel, G.; Lepp, U.; Niggemann, B.; Rakoski, J.; Renz, H.; Saloga, J.; Simon, J.: Spezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Atemwegserkrankungen. *In: Deutsches Ärzteblatt* 100 (2003) S. 334-339

Klimek, Ludger; Riechelmann, H.; Saloga, J.; Mann, W.; Knop, J. (Hrsg): Allergologie und Umweltmedizin. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1997, ISBN: 3794517563

Klimek, Ludger; Fuchs, Th: Spezifische Immuntherapie - Hyposensibilisierung. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 1999. ISBN: 3131120819

Klimek; Dormann; Jarman; Cromwell; Riechelmann; Reske-Kunz: Short-term preseasonal birch pollen allergoid immunotherapy influences symptoms, specific nasal provocation and cytokine levels in nasal secretions, but not peripheral T-cell responses, in patients with allergic rhinitis. *In: Clin Exp Allergy* 29 (1999) Nr. 10, S. 1326-35

Klimek, L.: Die allergenspezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung). Teil 1. Grundlagen und subkutane Applikation. *In: HNO* 48 (2000) S. 59-67

Knox, R. B.: Pollen and Allergy In: Studies in biology. Edward Arnold Verlag, London, 1979. ISBN: 0713127368

Ko, Kuibeom; Yamazaki, Sayuri; Nakamura, Kyoko; Nishioka, Tomohisa; Hirota, Keiji; Yamaguchi, Tomoyuki; Shimizu, Jun; Nomura, Takashi; Chiba, Tsutomu; Sakaguchi, Shimon: Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *In: J Exp Med* 202 (2005) Nr. 7, S. 885-91

Koning, H.; Baert, M. R.; Oranje, A. P.; Savelkoul, H. F.; Neijens, H. F.: Development of immune functions related to allergic mechanisms in young children. *In: Pediatr Res* 40 (1996) Nr. 3, S. 363-75

Kopf, M.; Brombacher, F.; Hodgkin, P. D.; Ramsay, A. J.; Milbourne, E. A.; Dai, W. J.; Ovington, K. S.; Behm, C. A.; Kohler, G.; Young, I. G.; Matthaei, K. I.: IL-5-deficient mice have a develop-mental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cyto-toxic T cell responses. *In: Immunity* 4 (1996) Nr. 1, S. 15-24

Kopp, M. V.; Hamelmann, E.; Zielen, S.; Kamin, W.; Bergmann, K.-C.; Sieder, C.; Stenglein, S.; Seyfried, S.; Wahn, U.: Combination of omalizumab and specific immunotherapy is superior to immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis and co-morbid seasonal allergic asthma. *In: Clin Exp Allergy* 39 (2009) Nr. 2, S. 271-9

Kowalski, M. L.; Jutel, M.: Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. *In: Allergy* 53 (1998) Nr. 5, S. 485-92

Kramer, M. F.; Rasp, G.: Nasal polyposis: eosinophils and interleukin-5. *In: Allergy* 54 (1999) Nr. 7, S. 669-80

Kuchroo, V. K.; Das, M. P.; Brown, J. A.; Ranger, A. M.; Zamvil, S. S.; Sobel, R. A.; Weiner, H. L.; Nabavi, N.; Glimcher, L. H.: B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *In: Cell* 80 (1995) Nr. 5, S. 707-18

Kuhn, R.; Lohler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Muller, W.: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *In: Cell* 75 (1993) Nr. 2, S. 263-74

Kuziel, W. A.; Greene, W. C.: Interleukin-2 and the IL-2 receptor: new insights into structure and function. *In: J Invest Dermatol* 94 (1990) Nr. 6 Suppl, S. 27S-32S

La Grutta, S.; Arena, A.; D'Anneo, W. R..; Gammeri, E.; Leonardi, S.; Trimarchi, A.; Platania, D.; La Rosa, M.: Evaluation of the antiinflammatory and clinical effects of sublingual immunotherapy with carbamylated allergoid in allergic asthma with or without rhinitis. A 12-month perspective randomized, controlled, trial. *In: Eur Ann Allergy Clin Immunol* 39 (2007) Nr. 2, S. 40-4

Lack, G.; Bradley, K. L.; Hamelmann, E.; Renz, H.; Loader, J.; Leung, D. Y.; Larsen, G.; Gelfand, E. W.: Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *In: J Immunol* 157 (1996) Nr. 4, S. 1432-9

Lahn, M.; Kanehiro, A.; Takeda, K.; Joetham, A.; Schwarze, J.; Kohler, G.; O'Brien, R.; Gelfand, E. W.; Born, W.; Kanehio, A.: Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *In: Nat Med* 5 (1999) Nr. 10, S. 1150-6

Larche, Mark: Update on the current status of peptide immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 119 (2007) Nr. 4, S. 906-9

Lauw, F. N.; Pajkrt, D.; Hack, C. E.; Kurimoto, M.; Van Deventer, S. J.; Van der Poll, T.: Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *In: J Immunol* 165 (2000) Nr. 5, S. 2783-9

Le, J.; Vilcek, J.: Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *In: Lab Invest* 56 (1987) Nr. 3, S. 234-48

Lechler, R.; Chai, J. G.; Marelli-Berg, F.; Lombardi, G.: T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. *In: Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 (2001) Nr. 1409, S. 625-37

Lechler, R.; Chai, J. G.; Marelli-Berg, F.; Lombardi, G.: The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *In: Immunology* 103 (2001) Nr. 3, S. 262-9

Lee, Gap Ryol; Fields, Patrick E.; Griffin, Thomas J.; Flavell, Richard A.: Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *In: Immunity* 19 (2003) Nr. 1, S. 145-53

Lehrer, S. B.; Horner, W. E.; Reese, G.: Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *In: Crit Rev Food Sci Nutr* 36 (1996) Nr. 6, S. 553-64

Lenschow, D. J.; Walunas, T. L.; Bluestone, J. A.: CD28/B7 system of T cell costimulation. *In: Annu Rev Immunol* 14 (1996) S. 233-58

Lerch, E.; Muller, U. R.: Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *In: J Allergy Clin Immunol* 101 (1998) Nr. 5, S. 606-12

Levings, M. K.; Roncarolo, M. G.: T regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *In: J Allergy Clin Immunol* 106 (2000) Nr. 1 Pt 2, S. S109-12

Liblau, R.; Tisch, R.; Bercovici, N.; Mcdevitt, H. O.: Systemic antigen in the treatment of T-cell-mediated autoimmune diseases. *In: Immunol today* 18 (1997) Nr. 12, S. 599-604

Lindemann, M.; Bohmer, J.; Zabel, M.; Grosse-Wilde, H.: ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization. *In: Clin Exp Allergy* 33 (2003) Nr. 7, S. 992-8

Ling, E. M.; Smith, T.; Nguyen, X. D.; Pridgeon, C.; Dallman, M.; Arbery, J.; Carr, V. A.; Robinson, D. S.: Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *In: Lancet* 363 (2004) Nr. 9409, S. 608-15

Liu, L.; Rich, B. E.; Inobe, J.; Chen, W.; Weiner, H. L.: Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *In: Int Immunol* 10 (1998) Nr. 8, S. 1017-26

Liu, Y. J.; Kanzler, H.; Soumelis, V.; Gilliet, M.: Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *In: Nat Immunol* 2 (2001) Nr. 7, S. 585-9

Liu, Weihong; Putnam, Amy L.; Xu-Yu, Zhou; Szot, Gregory L.; Lee, Michael R.; Zhu, Shirley; Gottlieb, Peter A.; Kapranov, Philipp; Gingeras, Thomas R.; Fazekas De St Groth, Barbara; Clayberger, Carol; Soper, David M.; Ziegler, Steven F.; Bluestone, Jeffrey A.: CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *In: J Exp Med* 203 (2006) Nr. 7, S. 1701-11

Lombardero, M.; Heymann, P. W.; Platts-Mills, T. A.; Fox, J. W.; Chapman, M. D.: Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II Dermatophagoides spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies. *In: J Immunol* 144 (1990) Nr. 4, S. 1353-60

Lombardi, G.; Sidhu, S.; Batchelor, R.; Lechler, R.: Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *In: Science* 264 (1994) Nr. 5165, S. 1587-9

Long, Julie A.; Fogel-Petrovic, Mirjana; Knight, Darryl A.; Thompson, Philip J.; Upham, John W.: Higher prostaglandin e2 production by dendritic cells from subjects with asthma compared with normal subjects. *In: Am J Respir Crit Care Med* 170 (2004) Nr. 5, S. 485-91

Lüderitz-Püchel, U.; Keller-Stanislawski, B.; Haustein, D.: Neubewertung des Risikos von Test- und Therapieallergenen. Eine Analyse der UAW-Meldungen von 1991bis 2000. *In: Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 44 (2001) S. 709–18

Lund, L.; Henmar, H.; Wurtzen, P. A.; Lund, G.; Hjortskov, N.; Larsen, J. N.: Comparison of allergenicity and immunogenicity of an intact allergen

vaccine and commercially available allergoid products for birch pollen immunotherapy. *In: Clin Exp Allergy* 37 (2007) Nr. 4, S. 564-71

Lundgren, M.; Persson, U.; Larsson, P.; Magnusson, C.; Smith, C. I.; Hammarstrom, L.; Severinson, E.: Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *In: Eur J Immunol* 19 (1989) Nr. 7, S. 1311-5

Macfarlane, A. J.; Kon, O. M.; Smith, S. J.; Zeibecoglou, K.; Khan, L. N.; Barata, L. T.; Mceuen, A. R.; Buckley, M. G.; Walls, A. F.; Meng, Q.; Humbert, M.; Barnes, N. C.; Robinson, D. S.; Ying, S.; Kay, A. B.: Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *In: J Allergy Clin Immunol* 105 (2000) Nr. 1 Pt 1, S. 99-107

Makela, M. J.; Kanehiro, A.; Borish, L.; Dakhama, A.; Loader, J.; Joetham, A.; Xing, Z.; Jordana, M.; Larsen, G. L.; Gelfand, E. W.: IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) Nr. 11, S. 6007-12

Malm, L.; Gerth van Wijk, R.; Bachert, C.: Guidelines for nasal provocations with aspects on nasal patency, airflow, and airflow resistance. International Committee on Objective Assessment of the Nasal Airways, International Rhinologic Society. *In: Rhinology* 38 (2000) Nr. 1, S. 1-6

Mantovani, Alberto; Sica, Antonio; Sozzani, Silvano; Allavena, Paola; Vecchi, Annunciata; Locati, Massimo: The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *In: Trends Immunol* 25 (2004) Nr. 12, S. 677-86

Marone, Gianni: Mast cells and basophils. San Diego [u.a.]: Academic Press, 2000. ISBN: 0124733352

Martin, Ela; O'Sullivan, Brendan; Low, Pauline; Thomas, Ranjeny: Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *In: Immunity* 18 (2003) Nr. 1, S. 155-67

Matsumoto, K.; Narita, S.; Rerecich, T.; Snider, D. P.; O'Byrne, P. M.: Different profile of interleukin-10 production in circulating T cells from atopic asthmatics compared with healthy subjects. *In: Can Respir J* 11 (2004) Nr. 1, S. 33-8

McHugh, S. M.; Deighton, J.; Stewart, A. G.; Lachmann, P. J.; Ewan, P. W.: Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *In: Clin Exp Allergy* 25 (1995) Nr. 9, S. 828-38

Meltzer, E.; Malmstrom, K.; Lu, S.; Prenner, B.; Wei, L.; Weinstein, S. F.; Wolfe, J.; Reiss, T.: Concomitant montelukast and loratadine as treatment for seasonal allergic rhinitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *In: J Allergy Clin Immunol* 105 (2000) Nr. 5, S. 917-22

Menz, G.; Dolecek, C.; Schonheit-Kenn, U.; Ferreira, F.; Moser, M.; Schneider, T.; Suter, M.; Boltz-Nitulescu, G.; Ebner, C.; Kraft, D.; Valenta, R.: Serological and skintest diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet V 1, the major birch pollen allergen. *In: Clin Exp Allergy* 26 (1996) Nr. 1, S. 50-60

Menzel, A.: Trends in phenological phases in Europe between 1951 and 1996. *In: Int J Biometeorol* 44 (2000) Nr. 2, S. 76-81

Meriney, D. K.; Kothari, H.; Chinoy, P.; Grieco, M. H.: The clinical and immunologic efficacy of immunotherapy with modified ragweed extract

(allergoid) for ragweed hay fever. *In: Ann Allergy* 56 (1986) Nr. 1, S. 34-8

Metcalfe, D. D.; Baram, D.; Mekori, Y. A.: Mast Cells. *In: Physiol Rev* 77 (1997) Nr. 4, S. 1033-79

Michils, A.; Mairesse M. ; Ledent, C.; Gossart, B.; Baldassarre, S.; Duchateau, J.: Modified antigenic reactivity of anti-phospholipase A2 IgG antibodies in patients allergic to bee venom: conversion with immunotherapy and relation to subclass expression. *In: J Allergy Clin Immunol* 102 (1998) Nr. 1, S. 118-26

Michils, A.; Baldassarre, S.; Ledent, C.; Mairesse, M. ; Gossart, B. ; Duchateau, J. : Early effect of ultrarush venom immunotherapy on the IgG antibody response. *In: Allergy* 55 (2000) Nr. 5, S. 455-62

Minai-Fleminger, Yael; Levi-Schafer, Francesca: Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *In: Inflamm Res* 58 (2009) Nr. 10, S. 631-8

Mistrello, G.; Harfi, H.; Roncarolo, D.; Kwaasi, A.; Zanoni, D.; Falagiani, P.; Panzani, R.: Date palm pollen allergoid: characterization of its chemical-physical and immunological properties. *In: Int Arch Allergy Immunol* 145 (2008) Nr. 3, S. 224-30

Möbs, Christian; Slotosch, Caroline; Löffler, Harald; Pfützner, Wolfgang; Hertl, Michael: Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. *In: Int Arch Allergy Immunol* 147 (2008) Nr. 3, S. 171-8

Möbs, Christian: Zellulare Mechanismen der Toleranzinduktion unter spezifischer Immuntherapie mit inhalativen Allergenen. Marburg, Philipps-Universitat Marburg (2010)

Mocellin, S.; Marincola, F.; Rossi, C. R.; Nitti, D.; Lise, M.: The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *In: Cytokine Growth Factor Rev* 15 (2004) Nr. 1, S. 61-76

Mock, B. A.; Peiker, G.; Markert, U. R.; Jager, L.: Specific immunotherapy (hyposensitization) with insect venom in pregnancy. *In: Z Geburtshilfe Neonatol* 204 (2000) Nr. 3, S. 117-9

Moll, Ingrid; Jung, Ernst G.; Augustin, Matthias: Dermatologie. Stuttgart: 7., komplett überarb. und erw. Aufl. Aufl. Thieme, 2010. ISBN: 9783131266873

Moller, C.; Dreborg, S.; Ferdousi, H. A..; Halken, S.; Host, A.; Jacobsen, L.; Koivikko, A.; Koller, D. Y.; Niggemann, B.; Norberg, L. A.; Urbanek, R.; Valovirta, E.; Wahn, U.: Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinokonjunktivitis (the PAT-study). *In: J Allergy Clin Immunol* 109 (2002) Nr. 2, S. 251-6

Moore, K. W.; De Waal Malefyt, R.; Coffman, R. L.; O'Garra, A.: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *In: Annu Rev Immunol* 19 (2001) S. 683-765

Moser, M.; Murphy, K. M.: Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *In: Nature Immunol* 1 (2000) Nr. 3, S. 199-205

Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A.; Coffmann, R. L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *In: J Immunol* 136 (1986) Nr. 7, S. 2348-57

Mosmann, Timothy R.; Cherwinski, Holly; Bond, Martha W.; Giedlin, Martin A.; Coffman, Robert L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *In: J Immunol* 175 (2005) Nr. 1, S. 5-14

Mothes, N.; Heinzkill, M.; Drachenberg, K. J.; Sperr, W. R.; Krauth, M. T.; Majlesi, Y.; Semper, H.; Valent, P.; Niederberger, V.; Kraft, D.; Valenta, R.: Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *In: Clin Exp Allergy* 33 (2003) Nr. 9, S. 1198-208

Mothes, Nadine; Valenta, Rudolf: Biology of tree pollen allergens. *In: Curr Allergy Asthma Rep* 4 (2004) Nr. 5, S. 384-90

Motojima, S.; Akutsu, I.; Fukuda, T.; Makino, S.; Takatsu, K.: Clinical significance of measuring levels of sputum and serum ECP and serum IL-5 in bronchial asthma. *In: Allergy* 48 (1993) Nr. 17 Suppl, S. 98-106; discussion 110-1

Moverare, R.; Rak, S.; Elfman, L.: Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy. *In: Allergy* 53 (1998) Nr. 3, S. 275-81

Moverare, R.; Elfman, L.; Bjornsson, E.; Stalenheim, G.: Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy. *In: Immunol Lett* 73 (2000) Nr. 1, S. 51-6

Moverare, Robert; Westritschnig, Kerstin; Svensson, Margareta; Hayek, Brigitte, Bende, Mats, Pauli, Gabrielle; Sorva, Ritva; Haahtela, Tari; Valenta, Rudolf; Elfman, Lena: Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. *In: Int Arch of Allergy Immunol* 128 (2002) Nr. 4, S. 325-35

Muller, U. ; Akdis, C. A. ; Fricker, M. ; Akdis, M. ; Blesken, T.; Bettens, F.; Blaser, K.: Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *In: J Allergy Clin Immunol* 101 (1998) Nr. 6 Pt 1, S. 747-54

Nagato, Toshihiro; Kobayashi, Hiroya; Yanai, Mitsuru; Sato, Keisuke; Aoki, Naoko; Oikawa, Kensuke; Kimura, Shoji; Abe, Yusuke; Celis, Esteban; Harabuchi, Yasuaki; Tateno, Masatoshi: Functional analysis of birch pollen allergen Bet v 1-specific regulatory T cells. *In: J Immunol* 178 (2007) Nr. 2, S. 1189-98

Nakagawa, T.; Takaishi, T.; Sakamoto, Y.; Ito, K.; Miyamoto, T.; Skvaril, F.: IgG4 antibodies in patients with house-dust-mite-sensitive bronchial asthma: relationship with antigen-specific immunotherapy. *In: Int Arch Allergy Appl Immunol* 71 (1983) Nr. 2, S. 122-5

Nieminen, K.; Laaksonen, K.; Savolainen, J.: Three-Year Follow-Up Study of Allergen-Induced in vitro Cytokine and Signalling Lymphocytic Activation Molecule mRNA Responses in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Allergic Rhinitis Patients Undergoing Specific Immunotherapy. *In: Int Arch Allergy Immunol* 150 (2009) Nr. 4, S. 370-376

Niggemann, B.; Jacobsen, L.; Dreborg, S.; Ferdousi, H. A.; Halken, S.; Host, A.; Koivikko, A.; Koller, D.; Norberg, L. A.; Urbanek, R.; Valovirta, E.; Wahn, U.; Moller, C.: Five-year follow-up on the PAT study: specific

immunotherapy and long-term prevention of asthma in children. *In: Allergy* 61 (2006) Nr. 7, S. 855-9

Noon, L.: Prophylactic inoculation of hay fever. *In: Lancet* 177 (1911) Nr. 4580, S.: 1572–1573

Norman, P. S.: Immunotherapy past and present. *In: J Allergy Clin Immunol* 102 (1998) Nr. 1, S. 1-10

Nouri-Aria, Kayhan T.; Wachholz, Petra A.; Francis, James N.; Jacobson, Mikila R.; Walker, Samantha M.; Wilcock, Louisa K.; Staple, Steven Q.; Aalberse, Robert C.; Till, Stephen J.; Durham, Stephen R.: Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *In: J Immunol* 172 (2004) Nr. 5, S. 3252-9

Novembre, Elio; Galli, Elena; Landi, Fabiola; Caffarelli, Carlo; Pifferi, Massimo; De Marco, Emanuela; Burastero, Samuele E.; Calori, Giliola; Benetti, Luca; Bonazza, Paolo; Puccinelli, Paola; Parmiani, Silvano; Bernadini, Roberto; Vierucci, Alberto: Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis. *In: J Allergy Clin Immunol* 114 (2004) Nr. 4, S. 851-7

Nucera, E.; Schiavino, D.; D'Ambrosio, C.; Stabile, A.; Rumi, C.; Gasbarrini, G.; Patriarca, G.: Immunological aspects of oral desensitization in food allergy. *In: Dig Dis Sci* 45 (2000) Nr. 3, S. 637-41

O'Brien, R. M.; Byron, K. A.; Varigos, G. A.; Thomas, W. R.: House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-gamma and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *In: Clin Exp Allergy* 27 (1997) Nr. 1, S. 46-51

O'Garra, Anne; Vieira Pedro L.; Vieira, Paulo; Goldfeld, Anne E.: IL-10–producing and naturally occurring $CD4^+$ Tregs: limiting collateral damage. *In: J Clin Invest* 114 (2004) Nr. 10, S. 1372-8

Oh, Jae-Won; Seroogy, Christine M.; Meyer, Everett H.; Akbari,Omid; Berry, Gerald; Fathman, C. Garrison; DeKruyff, Rosemarie H.; Umetsu, Dale T.: CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *In: J Allergy Clin Immunol* 110 (2002) Nr. 3, S. 460-8

Olikowsky, T.; Wang, Z. Q.; Dudhane, A.; Horowitz, H.; Conti, B.; Hoffmann, M. K.: Two distinct pathways of human macrophage differentiation are mediated by interferon-gamma and interleukin-10. *In: Immunology* 91 (1997) Nr. 1, S. 104-8

Omata, Nemuko; Yasutomi, Motoko; Yamada, Akiko; Iwasaki, Hiromichi; Mayumi, Mitsifumi; Ohshima, Yusei: Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *In: J Immunol* 169 (2002) Nr. 9, S. 4861-6

Oro, A. S.; Guarino, T. J.; Driver, R.; Steinman, L.; Umetsu, D. T.: Regulation of disease susceptibility:decreased prevalence of IgEmediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *In: J Allergy Clin Immunol* 97 (1996) Nr. 6, S. 1402-8

Pajno, G. B.; Barberio, G.; De Luca, F.; Morabito, L.; Parmiani, S.: Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *In: Clin Exp Allergy* 31 (2001) Nr. 9, S. 1392-7

Palframan, R. T.; Collins, P. D.; Severs, N. J.; Rothery, S.; Williams, T. J.; Rankin, S. M.: Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the

bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *In: J Exp Med* 188 (1998) Nr. 9, S. 1621-32

Palma-Carlos, A. G.; Santos, A. S.; Branco-Ferreira, M.; Pregal, A. L.; Palma-Carlos, M. L.; Bruno, M. E.; Falagiani, P.; Riva, G.: Clinical efficacy and safety of preseasonal sublingual immunotherapy with grass pollen carbamylated allergoid in rhinitic patients. A double-blind, placebo-controlled study. *In: Allergol Immunopathol (Madr)* 34 (2006) Nr. 5, S. 194-8

Palomares, Oscar; Yaman, Gorkem; Azkur, Ahmet K.; Akkoc, Tunc; Akdis, Mubeccel; Akdis, Cezmi A.: Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *In: Europ J Immunol* 40 (2010) Nr. 5, S. 1232-40

Passalacqua, G.; Canonica, G. W.: Long-lasting clinical efficacy of allergen specific immunotherapy. *In: Allergy* 57 (2002) Nr. 4, S. 275-6

Passalacqua, G.; Pasquali, M.; Ariano, R.; Lombardi, C.; Giardini, A.; Baiardini, I.; Majani, G.; Falagiani, P.; Bruno, M.; Canonica, G. W.: Randomized double-blind controlled study with sublingual carbamylated allergoid immunotherapy in mild rhinitis due to mites. *In: Allergy* 61 (2006) Nr. 7, S. 849-54

Paul, William E.: Fundamental immunology. Philadelphia [u.a.]: 4. ed. Aufl. Lippincott-Raven, 1999. - 0781714125

Pauli, G.; Oster, J. P.; Deviller, P.; Heiss, S.; Bessot, J. C.; Susani, M.; Ferreira, F.; Kraft, D.; Valenta, R.: Skin testing with recombinant allergens rBet v 1 and birch profilin, rBet v 2: Diagnostic value for birch pollen and associated allergies. *In: J Allergy Clin Immunol* 97 (1996) Nr. 5, S. 1100-9

Pearce, E. J.; Caspar, P.; Grzych, J. M.; Lewis, F. A.; Sher, A.: Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, Schistosoma mansoni. *In: J Exp Med* 173 (1991) Nr. 1, S. 159-66

Pereira-Santos, M. C.; Baptista, A. P.; Melo, A.; Alves, R. R.; Soares, R. S.; Pedro, E.; Pereira-Barbosa, M.; Victorino, R. M. M.; Sousa, A. E.: Expansion of circulating Foxp3+)D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *In: Clin Exp Allergy* 38 (2008) Nr. 2, S. 291-7

Peternel, Renata; Srnec, Lidija; Culig, Josip; Zaninovic, Ksenija; Mitic, Bozena; Vukusic, Ivan: Atmospheric pollen season in Zagreb (Croatia) and its relationship with temperature and preciptation. *In: Int J Biometerol* 48 (2004) Nr. 4, S. 186-91

Pfaar, Oliver; Anders, Clemens; Klimek, Ludger: Clinical outcome measures of specific immunotherapy. *In: Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9 (2009) Nr. 3, S. 208-13

Pfaar, O.; Urry, Z.; Robinson, D. S.; Sager, A.; Richards, D.; Hawrylowicz, C. M.; Bräutigam, M.; Klimek, L.: A randomized placebo-controlled trial of rush preseasonal depigmented polymerized grass pollen immunotherapy. *In: Allergy* 67 (2012) Nr. 2, S. 272-9

Pierkes, M.; Bellinghausen, I.; Hultsch, T.; Metz, G.; Knop, J.; Saloga, J.: Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *In: J Allergy Clin Immunol* 103 (1999) Nr. 2 Pt 1, S. 326-32

Pilette, C.; Nouri-Aria, K. T.; Jacobson, M. R.; Wilcock, L. K.; Detry, B.; Walker, S. M.; Francis, J. N.; Durham, S. R.: Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *In: J Immunol* 178 (2007) S. 4658-4666.

Platts-Mills, Thomas A. E.; Cooper, Philip J.: Differences in asthma between rural and urban communities in South Africa and other developing countries. *In: J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) Nr. 1, S. 106-7

Pretolani, M.; Goldman, M.: IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? *In: Immunol Today* 18 (1997) Nr. 6, S. 277-80

Punnonen, J.; de Waal Malefyt, R.; van Vlasselaer, P.; Gauchat, J. F.; de Vries, J. E.: IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *In: J Immunol* 151 (1993) Nr. 3, S. 1280-9

Punnonen, J.; Aversa, G.; Cocks, B. G.; McKenzie, A. N.; Menon, S.; Zurawski, G.; de Waal Malefyt, R.; de Vries, J. E.: Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) Nr. 8, S. 3730-4

Punnonen, J.; Yssel, H.; de Vries, J. E.: The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *In: J Allergy Clin Immunol* 100 (1997) Nr. 6 Pt 1, S. 792-801

Purello-D'Ambrosio, F.; Gangemi, S.; Merendino, R. A.; Isola, S.; Puccinelli, P.; Parmiani, S.; Ricciardi, L.: Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *In: Clin Exp Allergy* 31 (2001) Nr. 8, S. 1295-302

Quinn, T. J.; Taylor, S.; Wohlford-Lenane, C. L.; Schwartz, D. A.: IL-10 reduces grain dust-induced airway inflammation and airway hyperreactivity. *In: J Appl Physiol* 88 (2000) Nr. 1, S. 173-9

Radulovic, Suzana; Jacobson, Mikila R.; Durham, Stephen R.; Nouri-Aria, Kayhan T.: Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *In: J Allergy Clin Immunol* 121 (2008) Nr. 6, S. 1467-72

Randolph, D. A.; Carrutthers, C. J.; Szabo, S. J.; Murphy, K. M.; Chaplin, D. D.: Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *In: J Immunol* 162 (1999) Nr. 4, S. 2375-83

Ranger, A. M.; Das, M. P.; Kuchroo, V. K.; Glimcher, L. H.: B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. *In: Int Immunol* 8 (1996) Nr. 10, S. 1549-60

Reid, Colleen E.; Gamble, Janet L.: Aeroallergens, allergic disease, and climate change: impacts and adaptation. *In: Eco Health* 6 (2009) Nr. 3, S. 458-70

Renauld, J. C.; Kermouni, A.; Vink, A.; Louahed, J.; Van Snick, J.: Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *In: J Leukoc Biol* 57 (1995) Nr. 3, S. 353-60

Renz, H.: The central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation. *In: Exp Dermatol* 4 (1995) Nr. 4 Pt 1, S. 173-82

Riffo-Vasquez, Y.; Pitchford, S.; Spina, D.: Murine models of inflammation: role of CD23. *In: Allergy* 55 Suppl 61 (2000) S. 21-6

Rihet, P. ; Demeure, C. E. ; Dessein, A. J. ; Bourgois, A. : Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new

methodology in subjects from a S. mansoni endemic area. *In: Eur J Immunol* 22 (1992) Nr. 8, S. 2063-70

Ring, J.; Kramer, U.; Schafer, T.; Behrendt, H.: Why are allergies increasing? *In: Curr Opin Immunol* 13 (2001) Nr. 6, S. 701-8

Romagnani, S.: Type 1 T-helper and type 2 T-helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *In: Int J Clin Lab Res* 21 (1991) Nr. 2, S. 152-8

Romagnani, S.: Lymphokine production by human T cells in disease states. *In: Annu Rev Immunol* 12 (1994) S. 227-57

Romagnani, S.: Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *In: Curr Opin Immunol* 6 (1994) Nr. 6, S. 838-46

Rosewich, M.; Schulze, J.; Eickmeier, O.; Telles, T.; Rose, M. A.; Schubert, R.; Zielen, S.: Tolerance induction after specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A in children. *In: Clin Exp Immunol* 160 (2010) Nr. 3, S. 403-10

Ross, R. N.; Nelson, H. S.; Finegold, I.: Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *In: Clin Ther* 22 (2000) Nr. 3, S. 342-50

Rotrosen, Daniel; Matthews, Jeff B.; Bluestone, Jeffrey A.: The Immune Tolerance Network: A new paradigm for developing tolerance-inducing therapies. *In: J Allergy Clin Immunol* 110 (2002) Nr. 1, S. 17-23

Rousset, F.; Garcia, E.; Defrance, T.; Peronne, C.; Vezzio, N.; Hsu, D. H.; Kastelein, R.; Moore, K. W.; Banchereau, J.: Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) Nr. 5, S. 1890-3

Royer, B.; Varadaradjalou, S.; Saas, P.; Guillosson, J. J.; Kantelip, J. P.; Arock, M.: Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *In: Clin Exp Allergy* 31 (2001) Nr. 5, S. 694-704

Rueff, F.; Przybilla, B.; Fuchs, T.; Gall, H.; Rakoski, J.; Stolz, W.; Vieluf, D.: Diagnose und Therapie der Bienen und Wespengiftallergie. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAI). *In: Allergo J* 9 (2000) S. 458–472

Sack, Ulrich: Zelluläre Diagnostik. Basel [u.a.]: Karger, 2007. ISBN: 3805579284

Sad, S.; Marcotte, R.; Mosmann, T. R.: Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *In: Immunity* 2 (1995) Nr. 3, S. 271-9

Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M.; Toda, M.: Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *In: J Immunol* 155 (1995) Nr. 3, S. 1151-64

Sakaguchi, Shimon; Hori, Shohei; Fukui, Yoshinori; Sasazuki, Takehiko; Sakaguchi, Noriko; Takahashi, Takeshi: Thymic generation and selection of CD25+CD4+ regulatory T cells: implications of their broad repertoire and high selfreactivity for the maintenance of immunological selftolerance. *In: Novartis Found Symp* 252 (2003) S. 6-16; discussion 16-23, 106-14

Sakaguchi, Shimon; Yamaguchi, Tomoyuki ; Nomura, Takashi ; Ono, Masahiro: Regulatory T cells and immune tolerance. *In: Cell* 133 (2008) Nr. 5, S. 775-87

Sallusto, F.; Cella, M.; Danieli, C.; Lanzavecchia, A.: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *In: J Exp Med* 182 (1995) Nr. 2, S. 389-400

Satoguina, Judith S.; Weyand, Esther; Larbi, John; Hoerauf, Achim: T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *In: J Immunol* 174 (2005) Nr. 8, S. 4718-26

Scadding, G. W.; Shamji, M. H.; Jacobson, M. R.; Lee, D. I.; Wilson, D.; Lima, M.T.; Pitkin, L.; Pilette, C.; Nouri-Aria, K.; Durham, S.R.: Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *In: Clin Exp Allergy* 40 (2010), Nr. 4, S. 598-606

Schappi, G. F.; Suphioglu, C.; Taylor, P. E.; Knox, R. B.: Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *In: J Allergy Clin Immunol* 100 (1997) Nr. 5, S. 656-61

Schaub, B.: Allergietestung. In: Monatsschr. Kinderheilkd. 158 (2010) Nr. 1, S. 71-86

Schauer, Uwe; Stemberg, Frank; Rieger, Christian H. L.; Borte, Michael; Schubert, Simone; Riedel, Frank; Herz, Udo; Renz, Harald; Wick, Manfred; Carr-Smith, Hugh D.; Bradwell, Arthur R.; Herzog, Wilhelm: IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents. In: *Clin Chemistry* 49 (2003) Nr. 11, S. 1924-9

Schlaeger, M.; Pullmann, H.; Gottmann-Luckerath, I.: Zur diagnostischen Aussagekraft der RAST-Klassen bei verschiedenen Allergenen. *In: Zeitschr Hautkr* 52 (1977) Nr. 22, S. 1142-6

Schmidt-Weber, Carsten B.; Blaser, Kurt: Immunological mechanisms in specific immunotherapy. *In: Springer Semin Immunopathol* 25 (2004) Nr. 3-4, S. 377-90

Schmidt-Weber, Carsten B.; Blaser, Kurt: The role of the FOXP3 transcription factor in the immune regulation of allergic asthma. *In: Curr Allergy Asthma Rep* 5 (2005) Nr. 5, S. 356-61

Schramm, Christoph; Huber, Samuel; Protschka, Martina; Czochra, P.; Burg, Jurgen; Schmitt, Edgar; Lohse, Ansgar W.; Galle, Peter R.; Blessing, Manfred: TGFbeta regulates the CD4+CD25+ Tcell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *In: Int Immunol* 16 (2004) Nr. 9, S. 1241-9

Schwartz, Ronald H.: T cell anergy. *In: Annu Rev Immunol* 21 (2003) S. 305-34

Seddiki, Nabila; Santner-Nanan, Brigitte; Martinson, Jeff; Zaunders, John; Sasson, Sarah; Landay, Alan; Solomon, Michael; Selby, Warwick; Alexander, Stephen I.; Nanan, Ralph; Kelleher, Anthony; Fazekas de st Groth, Barbara: Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *In: J Exp Med* 203 (2006) Nr. 7, S. 1693-700

Seder, R. A.; Paul, W. E.; Davis, M. M.; Fazekas de st Groth, B.: The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-

producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *In: J Exp Med* 176 (1992) Nr. 4, S. 1091-8

Segura, J. A.; Assenmacher, M.; Irsch, J.; Hunzelmann, N.; Radbruch, A.: Systemic T-cell unresponsiveness during rush bee-venom immunotherapy. *In: Allergy* 53 (1998) Nr. 3, S. 233-40

Senna, Gianenrico; Ridolo, Erminia; Calderon, Moises; Lombardi, Carlo; Canonica, Giorgio W.; Passalacqua, Giovanni: Evidence of adherence to allergen-specific immunotherapy. *In: Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9 (2009) Nr. 6, S. 544-8

Seo, N.; Tokura, Y.; Takigawa, M.; Egawa, K.: Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. *In: J Immunol* 163 (1999) Nr. 1, S. 242-9

Shevach, Ethan M.: CD4+CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. *In: Nat Rev Immunol* 2 (2002) Nr. 6, S. 389-400

Snijders, A.; Kalinski, P.; Hilkens, C. M.; Kapsenberg, M. L.: High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *In: Int Immunol* 10 (1998) Nr. 11, S. 1593-8

Snijdewint, F. G.; Kalinski, P.; Wierenga, E. A.; Bos, J. D.; Kapsenberg, M. L.: Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *In: J Immunol* 150 (1993) Nr. 12, S. 5321-9

Sornasse, T.; Larenas, P. V.; Davis, K. A.; de Vries, J. E.; Yssel, H.: Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *In: J Exp Med* 184 (1996) Nr. 2, S. 473-83

Spieksma, F. Z. M.; Corden, J. M.; Detandt, M.; Millington, W. M.; Nikkels, H.; Nolard, N.; Schoenmakers, C. H. H.; Wachter, R.; de Weger, L. A.; Willems, R.; Emberlin, J.: Quantitative trends in annual totals of five common airborne pollen types (Betula, Quercus, Poaceae, Urtica and Artemisia), at five pollen-monitoring stations in western Europe. *In: Aerobiologia* 19 (2003) S. 171-184

Spriggs, M. K.; Armitage, M. J.; Strockbine, L.; Clifford, K. N.; Macduff, B. M.; Sato, T. A.; Maliszewki, C. R.; Franslow, W. J. C.: Recombinant human CD 40 ligand stimulates B cell proliferation and Immunglobulin E secretion. *In: J Exp Med* 176 (1992) Nr. 6, S. 1543-50

Steinbrink, Kerstin; Graulich, Edith; Kubsch, Sebastian; Knop, Jurgen; Enk, Alexander H.: CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific supressor activity. *In: Blood* 99 (2002) Nr. 7, S. 2468-76

Stephens, L. A.; Mottet, C.; Mason, D.; Powrie, F.: Human CD4 (+) CD25 (+) thymocyte and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *In: Eur J Immunol* 31 (2001) Nr. 4, S. 1247-54

Stevens, W. J.; Ebo, D. G.; De Clerck, L. S.; Bridts, C. H.; De Gendt, C. M.; Mertens, A. V.: Evolution of lymphocyte transformation to wasp venom antigen during immunotherapy for wasp venom anaphylaxis. *In: Clin Exp Allergy* 28 (1998) Nr. 2, S. 249-52

Stewart, G. E.; Lockey, R. F.: Systemic reactions from allergen immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 90 (1992) Nr. 4 Pt 1, S. 567-78

Strait, Richard T.; Morris, Suzanne C.; Finkelman, Fred D.: IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. *In: J Clin Invest* 116 (2006) Nr. 3, S. 833-41

Strassen, M.; Schmitt, E.; Jonuleit, H.: Human CD4 (+) CD25 (+) regulatory T cells and infections tolerance. *In: Transplantation* 77 (2004) Nr. 1, S. 23-5

Street, N. E.; Mosmann, T. R.: Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *In: FASEB J* 5 (1991) Nr. 2, S. 171-7

Suri-Payer, E.; Cantor, H.: Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4+CD25+ T cells. *In: J Autoimmun* 16 (2001) Nr. 2, S. 115-23

Sutton, B. J.; Gould, H. J.: The human IgE network. *In: Nature* 366 (1993) Nr. 6454, S. 421-8

Tada, T.; Takemori, T.; Okumura, K.; Nonaka, M.; Tokuhisa, T.: Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *In: J Exp Med* 147 (1978) Nr. 2, S. 446-58

Takahashi, T.; Kuniyasu, Y.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Itoh, M.; Iwata, M.; Shimizu, J.; Sakaguchi, S.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *In: Int Immunol* 10 (1998) Nr. 12, S. 1969-80

Tanaka, H.; Demeure, C. E.; Rubio, M.; Delespesse, G.; Sarfati, M.: Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *In: J Exp Med* 192 (2000) Nr. 3, S. 405-12

Tang, M. L.; Kemp, A. S.; Thorburn, J.; Hill, D. J.: Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *In: Lancet* 344 (1994) Nr. 8928, S. 983-5

Taylor, P. A.; Noelle, R. J.; Blazar, B. R.: CD4 (+) CD25 (+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *In: J Exp Med* 193 (2001) Nr. 11, S. 1311-8

Taylor, Alison; Verhagen, Johan; Blaser, Kurt; Akdis, Mubeccel: Akdis, Cezmi A.: Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-ß: the role of T regulatory cells. *In: Immunol* 117 (2006) Nr. 4, S. 433-42

Thornton, A. M.; Shevach, E. M.: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *In: J Exp Med* 188 (1998) Nr. 2, S. 287-96

Thunberg, S.; Akdis, M.; Akdis, C. A.; Gronneberg, R.; Malmstrom, V.; Trollmo, C.; Van Hahe, M.; Gafvelin, G.: Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *In: Clin Exp Allergy* 37 (2007) Nr. 8, S. 1127-36

Till, S.; Walker, S.; Dickason, R.; Huston, D.; O'Brien, F.; Lamb, J.; Kay, A. B.; Corrigan, C.; Durham, S.: IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *In: Clin Exp Immunol* 110 (1997) Nr. 1, S. 114-21

Traidl-Hoffmann, Claudia; Mariani, Valentina; Hochrein, Hubertus; Karg, Kathrin; Wagner, Hermann; Ring, Johannes; Mueller, Martin J.; Jakob,

Thilo; Behrendt, Heidrun: Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *In: J Exp Med* 201 (2005) Nr. 4, S. 627-36

Trinchieri, G.: Interleukin-12 : a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *In: Annu Rev Immunol* 13 (1995) S. 251-76

Tseng, S.H.; Fu, L. S.; Nong, B. R.; Wenig, J. D.; Shyur, S.D.: Changes in serum specific IgG4 and IgG4/ IgE ratio in mite-sensitized Taiwanese children with allergic rhinitis receiving short-term sublingualswallow immunotherapy: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *In: Asian Pac J Allergy Immunol* 26 (2008) Nr. 26, S. 105-12.

Urbanek, R.; Kemeny, D. M.; Richards, D.: 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. *In: Clin Allergy* 16 (1986) Nr. 4, S. 317-22

Valovirta, E.; Jacobsen, L.; Ljorring, C.; Koivikko, A.; Savolainen, J.: Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children. *In: Allergy* 61 (2006) Nr. 10, S. 1177-83

Van Agthoven, Andre; Jarrossay, David: Neue Reagenzien und Methoden zur Lyse von Erythrozyten. *In: Patentblatt* (2004), Patentnummer: DE69906859T2

Van der Giessen, M.; Homan, W. L.; Van Kernbeek, G.; Aalberse, R. C.; Dieges, P. H.: Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *In: Int Arch Allergy Appl Immunol* 50 (1976) Nr. 5, S. 625-40

Van der Neut Kolfschoten, Marijn; Schuurman, Janine; Losen, Mario; Bleeker, Wim K.; Martinez-Martinez, Pilar; Vermeulen, Ellen; Den Bleker, Tamara H.; Wiegman, Luus; Vink, Tom; Aarden, Lucien A.; De Baets, Marc H.; Van De Winkel, Jan G. J.; Aalberse, Rob C.; Parren, Paul W. H. I.: Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *In: Science* 317 (2007) Nr. 5844, S. 1554-7

Van Neerven, R. J.; Wikborg, T.; Lund, G.; Jacobsen, B.; Brinch-Nielsen, A.; Arnved, J.; Ipsen, H.: Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *In: J Immunol* 163 (1999) Nr. 5, S. 2944-52

Van Neerven, R. J. J.; Arvidsson, M.; Ipsen, H.; Sparholt, S. H.; Rak, S.; Wurtzen, P. A.: A double-blind, placebo-controlled birch allergy vaccination study: inhibition of CD23-mediated serum-immunoglobulin E-facilitated allergen presentation. *In: Clin Exp Allergy* 34 (2004) Nr. 3, S. 420-8

Van Ree, R.; Van Leeuwen, W. A.; Dieges, P. H.; Van Wijk, R. G.; De Jong, N.; Brewczyski, P. Z.; Kroon, A. M.; Schilte, P. P.; Tan, K. Y.; Simon-Licht, I. F.; Roberts, A. M.; Stapel, S. O.; Aalberse, R. C.: Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *In: Clin Exp Allergy* 27 (1997) Nr. 1, S. 68-74

Van Ree, R.; Yazdanbakhsh, M.: Allergic disorders in African countries: linking immunology to accurate phenotype. *In: Allergy* 62 (2007) Nr. 3, S. 237-46

Varney, V. A.; Gaga, M.; Frew, A. J.; Aber, V. R.; Kay, A. B.; Durham, S. R.: Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay

fever uncontrolled by antiallergic drugs. *In: BMJ* 302 (1991) Nr. 6771, S. 265-9

Varney, V. A.; Hamid, Q. A.; Gaga, M.; Ying, S.; Jacobson, M.; Frew, A. J.; Kay, A. B.; Durham, S. R.: Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *In: J Clin Invest* 92 (1993) Nr. 2, S. 644-51

Varney, V. A.; Edwards, J.; Tabbah, K.; Brewster, H.; Mavroleon, G.; Frew, A.J.: Clinical efficacy of specific immunotherapy to cat dander: a double-blind placebo-controlled trial. *In: Clin Exp Allergy* 27 (1997) Nr. 8, S. 860-7

Varney, M. L.; Ino, K.; Ageitos, A. G.; Heimann, D. G.; Talmadge, J. E.; Singh, R. K.: Expression of interleukin-10 in isolated CD8+ T cells and monocytes from growth factor-mobilized peripheral blood stem cell products: a mechanism of immune dysfunction. *In: J Interferon Cytokine Res* 19 (1999) Nr. 4, S. 351-60

Vercelli, D.; De Monte, L.; Monticelli, S.; Di Bartolo, C.; Agresti, A.: To E or not to E? Can an IL-4-induced B cell choose between IgE and IgG4? *In: Int Arch Allergy Immunol* 116 (1998) Nr. 1, S. 1-4

Vieira, Pedro L.; Kalinski, Pawel; Wierenga, Eddy A.; Kapsenberg, Martien; De Jong, Esther C.: Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *In: J Immunol* 161 (1998) Nr. 10, S. 5245-51

Vieira, P. L.; De Jong, E. C.; Wierenga, E. A.; Kapsenberg, M. L.; Kalinski, P.: Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *In: J Immunol* 164 (2000) Nr. 9, S. 4507-12

Von Baehr, V.; Hermes, A.; Von Baehr, R.; Scherf, H. P.; Volk, H. D.; Fischer von Weikersthal-Drachenberg, K. J.; Woroniecki, S.: Allergoid-specific T-cell reaction as a measure of the immunological response to specific immunotherapy (SIT) with a Th1-adjuvanted allergy vaccine. *In: J Invest Allergol Clin Immunol* 15 (2005) Nr. 4, S. 234-41

Wachholz, Petra A.; Soni, Nanna Kristensen; Till, Stephen J.; Durham, Stephen R.: Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *In: J Allergy Clin Immunol* 112 (2003) Nr. 5, S. 915-22

Wachholz, Petra a.; Durham, Stephen R.: Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *In: Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4 (2004) Nr. 4, S. 313-8

Wahn, Ulrich; Bachert, Claus: Pädiatrische Allergologie und Immunologie. München [u.a.]: 4., neu bearb. und erw. Aufl. Elsevier, Urban und Fischer, 2005. ISBN: 3437213113

Wan, S.; LeClerc, J. L.; Schmartz, D.; Barvais, L.; Huynh, C. H.; Deviere, J.; DeSmet, J. M.; Vincent, J. L.: Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *In: Am Heart J* 133 (1997) Nr. 3, S. 335-9

Wang, Hui; Barrenas, Fredrik; Bruhn, Soren; Mobini, Reza; Benson, Mikael: Increased IFN-gamma activity in seasonal allergic rhinitis is decreased by corticosteroid treatment. *In: J Allergy Clin Immunol* 124 (2009) Nr. 6, S. 1360-2

Wang, Jun; Ioan-Facsinay, Andreea; Van der Voort, Ellen I. H.; Huizinga, Tom W. J.; Toes, Rene E. M.: Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *In: Europ J Immunol* 37 (2007) Nr. 1, S. 129-38

Wanidworanun, C.; Strober, W.: Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *In: J Immunol* 151 (1993) Nr. 12, S. 6853-61

Weiner, H. L.: Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *In: Immunol Rev* 182 (2001) S. 207-14

Weiner, H. L.: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-typ TGF-beta-secreting regulatory cells. *In: Microbes Infect* 3 (2001) Nr. 11, S. 947-54

Welte, T.: Zytokine und obstruktive Atemwegserkrankungen. *In: Der Internist* 42 (2001) S. 64-74

Whelan, M.; Harnett, M. M.; Houston, K. M.; Patel, V.; Harnett, W.; Rigley, K. P.: A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *In: J Immunol* 164 (2000) Nr. 12, S. 6453-60

Williams, A. P.; Krishna, M. T.; Frew, A. J.: The safety of immunotherapy. *In: Clin Exp Allergy* 34 (2004) Nr. 4, S. 513-4

Williams, A.; Henzgen, M.; Rajakulasingam, K.: Additional benefit of a third year of specific grass pollen allergoid immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinitis. *In: Eur Ann Allergy Clin Immunol* 39 (2007) Nr. 4, S. 123-6

Wilson, D. R.; Irani, A. M.; Walker, S. M.; Jacobson, M. R.; Mackay, I. S.; Schwartz, L. B.; Durham, S. R.: Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *In: Clin Exp Allergy* 31 (2001) Nr. 11, S. 1705-13

Wing, Kajsa; Sakaguchi, Shimon: Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy. *In: Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6 (2006) Nr. 6, S. 482-8

Wong, C. W.; Ho, C. Y.; Ko, F. W. S.; Chan, C. H. S.; Ho, A. S. S.; Hui, D. S. C.; Lam, C. W. K.: Proinflammatory cytocines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-γ, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *In: Clin Exp Immunol* 125 (2001) Nr. 2, S. 177-83

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *In: Lancet* 351 (1998) Nr. 9111, S. 1225-32

Wu, Kui; Bi, Yutian; Sun, Kun; Wang, Changzheng: IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *In: Cell Molecul Immunol* 4 (2007) Nr. 4, S. 269-75

Wurtzen, Peter Adler; Lund, Lise; Lund, Gitte; Holm, Jens; Millner, Anders; Henmar, Helene: Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity. *In: Int Arch Allergy Immunol* 144 (2007) Nr. 4, S. 287-95

Yamagiwa, S.; Gray, J. D.; Hashimoto, S.; Horwitz, D. A.: A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *In: J Immunol* 166 (2001) Nr. 12, S. 7282-9

Yamanaka, Kei-ichi; Yuta, Atsushi; Kakada, Masato; Sasaki, Ryogen; Kitagawa, Hiroshi; Gabazza, Esteban C.; Okubo, Kimihiro; Kurokawa, Ichiro; Mizutani, Hitoshi: Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *In: J Allergy Clin Immunol* 124 (2009) Nr. 4, S. 842-5

Yanagida, M.; Fukamachi, H.; Ohgami, K.; Kuwaki, T.; Ishii, H.; Uzumaki, H.; Amano, K.; Tokiwa, T.; Mitsui, H.; Saito, H.; Iikura, Y.; Ishizaka, T.; Nakahata, T.: Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. *In: Blood* 86 (1995) Nr. 10, S. 3705-14

Yoshida, T.; Ikuta, K.; Sugaya, H.; Maki, K.; Tadagi, M.; Kanazawa, H.; Sunaga, S.; Kinaxhi, T.; Yoshimura, K.; Miyazaki, H.; Takaki, S.; Tadatsu, K.: Defective B-1 cell development and impaired immunity against Angiostrongylus cantonensis in IL-5R alpha-deficient mice. *In: Immunity* 4 (1996) Nr. 5, S. 483-94

Yu, P.; Kosco-Vilbois, M.; Richards, M.; Kohler, G.; Lamers, M. C.: Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *In: Nature* 369 (1994) Nr. 6483, S. 753-6

Zhang, Z. X.; Yang, L.; Young, K. J.; Dutemple, B.; Zhang, L.: Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *In: Nat Med* 6 (2000) Nr. 7, S. 782-9

Zhou, Xiaoxia; Schmidtke, Peter; Zepp, Fred; Meyer, Claudius U.: Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. *In: Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5 (2005) Nr. 4, S. 465-75

Zissel, G.; Schlaak, J.; Schlaak, M.; Muller-Quernheim, J.: Regulation of cytokine release by alveolar macrophages treated with interleukin-4, interleukin-10, or transforming growth factor beta. *In: Eur Cytokine Netw* 7 (1996) Nr. 1, S. 59-66

Zwacka, G.; Markert, U. R.: Therapeutic procedures of sublingual immunotherapy in clinical practice. *In: Chem Immunol Allergy* 82 (2003) S. 44-52

# 8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

## 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktion einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit einer naiven $CD4^+$ T-Zelle ..... 03
Abbildung 2: Einfluss des Zytokinmilieus auf die Entwicklung dendritischer Zellen (DC) ..... 10
Abbildung 3: Interleukin (IL) 10-Wirkung auf Monozyten und Makrophagen ..... 17
Abbildung 4: Interleukin (IL) 10-Wirkung auf antigenpräsentierende Zellen (APC) ..... 18
Abbildung 5: Dosierschema von Depigoid® ..... 29
Abbildung 6: Herstellungsschritte von Depigoid® ..... 30
Abbildung 7: Dichtezentrifugation mittels Ficoll ..... 41
Abbildung 8: Prinzip des *Enzyme-linked Immunospot* (ELISPOT) *Assay* 48
Abbildung 9: Ergebnisse des Klinischen Score A, subjektive Einschätzung des aktuellen Schweregrades der allergischen Erkrankung ..... 51
Abbildung 10: Ergebnisse des Medikamentenscores innerhalb der Birkenpollensaisons ..... 52
Abbildung 11: Ergebnisse des Pricktests ..... 53
Abbildung 12: Ergebnisse der Messung des Birkenpollen-spezifischen Immunglobulin E (in kU/l) ..... 54
Abbildung 13: Ergebnisse der Messung des Bet v 1-spezifischen Immunglobulin E (in kU/l) ..... 55
Abbildung 14: Ergebnisse der Messung des Gesamt-Immunglobulin E (in kU/l) ..... 56
Abbildung 15: Ergebnisse der Messung des Birkenpollen-spezifischen Immunglobulin G4 (in $mg_A$/l) ..... 57
Abbildung 16: Ergebnisse der Berechnung des Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnisses ..... 58

Abbildung 17: Ergebnisse der Berechnung des Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnisses in logarithmischer Darstellung ..... 58
Abbildung 18: Ergebnisse der Durchflusszytometrie ..... 59
Abbildung 19: Ergebnisse des Proliferationsassays, Übersicht über die Stimulationsindices ..... 60
Abbildung 20: Verlauf der Bet v 1-spezifischen T-Helfer 2-Zellfrequenzen unter der spezifischen Immuntherapie ..... 61
Abbildung 21: Verlauf der Typ 1 regulatorischen T-Zellfrequenzen unter der spezifischen Immuntherapie ..... 62
Abbildung 22: Verlauf der T-Helfer 1-Zellfrequenzen unter der spezifischen Immuntherapie ..... 63
Abbildung 23: Verlauf des T-Helfer 2 / T-Helfer 1-Zellverhältnisses unter der spezifischen Immuntherapie ..... 64
Abbildung 24: Verlauf des T-Helfer 2 / Typ 1 regulatorische T-Zellverhältnisses unter der spezifischen Immuntherapie .. 65
Abbildung 25: Rolle der antigenpräsentierenden Zelle (APC) bei der spezifischen Immuntherapie ..... 67
Abbildung 26: Wirkung regulatorischer T-Zellen (Treg) bei der spezifischen Immuntherapie ..... 68

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Allergietypen nach Coombs und Gell ..... 02
Tabelle 2: Charakteristische Zytokine für T-Helfer (Th 1)- und Th2-Zellen ..... 09
Tabelle 3: *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) als Einflussfaktoren auf die Entwicklung dendritischer Zellen .. 11
Tabelle 4: *Radioallergosorbent test* (RAST)-Klassen ..... 21
Tabelle 5: Stufentherapie des Asthma bronchiale ..... 24
Tabelle 6: Übersicht über die an der Studie teilnehmenden Patienten und der Untersuchungszeitpunkte ..... 34

Tabelle 7: Häufig verwendete Fluoreszenzfarbstoffe bei durchflusszytometrischen Messungen ..... 44
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei der Durchflusszytometrie ..... 45
Tabelle 9: Verwendete Antigene für den Proliferationsassay ..... 46
Tabelle 10: Beurteilung der Aussagekraft des Gesamt-Immunglobulin E-Spiegels ..... 55
Tabelle 11: Ergebnisse der Messung des birkenpollenspezifischen Immunglobulin E (in kU/l) ..... 84
Tabelle 12: Ergebnisse der Messung des Bet v 1-spezifischen Immunglobulin E (in kU/l) ..... 84
Tabelle 13: Ergebnisse der Messung des Gesamt-Immunglobulin E (in kU/l) ..... 84
Tabelle 14: Ergebnisse der Messung des birkenpollenspezifischen Immunglobulin G4 (in $mg_A$/l) ..... 85
Tabelle 15: Ergebnisse der Berechnung des Immunglobulin E / Immunglobulin G4-Verhältnisses ..... 85
Tabelle 16: Ergebnisse des Pricktests ..... 85
Tabelle 17: Ergebnisse der Durchflusszytometrie ..... 86
Tabelle 18: Ergebnisse des Proliferationsassays (in *counts per minute*) 86
Tabelle 19: Ergebnisse des Proliferationsassays (angegeben als Stimulationsindices) ..... 87
Tabelle 20: Ergebnisse des ELISPOTs für Interleukin 5 ..... 87
Tabelle 21: Ergebnisse des ELISPOTs für Interleukin 10 ..... 87
Tabelle 22: Ergebnisse des ELISPOTs für Interferon γ ..... 88
Tabelle 23: Ergebnisse des ELISPOTs für das Verhältnis von Th2- zu Th1-Zellen ..... 88
Tabelle 24: Ergebnisse des ELISPOTs für das Verhältnis von Th2- zu Tr1-Zellen ..... 88

# 9 LEBENSLAUF

Die Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

# 10 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren, Doktoren und Dozenten

In Marburg:

Alter, Aumuller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behr, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhart-Cabillic, Feuser, Figiel, Fuchs-Winkelmann, Funk, C. Görk, K. Görk, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hamer, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hoyer, Jerrentrupp, Kalinowski, Kann, Kanngieser, Kill, Klenk, Klingmuller, Klose, König, Kolb-Niemann, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Krones, Kuhn, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Maier, Mandrek, Martin, Meier, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Rise, Röhm, Röper, Rominger, Rothmund, Ruchholtz, H. Schafer, J. Schafer, Schlosser, Schmidt, Seitz, Steiniger, Steinkamp, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zovko.

# 11 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Hertl für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und Verfügungstellung aller nötigen Materialen danken.
Herrn PD Dr. W. Pfützner danke ich für viele fachliche Anregungen und Diskussionsanreize.
Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Christian Möbs bedanken für seine unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft mich in die wissenschaftliche Arbeit im Labor einzuführen und jederzeit Fragen zu beantworten. Ohne ihn und seine hervorragende Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Darüber hinaus möchte ich allen weiteren Mitarbeitern der dermatologischen Forschungsabteilung im Biomedizinischen Forschungszentrum danken, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.
Ebenfalls danke ich den ärztlichen und wissenschaftlichen Mitarbeiter der allergologischen Ambulanz der Hautklinik Marburg. Mein besonderer Dank gilt Frau Wagenknecht und Frau Weimer für die hervorragende Koordination, hilfreiche telefonische Auskünfte und Hilfe in allen Problemlagen.
Bei an dieser Studie teilnehmenden Patienten bedanke ich mich für ihre Teilnahme an den verschiedenen Untersuchungen, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.
Für eine gute Zusammenarbeit, viel gegenseitige Unterstützung sowie viel gemeinsamen Spaß im Labor möchte ich meiner Kollegin Karolin Ruge danken.
Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Happel für die Mithilfe bei der Bestimmung der allergenspezifischen Antikörper.
Großer Dank gilt auch all meinen Freunden und ehemaligen Mitbewohnern, die immer wieder Teile der Arbeit korrektur gelesen haben und mich mit neuer Literatur versorgt haben.
Besonders danke ich meinen Eltern, die meinen beruflichen Werdegang immer unterstützt und mir somit das Medizinstudium und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.
Zuletzt möchte ich Philipp für unendlich viel liebevolle Motivation, Unterstützung und Aufmunterung in den verschiedenen Phasen dieser Arbeit danken. Ohne Dich hätte ich das nie geschafft!

# 12 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich,
dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion bei der spezifischen Immuntherapie mit Allergoiden**

in der Klinik für Dermatologie und Allergologie
unter Leitung von PD Dr. W. Pfützner

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Kassel, im Juli 2013

_____

Britta Adams