



# **Immunologische Effekte von nativen Allergenen im Vergleich zu modifizierten Allergenen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Angefertigt an der  
Haut- und Poliklinik  
der Universitätsmedizin Mainz

**Bärbel Heydenreich**  
Geboren am 27. November 1982  
in Mannheim

**Mainz, Juli 2012**

Dekan:  
Erster Gutachter:  
Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2012



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder auf Kongressen präsentiert.

### **Publikationen**

**Bärbel Heydenreich**, Iris Bellinghausen, Steffen Lorenz, Helene Henmar, Dennis Strand, Peter Adler Würtzen und Joachim Saloga: Reduced *in vitro* T cell responses induced by glutaraldehyde modified allergen extracts are caused mainly by retarded internalization of dendritic cells. *Immunology*, 2012; 136(2):208-17.

### **Kongressbeiträge**

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Peter Adler-Würtzen, Stephan Grabbe und Joachim Saloga: Glutaraldehyde modified allergoids induce reduced T-cell responses. 22. *Mainzer-Allergieworkshop, Mainz, 11.-12. März 2010. Vortrag und Abstract* in *Allergo Journal* 2010; 19(1): 33.

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Helene Henmar, Peter Adler-Würtzen, Stephan Grabbe und Joachim Saloga: Induction of reduced T-cell responses by glutaraldehyde modified allergoids. 29<sup>th</sup> *Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, London, 5.-9. Juni 2010. Poster und Abstract.*

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Helene Henmar, Peter Adler Würtzen, Stephan Grabbe und Joachim Saloga: Allergoids modified with glutaraldehyde induce decreased T cell responses. 5. *Deutscher Allergiekongress, Hannover, 8.-11. September 2010. Vortrag und Abstract* im *Allergo J* 2010; 19(S1): 12.

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Helene Henmar, Peter Adler Würtzen, Stephan Grabbe and Joachim Saloga: Glutaraldehyde modified allergoids induce diminished T cell responses. 38. *Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Tübingen, 17.-19. Februar 2011. Poster und Abstract* in *Experimental Dermatology* 2011; 20(2): 163.

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Helene Henmar, Peter Adler Würtzen, Stephan Grabbe and Joachim Saloga: Alum adsorbed allergen and allergoid induces similar T cell responses like untreated allergen and allergoid. 23. *Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, 10.-11. März 2011. Vortrag und Abstract* im *Allergo J* 2011; 20(1): 28.

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Helene Henmar, Peter Adler Würtzen, Stephan Grabbe and Joachim Saloga: Alum adsorbed allergens and allergoids induce similar T cell responses compared to unadsorbed allergens and allergoids *in vitro*. 30<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Istanbul, 11.-15. Juni 2011. *Poster discussion session und Abstract*.

Bärbel Heydenreich, Iris Bellinghausen, Helene Henmar, Peter Adler Würtzen, Stephan Grabbe and Joachim Saloga: Alum adsorbed allergens and allergoids induce less basophil activation but similar T cell responses compared to unadsorbed allergens and allergoids *in vitro*. 6. Deutscher Allergiekongress, Wiesbaden, 8.-10. September 2011. *Vortrag und Abstract im Allergo J 2011; 20(S1): S70*.

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-bis-3-ethylenbenzthiazolin-6-sulfonsäure
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Antigen präsentierende Zelle
Bet v	<i>Betula verrucosa</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAST	„Cellular Antigen Stimulation Assay“
CD	„Cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre DNA
DC	Dendritische Zelle
C <sub>t</sub>	„Cycle treshold value“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
ELISA	„Enzyme linked immunosorbent assay“
F	Formaldehyd-modifiziertes Allergoid
FACS	„Fluorescent activated cell sorting“
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszenzisothiocyanat
FSC	„forward scatter channel“
G	Glutaraldehyd-modifiziertes Allergoid
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony stimulating factor“
h	Stunde
HLA-DR	humanes Leukozyten Antigen, MHC-Klasse II-Molekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	„Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium“
LAL	„Limulus Amebocyte Lysate“
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Mikroskopie
m	milli
M	Molar

μ	mikro
MACS	„Magnetic-Activated Cell Sorting“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
n	nano
OD	optische Dichte
p	pico
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	„Phosphat Buffered Saline“
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin
Phl p	<i>Phleum pratense</i>
PMA	phorbol 12-myristat 13-acetat
pNA	p-Nitroanilin
q	quantitativ
Ref	Referenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SSC	„side scatter channel“
SYBR	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
Th1/Th2	Typ 1 und Typ 2 T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanustoxoid
U	Unit
z.B.	zum Beispiel





---

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	Allergie.....	5
1.3	Therapie allergischer Erkrankungen .....	11
1.3.1	Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung).....	11
1.3.2	Der Einsatz von Allergoiden und weiteren Alternativen bei der SIT .....	13
1.4	Der Einsatz von Aluminiumhydroxid (Alum) als Adjuvanz .....	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	18
2.1	Material.....	19
2.1.1	Laborgeräte .....	19
2.1.2	Software .....	20
2.1.3	Verbrauchsartikel.....	21
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien .....	22
2.1.5	Puffer und Medien .....	24
2.1.5.1	Kulturmedien .....	24
2.1.5.2	Puffer und Lösungen .....	24
2.1.6	Zytokine .....	25
2.1.6.1	Zellkultur .....	25
2.1.6.2	ELISA.....	25
2.1.7	Antikörper .....	26
2.1.7.1	Antikörper für Durchflusszytometrie .....	26
2.1.7.2	Antikörper für ELISA.....	26
2.1.8	Primer .....	27
2.1.9	Allergen und Allergoide .....	27
2.1.10	Allergiker.....	28
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.1.1	Isolierung von PBMC aus Buffy-Coats .....	28
2.2.1.2	Kryokonservierung.....	29
2.2.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	29
2.2.1.4	Generierung von Dendritischen Zellen aus PBMC .....	29
2.2.2	Immunologische Methoden .....	30
2.2.2.1	Isolierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	30
2.2.2.2	Proliferationsassay .....	31
2.2.2.3	Zytokinbestimmung mittels ELISA.....	31
2.2.2.4	Durchflusszytometrie .....	33

2.2.2.5	Analyse von Oberflächenmarkern .....	34
2.2.2.6	Analyse von intrazellulären Markern .....	34
2.2.2.7	Apoptose Assay .....	34
2.2.2.8	Bestimmung der Basophilen-Aktivierung .....	35
2.2.2.9	Bestimmung des spezifischen IgE mittels ImmunoCAP® .....	36
2.2.3	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	36
2.2.3.1	Analyse von Allergen- und Allergoid-Aufnahme in dendritische Zellen mittels Laser Scanning Mikroskopie .....	36
2.2.4	Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden .....	37
2.2.4.1	Fluoreszenzmarkierung von Allergenen und Allergoiden.....	37
2.2.4.2	Proteinbestimmung mittels BCA Assay .....	37
2.2.4.3	Endotoxinbestimmung mittels Limulusassay.....	37
2.2.4.4	Gesamt RNA-Isolierung aus dendritischen Zellen .....	38
2.2.4.5	Konzentrationsbestimmung am Nanodrop .....	38
2.2.4.6	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription .....	38
2.2.4.7	Quantitative Real-Time-PCR .....	39
3.	Ergebnisse.....	41
3.1	Analyse von nativen Allergenen und Allergoiden.....	41
3.1.1	Verminderte Leukotrien-Ausschüttung durch Basophile nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoiden .....	42
3.1.2	Zytokinproduktion dendritischer Zellen.....	43
3.1.3	DC Oberflächenmarker.....	45
3.1.4	Glutaraldehyd-Allergoid behandelte DC induzieren eine verminderte Proliferation autologer CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	47
3.1.5	Reduzierte Bildung von Th1/Th2 Zytokinen nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoid gepulsten DC .....	48
3.1.6	Produktion intrazellulärer Zytokine in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	50
3.1.7	Aufnahme von fluoreszenz-markierten Allergenen und Allergoiden in DC .....	51
3.1.8	Analyse der Einzelallergene Bet v 1 und Phl p 1 .....	58
3.1.9	Verstärkte Produktion von DC Zytokinen nach Stimulation mit Allergoiden .....	58
3.1.10	Erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD83 auf unreifen DC nach Stimulation mit Allergoiden .....	59
3.1.11	Bet v 1 und Phl p 1 Glutaraldehyd-Allergoide induzieren eine verminderte T-Zellproliferation verglichen mit den unbehandelten Einzelallergenen und den entsprechenden Formaldehyd-Allergoiden .....	61
3.1.12	Vergleichbare Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet v 1 und Phl p 1 Allergen und Allergoid behandelten DC .....	61
3.2	Analyse von an Aluminiumhydroxid adsorbierten Allergenen und Allergoiden.....	63
3.2.1	Induktion von Apoptose durch Alum-adsorbierte Allergene/Allergoide .....	63
3.2.2	DC Zytokinproduktion nach Stimulation mit unadsorbierten und Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden .....	65

3.2.3	Verminderte Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC .....	67
3.2.4	Verminderte Produktion von IL-13, IL-10 und IFN- $\gamma$ durch CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	69
3.2.5	Verminderte intrazelluläre Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC .....	71
3.3	Analyse von Allergenen und Allergoiden mit gleichbleibender Alummenge .....	72
3.3.1	DC Zytokine .....	73
3.3.2	Erhöhte Expression von CD80 und CD83 auf unreifen DC nach Stimulation mit Aluminiumhydroxid .....	74
3.3.3	Verminderte Induktion der Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Glutaraldehyd-Allergoid .....	75
3.3.4	Verminderte Zytokinproduktion nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Glutaraldehyd-Allergoid .....	76
3.4	Untersuchungen zum Einfluss von Aluminiumhydroxid auf die IL-1 $\beta$ Expression .....	77
3.4.1	IL-1 $\beta$ Produktion in Monozyten.....	77
3.4.2	Nachweis von IL-1 $\beta$ in unreifen DC mittels quantitativer Real Time PCR .....	78
4.	Diskussion .....	80
5.	Zusammenfassung .....	91
6.	Literaturverzeichnis .....	93
	Abbildungsverzeichnis.....	100
	Lebenslauf .....	101



## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes System bestehend aus unterschiedlichen Effektorzellen und Molekülen, die uns vor Infektionen schützen sollen. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem erworbenen, dem sog. adaptiven Immunsystem.

Alle zellulären Bestandteile des Blutes, die wichtig für eine Immunantwort sind, gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor. Nach Teilung der Zellen entstehen zwei Typen von Stammzellen. Aus den lymphatischen Stammzellen entwickeln sich Leukozyten, wie natürliche Killerzellen, T- und B-Lymphozyten. Aus den myeloiden Vorläuferzellen gehen die restlichen Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen) sowie Erythrozyten und Megakaryozyten hervor. Makrophagen, die aus Monozyten hervorgehen, zirkulieren im Blut und befinden sich in fast allen Geweben. Gemeinsam mit den Monozyten, den Granulozyten, bestehend aus neutrophilen, eosinophilen und basophilen Zellen, und den dendritischen Zellen sind sie Bestandteil der phagozytierenden Zellen. Ein weiterer Zelltyp, der sich in den Geweben differenziert, sind die Mastzellen, die bei der allergischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen<sup>(1)</sup>.

Die erste Hürde, die ein Pathogen überwinden muss um in den menschlichen Körper zu gelangen ist chemischer oder physikalischer Art, wie z.B. der Säuremantel der Haut. Wurde diese Barriere überwunden, so greift hier zunächst das angeborene Immunsystem ein. Dabei übernehmen auf zellulärer Ebene Leukozyten wie Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen oder neutrophile Granulozyten die erste Abwehr, indem sie Pathogene unspezifisch phagozytieren. Dafür exprimieren die Zellen des angeborenen Immunsystems eine Vielzahl an Mustererkennungsrezeptoren (PRR), mit denen sie hoch konservierte molekulare Strukturen der Pathogene (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Mannane oder Nukleinsäuren, erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehören die Toll-like-Rezeptoren (TLR), von denen beim Menschen 10 (TLR1-10) bekannt sind. Man findet sie auf der Zelloberfläche oder auch intrazellulär. LPS bindet beispielsweise an TLR4 auf der Zelloberfläche. Weitere Vertreter der PRR sind die C-Typ Lektin Rezeptoren, zu denen der Mannoserezeptor (CD206), DC-SIGN und Dectin-1 gehören. Diese erkennen Antigene auf Grund bestimmter Kohlenhydratstrukturen, wie z.B. Mannose, Fuktose oder N-Acetylglukosamine, indem sie mit diesen über Kohlenhydrat-Erkennungs-Domänen (CRDs) interagieren<sup>(2:3)</sup>. NOD-(*nucleotide binding oligomerization domain*)-like-Rezeptoren (NLR), wie z.B. NOD1 und NOD2, erkennen im Zytoplasma bakterielle Peptidoglykane. Dendritische Zellen können Gefahren bzw. Infektionen auch indirekt über

inflammatorische Mediatoren, wie z.B. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder PGE<sub>2</sub>, deren Freisetzung durch Pathogene angekurbelt wird, erkennen<sup>(4;5)</sup>.

Neben Pathogenen können auch endogene Strukturen erkannt werden, die z.B. beim Absterben von Zellen entstehen. Auf humoraler Ebene sind das Komplementsystem und das Gerinnungssystem für das angeborene Immunsystem essentiell.

Das adaptive Immunsystem hingegen wirkt spezifisch auf bestimmte Krankheitserreger. Es kommt auch nicht innerhalb weniger Stunden zum Greifen, wie das angeborene Immunsystem, sondern benötigt mehrere Tage um sich zu entwickeln. Hierbei können Lymphozyten mittels spezifischer Antigenrezeptoren bestimmte Antigene erkennen und eine gezielte Immunantwort auslösen. Zudem entwickelt das adaptive Immunsystem hierbei ein immunologisches Gedächtnis, wodurch nach wiederholtem Kontakt mit einem Antigen eine schnelle spezifische Reaktion ausgelöst werden kann<sup>(1;3)</sup>. Eine wichtige Rolle spielen bei der adaptiven Immunantwort zellulär die T- und B-Lymphozyten und auf humoraler Ebene Antikörper. T- und B-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren (T-Zell-Antigenrezeptoren, TCR bzw. B-Zell-Antigenrezeptoren, BCR), die bestimmte Teilstrukturen (Epitope) von Antigenen erkennen können. Die Rezeptoren zeichnen sich durch eine hohe Diversität aus, wobei jede T- bzw. B-Zelle für ein bestimmtes Antigenepitop spezifisch ist<sup>(3)</sup>.

Des Weiteren sind Zytokine und Chemokine für die Zellkommunikation essentiell. T-Zellen können in  $\alpha$ , $\beta$ -T-Zellen und  $\gamma$ , $\delta$ -T-Zellen eingeteilt werden. Es gibt naive T-Zellen und Memory T-Zellen. Naive T-Zellen findet man oftmals in den peripheren lymphatischen Geweben vor, wo sie von dendritischen Zellen aktiviert werden können. Die Reifung der T-Zellen findet im Thymus mit Unterstützung des Zytokins IL-7 statt. Hier entsteht auch die Vielzahl an verschiedener TCR durch zufällige Anordnung der verschiedenen T-Zell-Rezeptor-Gensegmente, V (*variable*), D (*diversity*) und J (*joining*).

CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen werden in Th1-, Th2- und Th3-Zellen, deren Einordnung von der Produktion spezifischer Zytokine abhängig ist, unterteilt. Th1-Zellen produzieren vorwiegend IFN- $\gamma$ . Bei den Th2-Zellen herrscht die Bildung von IL-4, IL-5 und IL-13 vor. Th3-Zellen bilden TNF- $\beta$ . Neben diesen Subpopulationen existieren noch weitere Th-Zellen, wie Th9-, Th17- und Th22-Zellen, die durch die Produktion der Zytokine IL-9, IL-17 bzw. IL-22 charakterisiert werden<sup>(3)</sup>.

Bei den Antikörpern, die bei der adaptiven Immunantwort eine wichtige Funktion haben, handelt es sich um Immunglobuline (Ig). Diese werden von B-Zellen sezerniert. Befinden sie sich membranständig, so dienen sie auch als Antigenrezeptoren. Immunglobuline erkennen eine Vielzahl von Antigenen, wie z.B. Proteine, Polysaccharide, Lipide oder Nukleinsäuren. Es existieren 5 verschiedene Klassen (Isotypen): IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Diese lassen sich teilweise in weitere Subklassen unterteilen, wie beispielsweise IgG

in IgG<sub>1</sub> bis IgG<sub>4</sub>. Strukturbereiche auf den Antigenen, die durch die Antikörper erkannt werden, bezeichnet man wie bereits erwähnt als Epitope. Man unterscheidet hierbei Konformationsepitope, die durch die Tertiärstruktur des Proteins zustande kommen, und lineare Epitope, die lediglich aus einem linearen Aminosäuresequenzbereich bestehen<sup>(3)</sup>.

### **Antigenpräsentation und Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch dendritische Zellen**

Dendritische Zellen stellen eine wichtige Form von antigenpräsentierenden Zellen (APC) dar. DC entstehen im Knochenmark aus myeloiden oder aus lymphatischen Progenitorzellen und wandern über die Blutbahn in die Peripherie bzw. in alle Körpergewebe, vor allem in Oberflächenepithelien und repräsentieren dort ca. 1-2% der Gesamtzellzahl<sup>(1;6)</sup>. Neben der Makropinozytose und Phagozytose können unreife DC Antigene Rezeptor-vermittelt durch Endozytose aufnehmen<sup>(7)</sup>. Sie sind die einzigen APC, die befähigt sind naive T-Zellen effektiv zu aktivieren<sup>(3)</sup>. Man unterscheidet konventionelle DC, die für die Aktivierung von T-Zellen zuständig sind, von plasmazytoiden DC, die durch die Produktion von Interferonen gekennzeichnet sind und bei der Antigenpräsentation keine Rolle zu spielen scheinen. DC exprimieren charakteristische  $\beta_2$ -Integrine, wie CD11c:CD18 ( $\alpha_x\beta_2$ ) auf ihrer Oberfläche<sup>(1)</sup>.

In der Peripherie nehmen unreife DC Antigene auf, spalten diese in Peptide und präsentieren diese mittels MHC Klasse I und MHC Klasse II Molekülen (*major histocompatibility complex*) auf ihrer Oberfläche. MHC-I Moleküle präsentieren in der Regel endogene Proteine, wie z.B. virale Proteine, die durch eine Virusinfektion in den Zellen entstehen. MHC-I Moleküle, die Peptid geladen haben, wandern über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran um die Peptide CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren, die eine vorwiegend zytotoxische Funktion haben. MHC-II Moleküle zeigen hingegen Peptide, die von exogener Abstammung sind und in den Endosomen bzw. Lysosomen enzymatisch abgebaut wurden. An der Zelloberfläche werden diese Peptide CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert, bei denen es sich in der Regel um T-Helferzellen handelt.

Haben unreife DC Pathogene aufgenommen reifen sie aus, ändern dabei ihre Morphologie und wandern in die regionalen lymphatischen Organe (z.B. Lymphknoten) um dort die MHC-I- bzw. MHC-II-gebundenen Peptide naiven T-Zellen zu präsentieren und diese damit zu aktivieren. DC besitzen costimulatorische Moleküle, wie CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40. Die Expression dieser Oberflächenmarker nimmt zusammen mit MHC-I und MHC-II Molekülen sowie den Adhäsionsmolekülen ICAM-1/2 und dem Reifungsmarker CD83 bei der Reifung der DC enorm zu, wobei gleichzeitig die Fähigkeit neue Antigene aufzunehmen sinkt. Durch die Hochregulation von CCR7 wird bewirkt, dass die reifen DC vorwiegend in den T-Zell-Arealen der sekundären lymphatischen Organe einwandern. Die costimulatorischen Moleküle werden benötigt um naive T-Zellen

effektiv zu aktivieren. CD80 und CD86 binden dabei an CD28 auf den T-Zellen. CD40 interagiert mit dem CD40-Ligand. Fehlen solche costimulatorischen Signale, so treten die T-Zellen in einen anergen Zustand.

Die Aktivierung der T-Zelle durch eine APC beginnt mit dem Kontakt, der durch Adhäsionsmoleküle, wie CD2/LFA-3 und LFA-1/ICAM-1/2, vermittelt wird. Die TCR und Corezeptoren der T-Zelle können nun an die MHC-Komplexe binden. Durch eine Konformationsveränderung der LFA-1 Moleküle kommt es zu einer verstärkten Bindung an ICAM-1/2 <sup>(3)</sup>. Durch die Costimulation mit CD28 wird in den T-Zellen die Expression des T-Zellwachstumsfaktor IL-2 und des hoch affinen IL-2 Rezeptors induziert, welche die Zellen zur Proliferation bringen. Die Interaktion zwischen dem TCR und dem spezifischen Antigen stimuliert die Synthese bzw. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFAT, AP-1 oder NFκB, die an der Promotorregion des IL-2 Gens binden und somit wichtig für dessen Transkription sind. Aktivierte T-Zellen entwickeln sich im weiteren Verlauf zu T-Effektorzellen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen entwickeln sich dabei vor allem zu Th1-, Th2- Th17-Zellen oder zu regulatorischen T-Zellen. Die Richtung, in die sich die Zellen differenzieren, ist abhängig von Signalen aus der direkten Umgebung bzw. den APC selbst. Die Entwicklung zu Th1-Zellen wird beispielsweise durch IFN-γ und IL-12 gesteuert. Diese spielen bei der Bekämpfung von bakteriellen und viralen Infekten eine wichtige Rolle, indem sie Makrophagen, NK-Zellen und die Expansion zytotoxischer Zellen aktivieren <sup>(8)</sup>. Bakterien können dabei die Produktion von IL-12 induzieren. Mit Hilfe der Zytokine wird der JAK-STAT-Signalweg (Januskinase; *signal transducers and activators of transcription*) aktiviert. Bei Th1-Zellen ist dabei STAT4 von Bedeutung, welches die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet aktiviert. T-bet schaltet wiederum das IFN-γ Gen in der T-Zelle ein und unterstützt die Expression der Signaluntereinheit des IL-12 Rezeptors. Th1-Zellen induzieren hauptsächlich die Produktion von Antikörpern des Isotyps IgG. Die Entwicklung zu Th2-Zellen wird hingegen durch IL-4 begünstigt. Dieses aktiviert in der T-Zelle STAT6, welches wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 begünstigt. GATA-3 fördert die Aktivierung mehrerer für Th2-Zellen charakteristischer Zytokine, darunter auch IL-4. Die Antikörper, die auf Grund einer solchen Immunantwort verstärkt produziert werden, sind IgA und IgE. Th2-Zellen sind zum einen an der Immunantwort beteiligt, die durch Parasiten ausgelöst wird, haben andererseits aber auch eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von Autoimmunreaktionen und Allergien <sup>(1)</sup>.



## 1.2 Allergie

Das Immunsystem des Körpers sorgt für die Abwehr gegen Infektionen durch Bakterien, Viren oder anderen gefährlichen Einflüssen. Gelegentlich bekämpfen Immunzellen Antigene, die in der Regel keine Gefahr für den Menschen darstellen, was als Hypersensitivität bezeichnet wird. Der Begriff „Allergie“ (von griechisch *allos*, anders) wurde von Clemens von Pirquet 1906 zum ersten Mal eingeführt, indem er die ungewöhnliche Neigung einiger Individuen symptomatische Reaktionen nach Exposition mit bestimmten Substanzen zu entwickeln beschrieb<sup>(9)</sup>. Bei Typ I Allergien handelt es sich in der Regel um Th2-dominierte Immunantworten auf ein normalerweise ungefährliches Antigen und das vermehrte Vorhandensein von allergen-spezifischem- und Gesamt-IgE. Die Anzahl an Allergikern hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. Etwa 30% der Bevölkerung der industriellen Staaten leiden mittlerweile an Allergien in Form von allergischer Rhinitis, Konjunktivitis, atopischer Dermatitis oder allergischem Asthma. Für viele Betroffene stellt dies eine enorme Beeinträchtigung und Belastung im täglichen Leben dar. Bei einigen Menschen kann der Kontakt mit einem bestimmten Allergen im schlimmsten Fall zu einem anaphylaktischen Schock führen.

Warum aber stieg die Zahl an Allergikern mit den Jahren immer weiter an? Eine Hypothese, die sog. „Hygiene Hypothese“, die das vermehrte Auftreten von Allergien in der westlichen Welt erklären sollte, kam durch eine Studie von Strachan auf. Er studierte in Großbritannien 17414 Kinder, die im März 1958 geboren waren und beobachtete diese bis zu ihrem 23. Lebensjahr. Er stellte dabei fest, dass die Wahrscheinlichkeit an einer allergischer Rhinitis zu erkranken invers mit der Anzahl an Kindern in den Haushalten korrelierte. Das Risiko allergische Erkrankungen zu bekommen war demzufolge vermindert, wenn sich die Kinder in ihrer frühen Kindheit mit Infektionskrankheiten über den Kontakt mit ihren älteren Geschwistern ansteckten<sup>(10)</sup>. Kommt es zu einem limitierten Kontakt mit Bakterien oder Viren, so werden Th1-Zellen, die mit bakteriellen und viralen Infektionen assoziiert sind, unzureichend stimuliert. Diese können dann einer Expansion von Th2-Zellen nicht mehr ausreichend entgegensteuern und es kommt zu einer Prädisposition für allergische Erkrankungen<sup>(11)</sup>. Eine weitere Erklärung ist das immer geringer werdende Risiko der Bevölkerung in industriellen Ländern von Parasiten befallen zu werden. Parasiten, wie z.B. Helminthen, lösen ähnlich wie bei allergischen Reaktionen eine Th2-dominierte Immunantwort aus. In den Entwicklungsländern treten solche Infektionen hingegen viel häufiger auf. Allergische Erkrankungen sind dort jedoch nicht so verbreitet wie in den Industrienationen. Unterschiede in der Prävalenz von allergischen Erkrankungen bestehen außerdem zwischen ländlichen und städtischen Regionen. In Deutschland haben Bewohner urbaner Regionen häufiger allergisches Asthma als z.B. Bauern, die in ländlichen Regionen wie Bayern leben<sup>(12)</sup>. Des Weiteren kann eine

genetische Prädisposition bei der Entwicklung der Allergie von Bedeutung sein. Die Genomregion auf Chromosom 5 5q31-33 kodiert z.B. Kandidatengene, die möglicherweise für eine erhöhte Anfälligkeit verantwortlich sind. Hier liegen die Gene verschiedener Th2-Zytokine, wie z.B. IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, die bei der allergischen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen <sup>(1)</sup>.

Substanzen, die Allergien auslösen, werden als Allergene bezeichnet. Sie sind meist recht kleine Proteine oder Glykoproteine, die von vielen unterschiedlichen Quellen stammen können. Darunter befinden sich u.a. Pollenkörner, Hausstaubmilben, Pilze, Insekten oder auch Haustiere, wie Hund und Katze (Abbildung 1). Zudem können viele Lebensmittel Allergien verursachen <sup>(13)</sup>. Viele Allergene, wie z.B. durch Luft übertragbare Gräser- oder Hausstaubmilben-Allergene, werden über trockene Partikel, z.B. Pollen bzw. Milbenkot, übertragen. Die meisten Allergene werden entweder eingeatmet und gelangen über die oberen Atemwege in den Körper, werden über die Haut aufgenommen oder, wie bei Nahrungsmittelallergenen, gelangen über die Nahrung in das Verdauungssystem.



Allergenquelle	Einzelallergene	Molekulargewicht	Proteinfunktion
<b>Birke</b> ( <i>Betula verrucosa</i> )	Bet v 1 Bet v 2 Bet v 3	17 kD 14 kD 20 kD	RNase Profilin Ca <sup>2+</sup> -bindend
<b>Lieschgras</b> ( <i>Phleum pratense</i> )	Phl p 1 Phl p 2 Phl p 3 Phl p 4 Phl p 5a Phl p 5b Phl p 6 Phl p 7 Phl p 11 Phl p 12 Phl p 13	33-37 kD 11 kD 11 kD 50 kD 38 kD 32 kD 14 kD 8.6 kD 15.8 kD 14 kD 55-60 kD	Protease, Glykoprotein  RNase  2EF Ca-bindendes Protein Soja-Trypsininhibitor-ähnliche Profilin Polygalaktcturonase, Glykoprotein
<b>Erdnuss</b> ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Ara h 1 Ara h 2 Ara h 3/4 Ara h 6 Ara h 9	69 kD 18 kD 58/61 kD 15 kD 12 kD	7S-Globulin (Vicilin), Speicherprotein 2S-Albumin (Conglutin), Speicherprotein 11S-Globulin (Glycinin), Speicherprotein 2S-Albumin (Conglutin), Speicherprotein Lipid-Transfer-Protein
<b>Katze</b> ( <i>Felis domesticus</i> )	Fel d 1	Polypeptid 1 10 kD Polypeptid 2 11 kD	kollagenolytisch
<b>Wespe</b> ( <i>Vespula vulgaris</i> )	Ves v 1 Ves v 2 Ves v 5	35 kD 44 kD 23 kD	Phospholipase Hyaluronidase Antigen 5

**Abbildung 1: Allergenquellen**

Beispiele verschiedener Allergenquellen mit Unterteilung in Einzelallergene und deren bekannte Proteinfunktion (modifiziert nach <sup>(3)</sup>, Bilder: B. Heydenreich)

Nahrungsmittelallergene zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch Verdauungsenzyme oftmals nicht zerstört werden können und somit als intakte Allergene die Schleimhäute im Dünndarm erreichen <sup>(1)</sup>. Allergene lassen sich in verschiedene Allergenkomponenten aufschlüsseln. Allergene, auf die mehr als 50% der Patienten reagieren, werden als Majorallergene/Hauptallergene, solche auf die weniger als 10% der Patienten reagieren als Minorallergene bezeichnet. Verschiedene Allergenquellen unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl an Einzelallergenen. So besitzt beispielsweise Birkenpollenextrakt nur wenige Einzelallergene, wohingegen einige Gräserpollen, wie das Lieschgras, eine Vielzahl an Einzelallergenen aufweisen. Vielen Allergenen konnten bereits bestimmte biologische Funktionen zugeschrieben werden. Bet v 1 besitzt z.B. eine RNase-Aktivität <sup>(3)</sup>. Andere Allergene, wie das Hauptallergen der Hausstaubmilbe Der p 1 sind Proteasen, welche direkt die Barrierefunktion der Epithelien stören können oder Substrate, die bei der Entwicklung der Th2-Antwort wichtig sind, hydrolysieren können <sup>(14;15)</sup>. Proteasen werden darüber hinaus von Parasiten verwendet um in Gewebe zu gelangen <sup>(16)</sup>. Basophile können ebenfalls durch exogene Proteasen aktiviert werden. Dadurch wird TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), das die allergische Entzündung fördern kann, und „frühes IL-4“, das für die Sensibilisierung zur Entwicklung einer Th2-Antwort gegenüber Allergenen oder Parasiten wichtig ist, gebildet <sup>(17;18)</sup>. Das Hauptallergen der Katze Fel d 1 besteht aus zwei Peptidketten und kann denaturiertes Kollagen spalten. Allergien auf Bienen und Wespen sind auf deren Gifte zurückzuführen. Bei den Allergenen handelt es sich z.B. um Phospholipasen oder Hyaluronidasen. Phospholipasen haben hierbei zytotoxische und neurotoxische Effekte <sup>(3)</sup>.

Haben Allergene nun die Schutzbarriere des Körpers überwunden, werden sie von DC, beispielsweise in der Haut oder den Schleimhäuten, aufgenommen und in den regionalen lymphatischen Organen CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Diese erkennen über ihre TCR lineare Peptidsequenzen (Epitope), die über MHC II Moleküle auf den DC präsentiert werden. Die B-Zell-Epitope auf Protein-Allergenen werden hingegen von Antikörpern (IgE) erkannt und besitzen eine dreidimensionale Struktur <sup>(19)</sup>.

Coombs und Gell haben diese Überempfindlichkeitsreaktionen 1963, abhängig von ihren immunologischen Mechanismen, in 4 verschiedene Typen eingeteilt (Tabelle 1). Typ I Allergien sind Allergien vom Soforttyp und IgE-vermittelt. Symptome treten hier sofort nach Kontakt mit dem Allergen auf. Sie werden durch lösliche Proteine ausgelöst. Die Aktivierung von Mastzellen spielt bei diesem Allergietyp eine wichtige Rolle. Beispiele für diesen Allergietyp sind Allergien, die durch Pollen, Milben oder auch Insektengifte ausgelöst werden und dadurch zu allergischer Rhinitis, Asthma oder im schlimmsten Fall zu einer systemischen Anaphylaxie führen können. Weitere Allergietypen, wie Typ II und III, werden über IgG vermittelt. Des Weiteren können Allergien durch Zellen, wie Th1-,

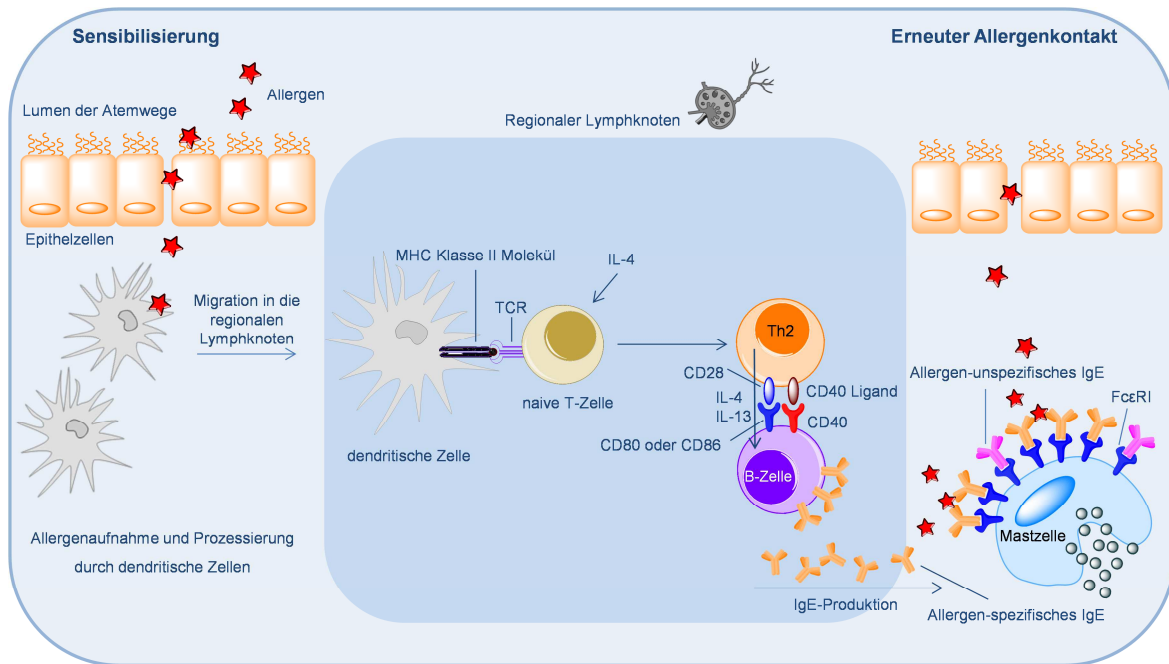
Th2- oder auch cytotoxische T-Zellen (CTL) vermittelt werden, wie dies bei Typ IV Allergien der Fall ist.

**Tabelle 1: Einteilung der Hyposensitivitätsreaktionen nach Coombs und Gell**  
(modifiziert nach <sup>(1)</sup>)

	Immunkomponente	Antigen	Effektormechanismen	Beispiele
<b>Typ I</b>	IgE	lösliches Antigen	Mastzellaktivierung	allergische Rhinitis, Asthma, systemische Anaphylaxie
<b>Typ II</b>	IgG	zell- oder matrixassoziiertes Antigen	Komplement, FcR <sup>+</sup> -Zellen (Phagozyten, NK-Zellen)	manche Medikamentenallergien (z.B. gegen Penicillin)
		Zelloberflächenrezeptor	Antikörper verändert Signalgebung	chronische Urticaria (Antikörper gegen FcεRIα)
<b>Typ III</b>	IgG	lösliches Antigen	Komplement, Phagozyten	Serumkrankheit, Arthus-Reaktion
<b>Typ IV</b>	Th1-Zellen	lösliches Antigen	Makrophagenaktivierung	Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion
	Th2-Zellen	lösliches Antigen	IgE-Produktion, Aktivierung von Eosinophilen, Mastozytose	chronisches Asthma, chronische allergische Rhinitis
	CTL	zelloassoziiertes Antigen	Zytotoxizität	Gewebeabstoßung

**Wie entsteht eine allergische Immunantwort?**

Zu Beginn einer allergischen Immunantwort muss eine prädispositionierte Person zunächst gegen das Allergen sensibilisiert werden (Abbildung 2). Dies geschieht bereits bei Kontakt mit sehr geringen Allergendosen. Allergene können über die Schleimhäute oder die Haut aufgenommen werden. Dort werden sie von unreifen DC aufgenommen und prozessiert. Diese wandern daraufhin in die regionalen Lymphknoten, reifen aus und präsentieren MHC II-gebundene Peptidfragmente an naive T-Zellen um sie zu aktivieren. Bei der Anwesenheit von frühem IL-4 differenzieren diese zu Th2-Zellen, welche wiederum vermehrt IL-4 und IL-13 produzieren. Bei Anwesenheit dieser Zytokine und der Interaktion zwischen CD40-Ligand bzw. CD28 auf Th2-Zellen und CD40 bzw. CD80/CD86 auf B-Zellen kann in letztere ein Immunglobulinklassenwechsel („switch“) induziert werden. Die B-Zellen produzieren daraufhin vermehrt IgE. Dieses gelangt in die Lymphe und verteilt sich weiter über die Blutbahn. Von dort aus gelangt es in die Interstitialflüssigkeit und kann an den hoch-affinen IgE-Rezeptor FcεRI auf Mastzellen oder Basophilen im Gewebe binden. Somit ist das Individuum sensibilisiert <sup>(20)</sup>.



**Abbildung 2: Manifestierung einer allergischen Immunantwort**  
Verändert nach <sup>(20)</sup>

Die Sensibilisierung verläuft ohne Symptome. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Allergen kann dieses nun direkt an die Zell-gebundenen IgE-Antikörper binden und dadurch kreuzvernetzen. Durch diese Kreuzvernetzung kommt es in den Mastzellen zur Ausschüttung von Mediatoren, welche die Symptome allergischer Reaktionen auslösen.

Th2-Zellen und das Immunglobulin IgE sind bei der Entwicklung der allergischen Immunantwort von hoher Bedeutung. Ähnliche Immunantworten wie hier werden durch die Infektion mit Helminthen oder anderen Parasiten ausgelöst. Auch in diesem Fall kommt es zu einer gesteigerten IgE-Produktion und zu einer dominierenden Th2-Reaktion, charakterisiert durch vermehrte Bildung von IL-4 und IL-13. Man sagt, dass bei Allergikern eine verschobene Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen in Richtung Th2-Zellen besteht <sup>(20)</sup>.

In letzter Zeit hat man herausgefunden, dass neben Th2-Zellen auch Th17- und Th22-Zellen eine Rolle bei der allergischen Immunantwort zu spielen scheinen <sup>(3)</sup>. IL-17 sorgt für die Rekrutierung von Neutrophilen und Eosinophilen und kann bei Asthmatikern und Patienten mit allergischer Rhinitis vermehrt nachgewiesen werden. Th22-Zellen können in der Haut von Patienten mit allergischer Kontaktallergie, atopischen Ekzemen oder Psoriasis vermehrt detektiert werden <sup>(21)</sup>.

Für IgE existieren zwei Rezeptoren: der hoch-affine IgE-Rezeptor FcεRI und der niedrig-affine IgE-Rezeptor FcεRII (CD23). FcεRI Rezeptoren befinden sich nur auf wenigen Zelltypen, wie Mastzellen, Basophilen und APC <sup>(22)</sup>.

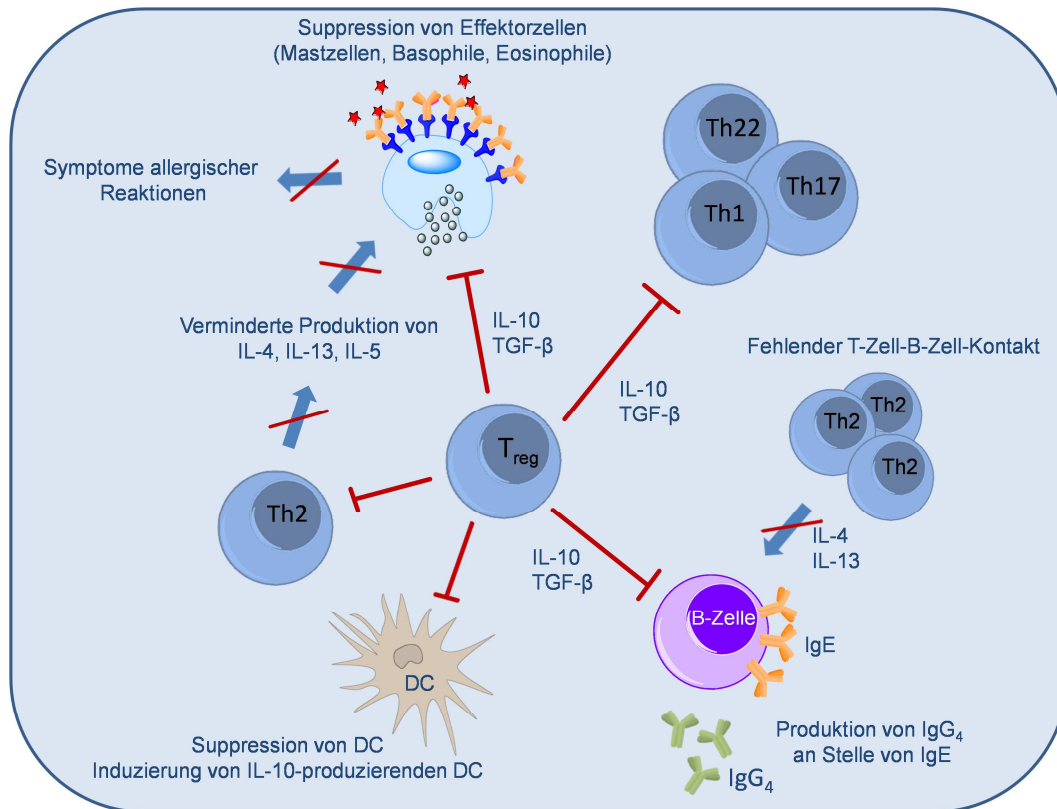
Die allergische Reaktion lässt sich generell in zwei Phasen einteilen: die Sofort- und die Spätreaktion. Die Sofortreaktion kommt wenige Minuten nach Allergenexposition zustande und ist charakterisiert durch die Aktivität von Mastzellen und deren Mediatoren, wie Histamin oder Prostaglandine. Mastzellen befinden sich vor allem in der Haut und in den Schleimhäuten der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes. Sie zeichnen sich durch die Expression des FcεRI und c-Kit (für die Bindung an SCF, *stem cell factor*) aus und produzieren verschiedene Mediatoren. Man unterscheidet zwischen präformierten Mediatoren, neu synthetisierten Lipidmediatoren und Zytokinen. Präformierte Mediatoren, wie z.B. Histamin, Proteoglykane oder Serinproteasen, befinden sich in zytoplasmatischen Granula. Wird eine Mastzelle durch Kreuzvernetzung von FcεRI-gebundenem IgE durch Allergene aktiviert, so fusionieren die Granula mit der Zellmembran und die Mediatoren werden innerhalb weniger Minuten aus der Zelle entlassen. Histamin bewirkt die Kontraktion der glatten Muskulatur, hat Effekte auf Endothelzellen der Gefäße, Nervenendigungen und die Mucus-Sekretion<sup>(23)</sup>, wodurch typische Symptome der Allergie, wie Juckreiz, Rötung und Schwellung der Haut, Bronchokonstriktion, Atemnot oder gastrointestinale Beschwerden ausgelöst werden<sup>(3)</sup>. Anders als Mastzellen zirkulieren Basophile im Blut und infiltrieren entzündete Gewebe in der Haut oder den Atemwegen. Sie exprimieren ebenfalls den FcεRI und eine weitere Vielzahl an Zytokin- bzw. Chemokin-Rezeptoren, wie z.B. IL-3R. IL-3 kann zusammen mit weiteren Zytokinen bzw. Chemokinen Basophile primen und die Ausschüttung von Mediatoren nach Aktivierung von FcεRI anregen. Zudem kommt es dadurch zur Sekretion von IL-4 und IL-13. Auch Basophile enthalten präformierte und neusynthetisierte Mediatoren bzw. Zytokine und Chemokine. Dazu gehören Leukotriene, die zu den Lipidmediatoren zählen. Nach Aktivierung werden LTC<sub>4</sub> und dessen Metaboliten LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> produziert und freigesetzt. Diese bewirken ebenfalls eine Bronchokonstriktion und eine erhöhte Permeabilität der Gefäße<sup>(23)</sup>. Die Spätphasereaktion tritt erst 8-12 Stunden nach der Sofortreaktion auf und kommt bei 50% der Patienten zum Tragen. Hierbei spielen Prostaglandine, Leukotriene, Chemokine und Zytokine (IL-5 und IL-13), die nach Aktivierung der Mastzellen synthetisiert und ausgeschüttet werden, eine wichtige Rolle. Durch diese werden weitere Leukozyten, wie Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Th2-Zellen, zum Ort der Entzündung gelockt und bewirken eine weitere Kontraktion der glatten Muskulatur. Es können sich Ödeme bilden und morphologische Veränderungen des Gewebes auftreten. Solche andauernden Spätphasereaktionen können im weiteren Verlauf zu chronischen allergischen Entzündungen, wie beispielsweise chronischem Asthma führen<sup>(1;20)</sup>.

### 1.3 Therapie allergischer Erkrankungen

Bei der Behandlung allergischer Entzündungen sind zwei Punkte wichtig. Zum einen die Vermeidung von Kontakt mit dem spezifischen Allergen und zum anderen die gezielte medikamentöse Behandlung der Symptome. Die Vermeidung der Allergiequellen, wie Pollen, ist dabei jedoch nicht immer so einfach. Hier sollte man während der Pollenflugsaison auf körperliche Anstrengungen im Freien, wie z.B. Sport, verzichten. Auch bei Allergien gegen Haustiere lässt sich der Kontakt mit den Allergenen trotz Ausschluss des Tieres aus dem Haushalt nicht immer vermeiden, was bei dem Hauptallergen der Hauskatze Fel d 1 deutlich wird. Dieses Allergen schwebt auf Grund von aerodynamischen Eigenschaften lange in der Luft und wird zudem als „klebrig“ beschrieben. Dadurch haftet es leicht an Kleidung und wird recht einfach in andere Haushalte ohne Katzen, in Schulen oder andere öffentliche Gebäude übertragen <sup>(24;25)</sup>. Allergene aus Lebensmitteln lassen sich hingegen einfacher vermeiden, schränken jedoch die Lebensqualität der betroffenen Personen stark ein. Zum Beheben der Symptome von allergischer Rhinitis und allergischem Asthma hat sich die Behandlung mit Medikamenten, wie Antihistaminika, Glukokortikoide oder kurz- bzw. langwirkende  $\beta_2$ -Mimetika (SABAs bzw. LABAs), etabliert <sup>(26)</sup>. Bei Auftreten von Herz-Kreislauf-Symptomen kommt Adrenalin zum Einsatz <sup>(3)</sup>.

#### 1.3.1 Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung)

Die bisher einzige, an den immunologischen Ursachen ansetzende und daher auch auf lange Zeit wirksame Therapie gegen Allergien ist die spezifische Immuntherapie (SIT, *specific immunotherapy*), auch Hyposensibilisierung oder Desensibilisierung genannt. Hierbei werden dem Patienten spezifische Antigene, in diesem Fall Allergene, verabreicht um eine immunologische Toleranz zu induzieren. Sie soll zudem die weitere Entwicklung bzw. Verschlimmerung der Allergie, z.B. vom Heuschnupfen hin zum Asthma, verhindern <sup>(27)</sup>. Leonard Noon beschrieb 1911, dass Heuschnupfen-Patienten nach Gabe von Graspollenextrakten eine verminderte Sensibilität aufwiesen, was sich durch verringerte Symptome zeigte <sup>(28)</sup>. Angewandt wird die Therapie heutzutage vor allem bei Patienten, die unter allergischer Rhinitis, mildem bronchialem Asthma, Insektengiftallergien oder Allergien gegenüber Medikamenten leiden <sup>(26)</sup>. Bei der subkutanen Immuntherapie (SCIT, *subcutaneous immunotherapy*) werden dem Patienten Allergenextrakte in steigenden Dosen unter die Haut appliziert. Die Therapie erfolgt in der Regel über 2-3 Jahre. Bei der Hyposensibilisierung gegen Pollen unterscheidet man zwischen der präseasonalen und der perennialen SIT. Bei der präseasonalen SIT beginnt die Therapie nach der Pollenflugsaison. Dem Patienten werden während der sog. Aufbaubehandlung ca. alle 1-2 Wochen steigende Allergenmengen verabreicht bis eine individuelle Erhaltungsdosis



**Abbildung 3: Toleranzinduktion nach erfolgreicher SIT**

Nach erfolgreicher SIT werden regulatorischen T-Zellen induziert, die IL-10 und TGF-β produzieren. Die Polarisierung von Th2 Zellen wird verhindert, es tritt ein Immunglobulinklassenwechsel von IgE zu IgG<sub>4</sub> auf, DC und Effektor-T-Zellen werden supprimiert. In Folge werden Effektorzellen, wie Mastzellen, Basophile und Eosinophile unterdrückt, es werden keine Mediatoren freigesetzt und Symptome einer allergischen Erkrankung bleiben somit aus (modifiziert nach <sup>(29;30)</sup>).

erreicht wird. Diese Dosierung wird bis zum Beginn der nächsten Pollenflugsaison beibehalten. Dann wird die Gabe von Allergen unterbrochen und beginnt gleichermaßen wieder am Ende der Pollensaison. Im Gegensatz dazu wird bei der perennialen SIT die Administration von Allergen in der Pollenflugsaison nicht unterbrochen. Es werden lediglich geringere Konzentrationen verabreicht. Nach Ende der Saison beginnt dann wieder die Aufbaubehandlung <sup>(3)</sup>.

Eine weitere Form der SIT stellt die sublinguale Immuntherapie (SLIT, *sublingual immunotherapy*) dar. Hierbei nimmt der Patient die Allergene in Form von Tabletten oder Tropfen zu sich. Ob diese Form der SIT genau so effektiv ist wie die SCIT ist noch nicht eindeutig nachgewiesen worden.

Essentiell ist, dass bei der spezifischen Immuntherapie allergen-spezifische regulatorische T-Zellen (T<sub>Reg</sub>) generiert werden (Abbildung 3). Man unterscheidet beim Menschen zwei Typen von regulatorischen T-Zellen. Im Thymus werden die natürlich vorkommenden FoxP3<sup>+</sup> (*forkhead box P3*) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> gebildet. In der Peripherie entwickeln sich induzierbare regulatorische T-Zellen. Bei der SIT spielen hier vor allem die Typ 1 T<sub>Reg</sub> (Tr1), die IL-10 produzieren, eine wichtige Rolle <sup>(21)</sup>. Des Weiteren ist eine

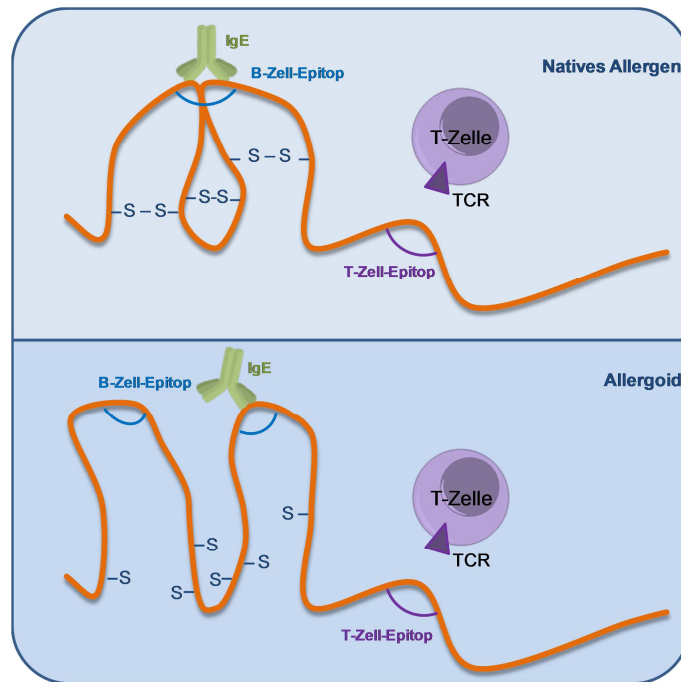


positiv verlaufende SIT durch den Shift der Th2-dominierenden Immunantwort in Richtung einer Th1 Immunantwort und zur vermehrten Ausschüttung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  charakterisiert <sup>(31-33)</sup>. Dadurch werden Eosinophile, Basophile und Mastzellen supprimiert und es erfolgt eine vermehrte Produktion von IgG<sub>4</sub> an Stelle von IgE <sup>(29)</sup>.

### 1.3.2 Der Einsatz von Allergoiden und weiteren Alternativen bei der SIT

Bei der SIT können massive Nebenwirkungen, die sich im schlimmsten Fall in einem anaphylaktischen Schock zeigen, auftreten. Um solche Nebenwirkungen zu vermeiden zog David Marsh Allergoide für eine mögliche spezifische Immuntherapie in Betracht <sup>(34-36)</sup>. Bei Allergoiden handelt es sich um Allergene, die mit Chemikalien wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd modifiziert werden und dabei eine verminderte Allergenität bei gleichbleibender oder steigender Immunogenität aufweisen sollen. Die Aldehyde reagieren mit primären Aminogruppen der Polypeptidsequenzen, wodurch intra- und intermolekulare Bindungen entstehen. Dabei sollen im idealen Fall die dreidimensionalen B-Zell Epitope, die für die IgE-Bindung notwendig sind, zerstört werden, die linearen T-Zell Epitope sollen jedoch erhalten bleiben (Abbildung 4) <sup>(37-40)</sup>. Dieser Idealfall tritt jedoch nicht immer ein. Diverse Arbeiten konnten bereits zeigen, dass einige Allergoide zu einer verminderten T-Zellreaktivität führen <sup>(41-44)</sup>. Zudem spielt die Art der APC, welche die Allergoide den T-Zellen präsentiert eine entscheidende Rolle. So können z.B. DC und Makrophagen, im Vergleich zu B-Zellen oder PBMC, Allergoide viel besser präsentieren <sup>(42;45)</sup>. Auch sublingual zeigt der Einsatz von Allergoiden Erfolge <sup>(46)</sup>. Für die sublinguale Therapie mit Allergoiden eignen sich insbesondere solche, die mit Kaliumcyanat modifiziert wurden. Hierbei wird nach Modifizierung von Lysinresten eine monomere Struktur beibehalten und die Allergoide besitzen ein geringeres Molekulargewicht als solche die durch Modifizierung mit Aldehyden polymerisieren. Dieses verminderte Molekulargewicht hat einen Vorteil bei der Absorption durch die Schleimhaut, wie dies bei der SLIT nötig ist <sup>(47)</sup>.

Allergoide werden in der Regel in Kombination mit Adjuvanzen (von lat. *adjuvare*, helfen, unterstützen) eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist der Impfstoff Pollinex<sup>®</sup> Quattro, der bei der Therapie lediglich viermal präseasonal injiziert wird. Diese kurze Injektionsphase und somit das schnelle Aufdosieren wird zum einen durch den Einsatz der Allergoide ermöglicht. Neben den Glutaraldehyd-modifizierten Allergoiden enthält der Impfstoff das Adjuvant MPL<sup>®</sup> (*monophosphoryl lipid A*), ein nicht-toxisches LPS-Derivat von *Salmonella minnesota* R595, das eine Th1-Immunantwort fördern soll. Des Weiteren sind das Allergoid und MPL<sup>®</sup> an die recht unlösliche Aminosäure L-Tyrosin adsorbiert <sup>(48;49)</sup>.



**Abbildung 4: Modell für die Allergoidisierung nativer Allergene**

Die mit Aldehyden modifizierten Allergoide sollten im Idealfall auf Grund der zerstörten B-Zell-Epitope und somit der dreidimensionalen Struktur eine reduzierte IgE-Bindfähigkeit aufweisen. Lineare T-Zell-Epitope sollten durch die chemische Behandlung nicht verändert werden und somit im weiteren Verlauf immer noch durch TCR erkannt werden; S-S: Disulfidbrücken (modifiziert nach<sup>(3)</sup>).

Neben Allergoiden werden noch weitere Alternativen für den Einsatz von natürlichen/nativen Allergenextrakten für eine Therapie erforscht. So lassen sich heutzutage z.B. rekombinante Allergene recht einfach herstellen und werden bereits in klinischen Studien und Experimenten getestet. Bei nativen rekombinanten Allergenen besteht allerdings immer noch das Risiko von diversen Nebenwirkungen. Durch weitere Modifizierung rekombinanter Allergene würden sich diese reduzieren lassen<sup>(30)</sup>. So konnte in einer Studie ein Fusionsprotein aus zwei Hauptallergenen der Biene (Api m 1 und Api m 2) hergestellt werden, das eine verminderte IgE-Reaktivität bei bestehender T-Zellreaktivität aufwies. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit diesem Fusionsprotein die Bildung von IgE nach Immunisierung mit dem nativen Allergen unterdrückt<sup>(50)</sup>. Peptide, die lediglich aus Aminosäuresequenzen der T-Zell Epitope bestehen, versprechen ebenfalls eine erfolgreiche Therapie, was bereits in Studien mit dem Hauptallergen der Biene gezeigt werden konnte<sup>(51)</sup>. Eine weitere alternative Therapiemöglichkeit wäre der Einsatz von CpG-Oligonukleotiden, die an Allergen gebunden sind. CpG-Motive werden vom TLR9 erkannt, welcher hauptsächlich auf plasmazytoiden DC exprimiert wird. Durch die Bindung soll eine Th2-Immunantwort unterdrückt werden<sup>(52)</sup>. Ein neuer Aspekt bei der Behandlung von IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen ist der Einsatz des anti-IgE Antikörpers Omalizumab (Xolair®).

Dabei handelt es sich um einen monoklonalen anti-IgE Antikörper, der frei zirkulierendes IgE bindet und bei schweren Asthmatikern therapeutisch angewendet wird<sup>(53)</sup>.

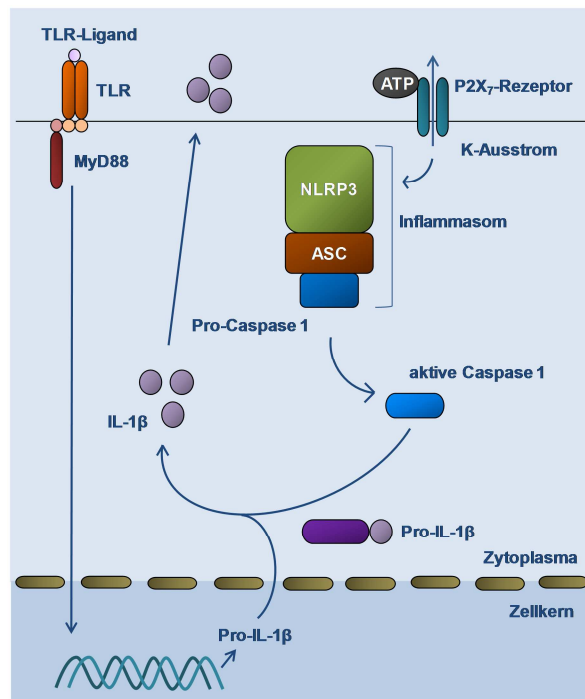
#### 1.4 Der Einsatz von Aluminiumhydroxid (Alum) als Adjuvanz

Seit vielen Jahren werden bei Herstellung von Impfstoffen Adjuvanzen, sog. Wirkverstärker, eingesetzt, da diese starke Antikörper-Reaktionen hervorrufen. Lösliche Proteine werden mit Hilfe von Adjuvanzen in partikuläre Formen umgewandelt und können dadurch von APC besser aufgenommen werden<sup>(1)</sup>. Im Jahr 1926 konnte zum ersten Mal ein Effekt von Aluminiumsalzen zur Verstärkung einer Immunantwort beobachtet werden, indem Meerschweinchen mit löslichem oder Alum-präzipitiertem Diphtherietoxin behandelt wurden<sup>(54)</sup>. In den kommerziellen Impfstoffen werden Antigene in der Regel an zwei Arten von Alum adsorbiert oder präzipitiert: Aluminium Oxyhydroxid bzw. Aluminiumhydroxid (AlOOH) oder Aluminium Hydroxyphosphat bzw. Aluminiumphosphat ( $\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$ )<sup>(55)</sup>.

Die genauen Mechanismen, die hinter der Wirkung von Alum auf das Immunsystem stehen, sind immer noch nicht vollkommen geklärt. Zum einen soll die Injektion von Alum mit einem spezifischen Antigen einen Depot-Effekt bewirken. Hierbei soll das Antigen über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden und sich der Kontakt zu den APC verlängern<sup>(56;57)</sup>. Es gibt jedoch Studien, welche die Funktion eines Depot-Effekts widerlegen<sup>(58)</sup>. *In vivo* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nach Injektion von radioaktiv markiertem Alum-adsorbiertem Tetanus Toxoid in BALB/c Mäuse bereits wenige Stunden später 80% des Tetanus Toxoids von der Injektionsstelle verschwunden waren<sup>(59)</sup>. Folglich müssen weitere Faktoren zum adjuvanten Effekt von Alum beitragen.

Ein weiterer Wirkmechanismus von Alum steht in Zusammenhang mit dem NLRP3 Inflammasom (*NLR family, pyrin domain containing 3*, auch NALP3 Inflammasom genannt). In mehreren Studien konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Alum die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33 über die Aktivierung der Protease Caspase 1 bewirkt<sup>(60;61)</sup>. Caspase 1 ist Bestandteil des NLRP3 Inflammasoms. NALP3 befindet sich intrazellulär in Makrophagen oder dendritischen Zellen. Es ist ein Mitglied der NOD-like-Rezeptoren (NLR) und erkennt Pathogene bzw. Pathogen-Bestandteile, wie LPS oder endogene Gefahrensignale, wie z.B. ATP oder Harnsäure. Bei Aktivierung interagiert NLRP3 mit dem Adapter-Protein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), welches wiederum mit der Proteinvorstufe Pro-Caspase 1 interagiert (Abbildung 5). Dies führt zur Autokatalyse von Pro-Caspase 1, sodass eine aktive Form der Caspase 1 entsteht, die in der Lage ist durch proteolytische Spaltung die Vorstufen der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33 in ihre biologisch aktiven Formen zu verwandeln, welche dann von der Zelle freigesetzt werden.

*In vitro* ist die Expression von Pro-IL-1 $\beta$  nach Zugabe von Alum abhängig von Signalen, die über TLR gesteuert werden, oftmals ausgelöst über TLR-Liganden wie LPS<sup>(62)</sup>. *In vivo* konnte jedoch in mehreren Studien mit Mäusen, die defizient für nachgeschaltete Adaptermoleküle der TLR wie MyD88 oder TRIF sind, gezeigt werden, dass die Wirkung von Alum nicht von der Signalgebung durch TLR abhängig ist<sup>(63;64)</sup>. Des Weiteren scheint der Ausstrom von Kalium aus der Zelle einen Einfluss auf die Aktivierung von Caspase 1 zu haben<sup>(60)</sup>. Der purinerge ATP-Rezeptor P2X<sub>7</sub> spielt gewöhnlich auch eine Rolle bei der Aktivierung des NALP3 Inflammasoms. In diversen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass er nicht an der Produktion von IL-1 $\beta$  beteiligt zu sein scheint<sup>(60;61)</sup>. Wie genau Alum das NALP3 Inflammasom aktiviert ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Theorie besagt, dass Alum von phagozytierenden Zellen aufgenommen wird woraufhin die Lysosomen zerstört und Antigene und lysosomale Enzyme ins Zytoplasma freigesetzt werden und somit ein Signalweg aktiviert wird, der intrazelluläre Gefahrensignale wahrnimmt. Pathogene können DC indirekt aktivieren, indem die durch sie geschädigte Zelle DAMPs (*damage associated molecular pattern*), wie Harnsäure, ATP oder HMGB-1 freisetzt<sup>(65)</sup>. Alum könnte auf diese Weise solche endogenen DAMPs, z.B. Harnsäure, freisetzen, welche das NALP3 Inflammasom aktivieren kann. *In vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass nach Applizierung von Alum und Antigen die Konzentration von Harnsäure lokal ansteigt<sup>(66)</sup>.



**Abbildung 5: Modell für die Funktion des NLRP3 Inflammasoms**

Das Nalp3 Inflammasom, bestehend aus NLRP3, ASC und Caspase 1, kann durch Pathogene oder endogene Gefahrensignale aktiviert werden und induziert die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33 (modifiziert nach<sup>(62)</sup>).

Betrachtet man die Wirkung von Alum auf T-Helferzellen, so induziert Alum *in vivo* hauptsächlich Th2-Antworten <sup>(67)</sup>. Inflammatorische Monozyten (Ly6C<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) können nach i.p. Injektion von Antigen und Alum in das Peritoneum einwandern, Antigene aufnehmen, in die regionalen Lymphknoten migrieren und sich zu Monozyten-abgeleiteten CD11c<sup>+</sup> DC entwickeln, die MHC II Moleküle und CD86 hoch exprimieren und im Gegensatz zu DC, die in den Lymphknoten und der Milz ansässig sind, in der Lage sind antigenspezifische T-Zellen zum proliferieren zu bringen <sup>(66)</sup>. Alum führt in der Regel zu einer humoralen Immunität und ist beispielsweise für das primen von B-Zellen und die Ca<sup>2+</sup> Mobilisierung über myeloide Gr-1<sup>+</sup> Zellen aus der Milz, die IL-4 produzieren, verantwortlich. Bei diesen Zellen handelt es sich größtenteils um Eosinophile <sup>(68;69)</sup>. Trotz der bekannten Th2-fördernden Wirkung von Alum wird dieses Adjuvanz seit Jahren erfolgreich bei der SIT eingesetzt. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass die meisten Daten über die Th2-steigernden Effekte von Alum im Maussystem gewonnen wurden. Trotz der erfolgreichen SIT mit Allergenen und Alum als Adjuvanz wird weiterhin an alternativen Adjuvanzen, wie z.B. das in Kapitel 1.3 genannte MPL, geforscht <sup>(3)</sup>. Des Weiteren wird bei der SIT auch das Verhältnis von Alum und Allergen variiert <sup>(70)</sup>.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen steigt seit mehreren Jahrzehnten stetig an. Betroffen sind davon auch immer mehr Kinder und Jugendliche. Die Auswirkungen von Allergien haben oftmals einen starken Einfluss auf den Lebensalltag. Für Betroffene mit Pollenallergien ist es beispielsweise schwierig sich in der Pollenflugzeit für längere Zeit im Freien aufzuhalten bzw. dort Aktivitäten wie Sport auszuführen. Ebenso kommt es durch die Erkrankung oftmals zu Fehlzeiten bei der Arbeit oder in der Schule.

Aus diesem Grund ist es wichtig effektive Therapiemöglichkeiten für Allergiker zu finden bzw. die vorhandenen Therapien zu verbessern. Die bisher einzige kausale Therapie stellt die spezifische Immuntherapie dar. Allergien von Typ I sind IgE-vermittelt und durch eine Th2-Immunantwort charakterisiert. Da die SIT oftmals mit nativen Allergenextrakten, welche nach Injektion Mastzell-gebundenes IgE kreuzvernetzen können, durchgeführt wird, treten hier manchmal Nebenwirkungen auf, die im schlimmsten Fall zu einem anaphylaktischen Schock führen können. Bei Allergoiden soll diese IgE-Bindfähigkeit stark vermindert sein, was nach Injektion ein Kreuzvernetzen von Zell-gebundenem IgE vermindern würde. Auf der anderen Seite zeigen Allergoide in einigen Fällen eine unerwünschte reduzierte Immunogenität.

In dieser Arbeit sollten nun Formaldehyd- und Glutaraldehyd-modifizierte Allergoide hinsichtlich ihrer Allergenität und Immunogenität mit nativen Allergenextrakten verglichen werden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Aufnahme der Allergene und Allergoide in dendritische Zellen gelegt.

Ein wichtiger Punkt bei der Behandlung ist die sog. Compliance, die Bereitschaft des Patienten die Therapie stetig und konsequent durchzuführen. Da die erfolgreiche SIT mehrere Jahre dauert und aufgrund dieses Zeitrahmens viele Patienten nicht motiviert sind eine solche Therapie durchzuhalten, wäre es vorteilhaft die SIT zu verkürzen. Dies könnte durch schnellere Erhöhung der Allergendosis und durch kürzere Intervalle der Allergengabe zustande kommen. Dafür muss jedoch die Allergenität der Impfstoffe drastisch herabgesetzt werden, was durch Allergoide oder optimierte Allergen/Adjuvanz Relationen erreicht werden könnte. Adjuvanzen, wie Aluminiumhydroxid, die bereits seit Jahren bei der SIT eingesetzt werden, würden in diesem Fall als Wirkverstärker dienen.

Aus diesem Grund sollten in der Arbeit Alum-adsorbierte Allergene und Allergoide hinsichtlich ihrer Immunogenität analysiert werden. Obwohl Alum bereits seit Jahren in Impfstoffen verwendet wird, ist bis heute immer noch nicht genau geklärt, wie die verstärkende Wirkung zustande kommt. Alum wird eine Funktion bei der Induktion von IL-1 $\beta$  über das NALP3 Inflammasom zugeschrieben. Hierfür sollte die IL-1 $\beta$ -Expression in unreifen DC nach Behandlung mit Alum und Allergenen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Beta-Counter	Wallac Liquid Scintillation Counter 1205, LKB Wallac, Turku, Finnland
Brutschrank	5061 EK/CO2, Heraeus, Hanau
Dispenser	Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer	FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann, Eberstadt
ELISA-Reader	ELx 808, Bio Tek, Winooski, VT, USA
Fluoreszenzphotometer	SPECTRAFluor Plus, Tecan, Männedorf, Schweiz
Laser Scanning Mikroskop	Laser Scanning System LSM 710, Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	DM IL, Leicam, Wetzlar CH-2, Olympus, Hamburg
Magnetrührer	IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, Staufen
Magnetständer	für MACS-Säulen, Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette	Finnpipette 50-300 µl, Zwölfkanal, Thermo Scientific
Nanodrop	Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Mikroprozessor pH 539, WTW, Weilheim
PCR Geräte	Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA Thermocycler, Primus 96 advanced Gradient, Peqlab,
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg
Schüttler (Kreisschüttler)	Rotamax 120, Heidolph Instruments, Schwabach,
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Vortexer	Labotec, Wiesbaden
Waagen	Multifunktionswaage Baureihe HG, Roth, Karlsruhe MCI Analytic AC 210 S, Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	GFL, Schommartz-Labortechnik, Worms

	5 BU & Thermomix BU, B. Braun
Zählkammer (Neubauer)	Kühn & Bayer, Nidderau
Zellerntegerät	Skatron AS, Skatron, Norwegen
Zentrifugen	Minifuge RF, Heraeus Megafuge 1.0, Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus Biofuge fresco, Heraeus

### 2.1.2 Software

Anwendung	Programm
Auswertung, Statistik, Textverarbeitung	OfficeXP 2003, Microsoft, Redmond, USA
Biologische Zeichnungen	ChemBioDraw Ultra 12.0, Demoversion, Perkin Elmer
ELISA	KC Junior, Biotec Instruments, INC, Vermont, USA
FACS	CELL Quest II, BD Biosciences
Fluoreszenzspektrometer	XFLUOR4 Version V 4.51 für SPECTRAFluor Plus, Tecan, Männedorf, Schweiz
Laser Scanning Mikroskopie	ZEN 2009 Light Edition, Carl Zeiss Mikrolmaging 2006-2009, Jena
Nanodrop	Software zur Auswertung für Nanodrop 2000, Peqlab, Erlangen
Real-Time-PCR	SDS Software für Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA
Statistik, Auswertung	GraphPad Prism 5, Graph Pad Software, CA, USA



## 2.1.3 Verbrauchsartikel

Artikel	Art	Firma
Combitips	12.5 ml, 2.5 ml, 0.5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Einwegspritzen	1 ml 20 ml	B. Braun, Melsungen BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ELISA-Platte	96-well, Maxisorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kanülen	0.3 x 13 mm, 0.45 x 13 mm, 0.5 x 25 mm, 0.9 x 40 mm	BD Biosciences, San Jose, CA
Kryoröhrchen	3.6 ml 1.8 ml	Nunc, Wiesbaden Greiner, Frickenhausen
Nylonsieb	70 µm	BD Biosciences, San Jose CA, USA
Pasteurpipetten	230 mm	VWR International, Darmstadt
PCR-Platten	PP-PCR Platte 96 Well	Greiner, Frickenhausen
PCR Tubes	200 µl	Star Lab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen für PCR	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Star Lab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße	0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen	2.4 / 75 mm	BD Biosciences, San Jose CA, USA
Separationssäulen	MACS Separation Columns LS	Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach
Einmalspritzen	0,01 ml/1 ml	B. Braun, Melsungen
Sterilfilter	0.2 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkammer, Lab-Tek®	Kammer mit 4 Wells, 0.5-0.9 ml	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 48- und 96-well Flachboden	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner, Frickenhausen

### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Firma
<sup>3</sup> [H]-Thymidin	ICN, Irvine, CA, USA
7AAD	BD Biosciences, San Jose CA, USA
ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylenbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Alexa Fluor 488 <sup>®</sup> Protein Labeling Kit	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Aluminiumhydroxid (40 mg/ml) Alhydrogel <sup>®</sup> 1.3 % (Al(OH) <sub>3</sub> )	Pierce, Rockford, USA Brenntag Biosector, Fredrikssund, Dänemark
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck
Annexin V PE konjugiert	BD Biosciences, San Jose CA, USA
Antibiotic/Antimycotic (100 µg/mL Streptomycin, 100 U/mL Penizillin und 250 ng/ml Amphotericin B)	PAA, Cölbe
Aqua bidest, steril	B. Braun, Melsungen
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
BSA (bovines Serumalbumin), 0,1%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Buffy-Coats	Transfusionszentrale, Mainz
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
CAST <sup>®</sup> -2000 ELISA	Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz
CD4 MicroBeads human	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Coca-Puffer	ALK-Abelló (Batchnr.: 118613), Hørsholm, Dänemark
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure-Na <sub>2</sub> )	Boehringer, Mannheim
Ethanol 70%	Apotheke der Uniklinik, Mainz
Ethanol 100%	Apotheke der Uniklinik, Mainz
Ficoll 1.077	Biochrom, Berlin

Fix/Perm Puffer	eBiosciences, Inc., San Diego, CA, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glasfaser Filtermembran (Printed Filtermat A)	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
GolgiStop™	BD Biosciences, San Jose CA, USA
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm
Hepes	Roth, Karlsruhe
IMDM	PAA
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
LPS	Sigma-Aldrich
LysoTracker Green DND-26 LysoTracker Red DND-99	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Magnesiumchloridhexahydrat ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ )	Merck
Natriumchlorid NaCl, 0,9%	B. Braun
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Permeabilisierungspuffer	eBiosciences
PMA (phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich
pHrodo™ Red, SE	Invitrogen, Eugene, OR, USA
QCL-1000 LAL-Kit	Cambrex, Walkersville, USA
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTec® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure, 25% (HCl)	Merck
Natrium-Dihydrogen-Phosphat ( $NaH_2PO_4 \times H_2O$ )	Roth
Streptavidin (Peroxidase-gekoppelt)	Zymed, San Francisco, USA
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint eco	Roth

TE pH 8.0	Qiagen, Hilden
Tetanustoxoid, 1 µg/ml	Behring-Werke, Marburg
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid, 30% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Apotheke der Uniklinik, Mainz
Zitronensäure	Roth

## 2.1.5 Puffer und Medien

### 2.1.5.1 Kulturmedien

#### IMDM („Iscoe´s Modified Dulbecco´s Medium“)

Medium wird vor dem Gebrauch 1:100 mit Antibiotikum/Antimykotikum versetzt

### 2.1.5.2 Puffer und Lösungen

#### Apoptose-Puffer („Binding-Puffer“)

10 mM HEPES

140 mM NaCl

2.5 mM CaCl<sub>2</sub>

#### FACS-Puffer

0.1% (w/v) BSA in 1x PBS

#### Citratpuffer (0.1M)

Citronensäure in Aqua dest.

pH 4.35

#### MACS-Puffer

2 mmol EDTA und 5% FCS in 1x PBS

#### ELISA-Wasch-Puffer

1x PBS

#### ELISA-Blocking-Puffer

1% BSA in 1xPBS

ELISA -Substratpuffer

0.1 M Citrat und 1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

kurz vor Gebrauch:

Zugabe von 0.3 mg/ml ABTS

Natriumdihydrogenphosphat (0.1 M)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Aqua dest., pH 9.0

PBS („phosphate buffered saline“)

1x PBS Dulbecco Gibco, NY, USA

10x PBS Dulbecco Biochrom, Berlin

Trypanblaulösung

Trypanblau 1:10 in 1x PBS

**2.1.6 Zytokine****2.1.6.1 Zellkultur**

IL-1β	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
GM-CSF	Leukine®; Immunex Corp., Seattle, WA, USA
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
TNF-α	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

**2.1.6.2 ELISA**

Zytokine für die Standardreihe

IL-1 β	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	DNAX, Palo Alto, USA
IL-12p40	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
IL-13	R&D Systems, Wiesbaden
IL-17A	R&D Systems, Wiesbaden
IL-22	R&D Systems, Wiesbaden
IFN-γ	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Antikörper für Durchflusszytometrie

Spezifität	Name/Klon	Farbstoff	Spezies/Isotyp	Hersteller
CD4	MT310	Alexa Fluor 647	Maus IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz Biotechnology
CD80	L307.4	PE	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
CD83	HB15e	PE	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
CD86	2331 (FUN-1)	PE	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
FoxP3	PCH101	FITC	Ratte IgG <sub>2a</sub>	eBioscience
HLA-DR	L243	FITC	Maus IgG <sub>2a</sub>	BD Pharmingen
IFN- $\gamma$	4S.B3	FITC	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
IL-4	MP4-25D2	PE	Ratte IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
IL-10	JES3-19F1	PE	Ratte IgG <sub>2a</sub>	BD Pharmingen
IL-17	eBio64CAP17	PE	Maus IgG <sub>1</sub>	eBioscience

### 2.1.7.2 Antikörper für ELISA

#### Coating-Antikörper

	Klon (Coating-AK)	Spezies/Isotyp	Hersteller
IL-1 $\beta$	2805	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
IL-4	8D4-8	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-6	6708	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	JES3-19F1	Ratte IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-12p40	C8.3	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-13	JES10-5A2	Ratte IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17A	DuoSet ELISA human IL-17		R&D Systems, Wiesbaden
IL-22	DuoSet ELISA human IL-22		R&D Systems, Wiesbaden
IFN- $\gamma$	1-D1K	Maus IgG <sub>1</sub>	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden

## Detection-Antikörper

	<b>Klon (Detection-AK)</b>	<b>Spezies/Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>
IL-1 $\beta$	polyklonal	Ziege IgG	R&D Systems, Wiesbaden
IL-4	MP4-25D2	Ratte IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-6	polyklonal	Ziege IgG	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	JES3-12G8	Ratte IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-12p40	C8.6	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-13	B69-2	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17A	DuoSet ELISA human IL-17		R&D Systems, Wiesbaden
IL-22	DuoSet ELISA human IL-22		R&D Systems, Wiesbaden
IFN- $\gamma$	7-B6-1	Maus IgG <sub>1</sub>	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden

**2.1.8 Primer**

Für die Real-Time- PCR wurden QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die lyophilisierten Primer wurden in 1.1 ml TE (pH8.0) aufgelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

<b>Gen</b>	<b>Primer Assay</b>
$\beta$ -Aktin	Hs_ACTB_2_SG
IL-1 $\beta$	Hs_IL1B_1_SG

**2.1.9 Allergen und Allergoide**

Folgende Allergen- und Allergoidpräparationen wurden von ALK-Abelló (Hørsholm, Dänemark) hergestellt:

<b>Allergen</b>	<b>Modifizierung</b>	
<i>Betula verrucosa</i>	Nativer Allergenextrakt, Formaldehydallergoid, Glutaraldehydallergoid	Fraktionen mit hohem (high) und niedrigen (low) Molekulargewicht, alle Fraktionen (all)
rBet v 1	Nativer Allergenextrakt, Formaldehydallergoid, Glutaraldehydallergoid	Alle Fraktionen (all)
<i>Phleum pratense</i>	Nativer Allergenextrakt, Formaldehydallergoid, Glutaraldehydallergoid	Fraktionen mit hohem (high) und niedrigen (low) Molekulargewicht, alle Fraktionen (all)
nPhl p 1	Nativer Allergenextrakt, Formaldehydallergoid,	Alle Fraktionen (all)

	Glutaraldehydallergoid	
<i>Betula verrucosa</i>	Nativer Allergenextrakt, Formaldehydallergoid, Glutaraldehydallergoid	Alle Fraktionen, an Alum adsorbiert
<i>Phleum pratense</i>	Nativer Allergenextrakt, Formaldehydallergoid, Glutaraldehydallergoid	Alle Fraktionen, an Alum adsorbiert

Weiterhin wurden kommerzielle Gräser- und Birkenallergenmischungen von ALK-Abelló (Wedel) verwendet.

### 2.1.10 Allergiker

In die Experimente wurden allergische Spender, welche sensitiv für Lieschgraspollen und/oder Birkenpollen sind und eine IgE CAP Klasse von mindestens 2 aufwiesen, eingeschlossen. Die CAP Klasse wurde durch die Bestimmung von allergen-spezifischem IgE im Blut (ImmunoCAP®, Phadia AB, Uppsala, Schweden) ermittelt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die folgenden zellbiologischen Methoden wurden alle unter sterilen Bedingungen mit sterilen Reagenzien und Verbrauchsartikeln durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.1.1 Isolierung von PBMC aus Buffy-Coats

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden Zellen aus Buffy-Coats allergischer Spender verwendet. Daraus wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Buffy-Coats wurden von der Transfusionszentrale in Mainz bezogen.

Das Blutkonzentrat (ca. 80 ml) wurde auf drei 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und mit jeweils 15 ml Ficoll-Hepaque (Dichte: 1.077g/ml) unterschichtet. Danach erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm (RT, ohne Bremse). Mittels dieser Dichtezentrifugation entsteht eine untere rote Schicht, bestehend aus sedimentierten Erythrozyten, die obere klare Plasmaschicht und eine blassgelbe Interphase, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten. Von dem Blutplasma wurden 15 ml abgenommen und bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert. Um ausgefallene Proteine abzutrennen wurde das Plasma bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert und danach bei 4°C gelagert. Die entstandene Interphase wurde vorsichtig abgenommen und auf zwei neue 50 ml Zentrifugenröhrchen



verteilt. Die Zellen wurden mit 50 ml kaltem 1x PBS gewaschen (1800 rpm, 10 min, 4°C). Die beiden Zellpellets wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt und es erfolgten 2 weitere Waschschrirte mit 1x PBS bei 1400 rpm für 5 min (4°C). Die Zellen wurden in Medium (IMDM) und autologen Serum aufgenommen und eingefroren (siehe 2.2.1.2).

### 2.2.1.2 Kryokonservierung

Nach der Buffy-Coat-Aufreinigung wurden die isolierten PBMC in Flüssigstickstoff gelagert um eine längere Haltbarkeit der Zellen zu garantieren. Dafür wurden zunächst ca.  $1 \times 10^8$  PBMC in 450  $\mu$ l Medium, 450  $\mu$ l autologen Serum und 10% DMSO in einem Kryoröhrchen über Nacht bei -80°C eingefroren. Danach wurden die PBMC in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-172°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei RT. Die aufgetauten PBMC wurden mit 15 ml 1x PBS gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C) und konnten anschließend in den Versuchen eingesetzt werden.

### 2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahlen wurden mittels Trypanblaufärbung ermittelt. Trypanblau ist ein polyanionischer Farbstoff, der tote Zellen auf Grund der beschädigten Zellmembran blau anfärbt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop weiß. Die Zellen wurden 1:10 mit der Trypanblaulösung versetzt und in einer Neubauerzählkammer (Kammertiefe 0.1 mm, Fläche von einem Großquadrat:  $1 \text{ mm}^2$ ) die lebenden Zellen in einem Großquadranten unter dem Durchlichtmikroskop gezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$\text{Zellzahl/Gro\ssquadrant} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$
--

Der Kammerfaktor beträgt hierbei  $10^4$ .

### 2.2.1.4 Generierung von Dendritischen Zellen aus PBMC

Für die Generierung von dendritischen Zellen wurden  $5 \times 10^6$  PBMC in einer 12-Well-Platte in 1 ml Medium/Well mit 3% autologen Plasma für 45 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Monozyten besitzen die Eigenschaft an Plastik zu adhären. Um das Adhären von B-Zellen zu vermeiden, wurde autologes Plasma zugegeben. Nach 45 min wurden die nichtadhären Zellen abgesaugt und die adhärenenden Monozyten dreimal mit warmem 1x PBS gewaschen, um verbleibende Zellen, die nicht an die Plastikoberfläche gebunden haben zu entfernen. Die adhärenenden Monozyten wurden in 1.5 ml/Well Medium aufgenommen und mit 1000 U/ml IL-4, 200 U/ml GM-CSF („granulocyte–macrophage

colony-stimulating factor“) und 2% autologem Plasma versetzt um die Entwicklung in Richtung dendritischer Zellen zu stimulieren.

Nach drei Tagen in Kultur erfolgte die Zugabe von frischem Medium. Hierfür wurden vorsichtig 400 µl Medium aus jedem Well abgenommen und 500 µl frisches Medium (1000 U/ml IL-4, 200 U/ml GM-CSF, 2% Plasma) zugegeben.

An Tag 6 wurden die so entstandenen unreifen DC zur Ausreifung gebracht und mit Allergen/Allergoid beladen. Hierfür wurden wieder 400 µl Medium aus den Wells abgenommen und 500 µl neues Medium, welches nun zusätzlich die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β (2000 U/ml), TNF-α (1000 U/ml) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (1 µg/ml) enthielt, zugegeben. Gleichzeitig wurden die DC durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen an Allergenen bzw. Allergoiden stimuliert.

An Tag 8 wurden die ausgereiften DC geerntet. Diese waren nun nicht mehr adhärent, konnten leicht abgespült und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden. Jedes Well wurde danach mit 1x PBS gewaschen, die Röhrchen mit 1x PBS aufgefüllt und bei 1400 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, frisches 1x PBS auf die Zellen gegeben, das Röhrchen gevortext und erneut zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, 4°C). Schließlich wurden die Zellen je nach Pelletgröße in 200-500 µl Medium aufgenommen und gezählt.

### **2.2.2 Immunologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Isolierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC erfolgte mit Hilfe einer Magnetseparationstechnik (Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS). Hierbei binden CD4<sup>+</sup> T-Zellen einer Zellsuspension an magnetische Microbeads, welche mit einem CD4 Antikörper (monoklonal, anti-human CD4) konjugiert sind. Diese Zellsuspension wird auf eine magnetische Separationssäule gegeben, welche in einem Magneten verankert ist. Auf diese Weise binden die CD4<sup>+</sup> Zellen über die Magnetbeads an die Säule und sind somit von den CD4<sup>-</sup> Zellen abgetrennt. Entfernt man nun die Säule aus dem Magneten, so kann man die Population der CD4<sup>+</sup> Zellen isolieren.

Für die Experimente wurden PBMC aufgetaut und nach dem Waschen das Zellpellet in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die α-CD4-Microbeads wurden im Verhältnis 5:1 (50 µl) zu den Zellen gegeben und für 25 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C), um ungebundene Beads zu entfernen. Die magnetische Säule wurde in den Magneten gespannt und mit 7 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säule im Magneten gegeben. Das Röhrchen wurde erneut mit 1 ml MACS-Puffer gespült um evtl.

noch vorhandene Zellen nicht zu verlieren. Im Weiteren erfolgten drei Waschschr tte mit jeweils 3 ml MACS-Puffer. Die CD4<sup>-</sup> Zellen, welche nicht an der Säule haften blieben wurden währenddessen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen, um daraus später DC zu generieren. Um die CD4<sup>+</sup> T-Zellen von der Magnets ule zu isolieren wurde diese aus dem Magneten herausgenommen und mit ca. 7 ml MACS-Puffer befüllt. Daraufhin wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Stempel in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen aus der Säule herausgedrückt. Die CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup> wurden bei 1400 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert, danach in Medium aufgenommen und mittels Trypanblaufärbung die Lebendzellzahl bestimmt.

### 2.2.2.2 Proliferationsassay

Die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Einbaus ( $\beta$ -Strahler) analysiert. Thymidin ist ein Bestandteil der menschlichen DNA. Bei der Zellteilung wird stets neues Thymidin in die entstehenden DNA-Stränge eingebaut. Gibt man nun radioaktiv markiertes <sup>3</sup>[H]-Thymidin zu einer Zellkultur, so wird dieses in die neu entstehenden Zellen eingebaut und man kann durch die zunehmende Radioaktivität die steigende Zellteilung bestimmen.

Für den Proliferationstest wurden  $1 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen und  $1 \times 10^4$  autologe DC mit 5% autologem Plasma in 200  $\mu$ l Medium in dreifachen Ansätzen in einer 96-Well-Platte cocultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte die Zugabe von jeweils 37 kBq/Well <sup>3</sup>[H]-Thymidin und eine weitere Inkubation über Nacht. Um den Einbau des radioaktiven Thymidins zu messen, wurden die Zellen mit einem Zellharvester geerntet und die radioaktive DNA dabei an eine Glasfasermembran gebunden. Diese wurde für 15 min bei 100°C getrocknet und in eine Plastikfolie mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt, um im Beta-Counter die Radioaktivität zu bestimmen. Gemessen wurde die Radioaktivität in „counts per minute“ (cpm).

### 2.2.2.3 Zytokinbestimmung mittels ELISA

Mit Hilfe des ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) ist es möglich, Zytokine aus Zellkulturüberständen zu analysieren.

Bei dem Sandwich-ELISA-Verfahren werden zwei Antikörper gegen das Zielantigen eingesetzt. Ein erster Antikörper („Coating-Antikörper“) wird an die feste Phase, die Mikrotiterplatte, gebunden. Daraufhin wird die Substanz, die das zu untersuchende Antigen beinhaltet, in die Wells gegeben und kann an den ersten Antikörper binden. Nach einer Inkubationszeit wird überschüssiges Antigen abgewaschen und zurück bleiben der coating-Antikörper und das Antigen. Daraufhin wird ein zweiter Antikörper („Detection-Antikörper“), der ein anderes Epitop des Antigens erkennt, zugegeben. Überschüssige

Antikörper werden erneut durch Waschen entfernt. Der Zweitantikörper enthält entweder direkt ein Enzym mit dessen Hilfe nach Zugabe eines chromogenen Substrats ein Farbumschlag gemessen werden kann und es somit möglich ist die Menge an Antigen zu quantifizieren. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten ELISA wurde jedoch ein Detection-Antikörper verwendet, an den zusätzlich mehrere Biotinmoleküle gekoppelt sind. Daran kann in einem weiteren Schritt Streptavidin binden, an welches nun das Enzym HRP gekoppelt ist. Da an jeden Antikörper mehrere Biotinmoleküle binden können, wird hierdurch eine Verstärkung des Signals erreicht

Um die Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu analysieren wurden 5x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 5x10<sup>4</sup> autologen DC und 5% autologen Plasma in 1 ml Medium inkubiert. An Tag 7 wurden die Zellen mit neu generierten DC restimuliert und für weitere 24 h inkubiert. Danach wurden die Überstände der Zellen vorsichtig abgenommen und bis zur Durchführung des ELISA bei -80°C gelagert. Alternativ wurden Überstände aus DC-Kulturen an Tag 2 nach Ausreifung der Zellen abgenommen und eingefroren. Für die Bestimmung der Zytokine wurden 50 µl Coating-Antikörper in 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in eine 96-Well-Maxisorp-Platte gegeben und für 24 h bei 4°C inkubiert.

Zytokine	Konzentration/Well (coating-AK)
IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-22	2 µg/ml
IFN-γ, IL-17	4 µg/ml
IL-12p40	8 µg/ml

Es folgten zwei Waschschritte mit 1x PBS (ELISA-Waschpuffer) und die Zugabe von 200µl/Well Blocking-Puffer (1% BSA in 1x PBS). Freie Bindestellen wurden dabei für 2 h bei 37°C abgesättigt. Die Platte wurde erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Standardreihe (10 Verdünnungsschritte, jeweils 1:2) und die Überstände, jeweils 100 µl/Well, aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

	Startkonzentrationen der Standardreihe in pg/ml	
IL-1β	10000	→ 1:2
IL-4	1000	→ 1:2
IL-6	10000	→ 1:2
IL-10	2500	→ 1:2
IL-12p40	25000	→ 1:2
IL-13	10000	→ 1:2
IL-17	2000	→ 1:2
IL-22	4000	→ 1:2
IFN- γ	4000	→ 1:2

Am Tag der Messung wurde die Platte 4mal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl/Well biotinylierter Detection-Antikörper in 1x PBS + 0.1% BSA auf die Platte gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert.

Zytokine	Konzentration/Well (detection-AK)
IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-13, IFN-γ	1 µg/ml
IL-17	150 ng/ml
IL-22	250 ng/ml

Danach erfolgte ein 4maliges Waschen, 100 µl/Well Streptavidin-HRP (1:4000, 0.3 µg/ml) in 1x PBS + 0.1% BSA wurden zugegeben und bei 37°C für 45 min inkubiert. Währenddessen wurde die Substratlösung bestehend aus 0.1M Citratpuffer, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ABTS angesetzt. Im Anschluss an die Inkubation mit Streptavidin wurde die Platte 8mal mit Waschpuffer gewaschen und 100µl/Well Substratlösung zugegeben. Nach Entstehen der Farbentwicklung konnte diese bei 415 nm im ELISA-Reader gemessen werden.

#### 2.2.2.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence activated cell sorting) genannt, können Zellen auf Grund von charakteristischen Merkmalen wie Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften oder der intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden. Die Zellen können hierbei durch das Anfärben spezifischer Marker mit einem Fluoreszenzfarbstoff unterschieden werden. Einzelne Zellen einer Suspension werden dabei an einem Laser vorbeigeführt und die entstehenden Lichtsignale mittels Photodetektoren gemessen. Passiert eine Zelle einen Laser, so kommt es zur Streuung des Lichts. Ein Teil des Lichts geht durch die Zelle hindurch und wird um bis zu 20° abgelenkt. Dieses Licht wird als Vorwärtsstreulicht bezeichnet (FSC, „forward scatter channel“) und charakterisiert die Größe der Zelle. Ein anderer Teil des Lichtstrahls wird um 90° gebrochen und detektiert. Dies ist das Seitwärtsstreulicht (SSC, „side scatter channel“), welches Aufschluss über die Granularität der Zelle gibt. So kann man zunächst Zelltypen (z.B. Monozyten, Granulozyten) in einer heterogenen Probe differenzieren. Werden die Zellen zusätzlich mit Fluorochromen behandelt, so kann man Zellen nach dem Vorhandensein charakteristischer Marker, wie z.B. Oberflächenmarker oder intrazellulären Zytokinen, separiert darstellen. Dafür existieren in den Messgeräten unterschiedliche Fluoreszenzkanäle (FL-Kanal, Photomultiplier), die emittiertes Licht unterschiedlicher Wellenlängen detektieren. Optische Filter kontrollieren welche Wellenlängen spezifisch detektiert werden. Unerwünschte Wellenlängen werden blockiert bzw. absorbiert. Das eintreffende Lichtsignal wird von den Detektoren in ein elektrisches Signal umgewandelt.

### **2.2.2.5 Analyse von Oberflächenmarkern**

Zur Messung von Oberflächenmarkern wurden mindestens  $1 \times 10^5$  DC oder  $5 \times 10^5$  T-Zellen in ein Rundbodenröhrchen gegeben und bei 1400 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurden die Antikörper (25 µl von 1:20 Verdünnung der Originallösung in FACS-Puffer) zu den Zellen gegeben, gevortext und für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden überschüssige Antikörper durch Waschen mit 750 µl FACS-Puffer entfernt (1400 rpm, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und waren somit bereit zum Messen.

### **2.2.2.6 Analyse von intrazellulären Markern**

In den beschriebenen Experimenten wurden intrazelluläre Zytokine von T-Zellen analysiert. Diese befanden sich, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, in Cokultur mit autologen DC. Die Analyse erfolgte an Tag 9 bzw. an Tag 6 der Cokultur. Um eine maximale Zytokinproduktion zu stimulieren wurde 50 ng/ml PMA/1 µg/ml Ionomycin zu den Zellen gegeben. Damit die produzierten Zytokine nicht aus den Zellen heraustransportiert werden konnten, wurde 0.7 µl GolgiStop™ zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4h bei 37°C wurden die Zellen in Rundbodenröhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (1400 rpm, 5 min, 4°C). Bei der Analyse von intrazellulären Zytokinen mussten die Zellen fixiert werden. Dies geschah mit einem Fixierungs-/Permeabilisierungsreagenz (Fix/Perm Puffer). Konzentrat und Diluent wurden hierbei 1:4 verdünnt und 250 µl der Lösung zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 4°C. Danach wurde mit 1.5 ml FACS-Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C). Mit Hilfe eines Permeabilisierungspuffers (Saponin, 1:10 in Aqua dest.) wurde die Zellwand permeabilisiert. Die Zellen wurden in 1.5 ml Saponin gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. In der Zeit wurden die Zellen auf mehrere Röhrchen aufgeteilt (abhängig davon wie viele Zytokine man untersuchen will). Die Zellen wurden bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die jeweiligen Antikörper (in Saponin verdünnt oder unverdünnt) in die Röhrchen gegeben (in der Regel 0.25 µg pro Probe) und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde ein letztes Mal mit 750 µl FACS-Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C) und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen

### **2.2.2.7 Apoptose Assay**

Mit Hilfe des Apoptose Assays unterscheidet man apoptotische und nekrotische Zellen. Hierzu werden diese mit Annexin V und 7AAD behandelt. Untergeht eine Zelle Apoptose, so verliert sie ihre Plasmamembran. Dies geschieht in einem frühen Stadium der Apoptose. Dabei wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren

Zellmembran auf die extrazelluläre Seite verlagert. Annexin V, ein Phospholipid bindendes Protein, kann nun an das exponierte PS binden. Mit Hilfe von fluorchrom-markiertem Annexin V kann man frühapoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie nachweisen. Um nekrotische Zellen und Zellen in einem späteren Apoptosestadium zu detektieren wird der Farbstoff 7-Amino-Actinomycin (7AAD) eingesetzt. Tote und beschädigte Zellen sind permeabel für diesen Farbstoff. Man unterscheidet somit Zellen, die zu einem frühen Zeitpunkt Apoptose begangen und daher Annexin V<sup>+</sup> und 7AAD<sup>-</sup> sind von nekrotischen Zellen oder spätapoptotischen Zellen, welche Annexin<sup>+</sup> und 7AAD<sup>+</sup> sind. Ca.  $1 \times 10^5$  DC wurden in ein Rundbodenröhrchen geerntet und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden daraufhin in 60 µl Binding-Puffer aufgenommen und 25 µl Annexin V-FITC und 25 µl 7AAD (1:10 bzw. 1:5 in Binding-Puffer verdünnt) zugegeben. Die Proben wurden vorsichtig gevortext und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 200 µl Binding-Puffer zugegeben und die Zellen innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen.

#### **2.2.2.8 Bestimmung der Basophilen-Aktivierung**

Die Untersuchung der Aktivierung von Basophilen durch Allergene und Allergoide erfolgte mit Hilfe des CAST<sup>®</sup>-2000 ELISA („cellular antigen stimulation test“). Der Kontakt von Basophilen allergischer Patienten (Typ I Allergie) mit dem entsprechenden Allergen/Antigen führt zu einer IgE vermittelten Ausschüttung von Sulfidoleukotrienen (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), welche mittels ELISA quantifiziert werden können. EDTA-Vollblut allergischer Spender wird hierfür mit Dextran versetzt, damit die Erythrozyten sedimentieren. Die Leukozyten aus dem darüber liegenden Überstand werden mit IL-3 und Allergen stimuliert und die Freisetzung der Leukotriene mittels ELISA gemessen.

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers und wird hier nur kurz zusammengefasst beschrieben. 250 µl Dextran wurden zu 1 ml EDTA-Blut allergischer Spender gegeben und die Erythrozyten konnten für 90 min bei RT sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und bei 800 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Leukozyten wurden in 1 ml Stimulationspuffer, welcher IL-3 beinhaltet resuspendiert. 200 µl der Zellsuspension wurden mit Allergen oder Allergoid in verschiedenen Konzentrationen für 40 min bei 37°C stimuliert. Als Kontrolle diente ein anti-human IgE Rezeptor Antikörper. Zur Bestimmung des Backgrounds wurden die Zellen mit 50 µl Stimulationspuffer inkubiert. Zuletzt wurden die Proben bei 2500 rpm für 3 min zentrifugiert und die Überstände bei -20°C gelagert oder direkt im ELISA eingesetzt.

### 2.2.2.9 Bestimmung des spezifischen IgE mittels ImmunoCAP®

Beim ImmunoCAP®, auch RAST („radio allergosorbent test“) genannt, wird gesamt-IgE und allergen-spezifisches IgE im Serum allergischer Patienten nachgewiesen. Bei diesem Testverfahren werden sieben Immunocap-Klassen unterschieden, welche sich nach der Menge des detektierten spezifischen IgE richten:

Immunocap-Klasse 0	< 0.35 kU/l
Immunocap-Klasse 1	0.35-0.7 kU/l
Immunocap-Klasse 2	0.7-3.5 kU/l
Immunocap-Klasse 3	3.5-17.5 kU/l
Immunocap-Klasse 4	17.5-50 kU/l
Immunocap-Klasse 5	50-100 kU/l
Immunocap-Klasse 6	> 100 kU/l

Ab einer Immunocap-Klasse von 2 liegt eine erhöhte Menge an allergen-spezifischem IgE vor, was auf eine Allergie hindeutet.

Den allergischen Spendern wurde in eine Serummonovette Blut abgenommen und dieses bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Der ImmunoCAP® Test wurde von den

Mitarbeiterinnen der Routine in der Haut- und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

### 2.2.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (LSM) können diverse Fragestellungen, auch an lebenden Zellen, erforscht werden. Dabei werden die Zellen dreidimensional von einem fokussierten Laserstrahl zeilenweise abgerastert (scannen). Bei einer fluoreszenzmarkierten Probe wird das emittierte Licht von einem Strahlungsdetektor aufgefangen und aus den einzelnen Punkten wird ein Bild konstruiert. Die Methode ermöglicht es dicke Präparate, wie komplette Zellen oder Zellverbände, scharf unter dem Mikroskop abzubilden. Des Weiteren können dynamische Prozesse an lebenden Zellen untersucht werden.

#### 2.2.3.1 Analyse von Allergen- und Allergoid-Aufnahme in dendritische Zellen mittels Laser Scanning Mikroskopie

Die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Allergen und Allergoid erfolgte in unreife DC. An Tag 6 der Zellkultur wurde Allergen und Allergoid in unterschiedlichen Konzentrationen zu den DC gegeben und die Aufnahme nach diversen Zeitpunkten (10 min bis 48h) untersucht. Für die Analyse unter dem LSM wurden pro Bedingung 500 µl DC in IMDM in Zellkammern überführt. In einigen Experimenten wurden zusätzlich die Lysosomen mittels LysoTracker® angefärbt. Dieser wurde in einer Konzentration von 60 nM 10 min vor Beginn der Analyse zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Zufuhr am Laser Scanning Mikroskop (Laser Scanning System LSM 710, Zeiss, Jena)



analysiert. Die Durchführung der Experimente erfolgte an der LSM Core Facility der Universitätsmedizin Mainz.

## **2.2.4 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.4.1 Fluoreszenzmarkierung von Allergenen und Allergoiden**

Um die Aufnahme von Allergenen und Allergoiden in DC zu beobachten wurden Allergene und Allergoide mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor 488<sup>®</sup> oder pHrodo<sup>™</sup> markiert. Die Durchführung verlief nach Angaben des Herstellers und wird im Folgenden kurz zusammengefasst.

Alexa Fluor 488<sup>®</sup> Protein Labeling Kit: 0.5 ml Allergen bzw. Allergoid (1 mg/ml) wurden mit 50 µl 1M Bicarbonat versetzt und daraufhin in ein Röhrchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff überführt. Der Reaktionsmix inkubierte für 1h bei RT schüttelnd unter Lichtausschluss. Um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, wurde der Protein-Farbstoffmix über eine Säule mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Die erste farbige Bande, welche das Protein mit konjugiertem Fluoreszenzfarbstoff enthalten soll, wurde in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und die Proteinmenge mittels BCA-Assays bestimmt. pHrodo<sup>™</sup>, Red, SE (amine-reactive probes): Für die Markierung mit pHrodo<sup>™</sup> wurden 1 ml Allergen bzw. Allergoid (1 mg/ml) eingesetzt. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie der Markierungsprozess für Alexa Fluor 488<sup>®</sup>.

### **2.2.4.2 Proteinbestimmung mittels BCA Assay**

Die Konzentration von Proteinen wurde mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt. Bei diesem Verfahren reagieren Cu<sup>2+</sup> Ionen mit den Proteinen zu Cu<sup>+</sup> Ionen. Diese reagieren wiederum mit der Bicinchoninsäure (BCA), wodurch ein violettes Reaktionsprodukt entsteht. Dieses kann bei 562 nm gemessen werden und somit die Proteinkonzentration quantitativ bestimmt werden, da diese Absorption linear mit der Proteinkonzentration ist. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.4.3 Endotoxinbestimmung mittels Limulusassay**

Mit Hilfe des LAL-Tests („Limulus Amebocyte Lysate“) können Endotoxine Gram-negativer Bakterien in Extrakten und Lösungen quantitativ nachgewiesen werden. Das bakterielle Endotoxin katalysiert die Aktivierung eines Proenzym aus dem LAL. Das entstandene Enzym katalysiert wiederum die Abspaltung von p-Nitroanilin (pNA) von dem farblosen Substrat (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA), wodurch es zu einem Farbumschlag kommt, welcher bei 405-410 nm gemessen werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers.

#### 2.2.4.4 Gesamt RNA-Isolierung aus dendritischen Zellen

Die Gesamt RNA dendritischer Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen aufgereinigt. Damit ist es möglich RNA mit einer Nukleotidlänge von über 200 zu isolieren. Zunächst werden hierbei die Zellen durch Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-Puffers lysiert und homogenisiert. Um optimale Bindungskonditionen zu schaffen wird 70% Ethanol hinzugefügt und die Probe danach auf eine Silicamembran gegeben, an die die RNA binden kann. Überschüssiges Material wird in diversen Waschschritten entfernt und die reine RNA kann eluiert werden. Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem Aqua dest. aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt. Die genaue Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 2.2.4.5 Konzentrationsbestimmung am Nanodrop

Zur Konzentrationsbestimmung von isolierter Gesamt RNA wurde 1 µl RNA am Nanodrop gemessen. Aus der ermittelten Konzentration konnte danach die RNA Menge errechnet werden, die zur Synthese der cDNA benötigt wurde.

#### 2.2.4.6 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Bei der reversen Transkription wurde RNA aus dendritischen Zellen in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kits von Qiagen. Dabei wurde in einem ersten Schritt genomische DNA entfernt und danach die RNA direkt in cDNA umgeschrieben. Es wurden, wenn möglich, 150 ng RNA eingesetzt. Die cDNA wurde 1:10 in RNase freiem Aqua dest. verdünnt und bei -20°C gelagert.

Die detaillierte Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Eliminierung von genomischer DNA:

gDNA Wipeout Puffer (7x)	2 µl
Template RNA	Variabel (150 ng)
RNase freies Aqua dest.	variabel
Gesamtvolumen	14 µl

Der Ansatz wurde für 2 min bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die reverse Transkription.

Ansatz für reverse Transkription:

<b>Master Mix</b>	
Quantiscript reverse Transkriptase	1 µl
Quantiscript RT Puffer (5x)	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Template RNA nach Entfernen der genomischen DNA	14 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Der Ansatz wird für 15 min bei 42°C inkubiert. Zum Abschluss wird die Temperatur für 3 min auf 95°C erhöht um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

#### 2.2.4.7 Quantitative Real-Time-PCR

Mit der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR, „Echt-Zeit-PCR“) ist es möglich, die vervielfältigten Nukleinsäuren zu quantifizieren. Möchte man Unterschiede in der Genexpression feststellen, so wird zunächst mRNA in cDNA umgeschrieben und diese dann in der qRT-PCR eingesetzt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs, welcher sich während der Reaktion in die sich amplifizierenden DNA-Stränge einbaut, lässt sich die Menge an neu synthetisiertem PCR-Produkt bestimmen. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an synthetisierter DNA zu. Diese wird zu jedem Zeitpunkt der PCR gemessen. Mit Hilfe der Fluoreszenzsignale aus der exponentiellen Phase erfolgt die Quantifizierung. Hier heben sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts signifikant von der Hintergrundfluoreszenz ab. Dabei beschreibt der Cycle-Threshold-Value ( $C_t$ ) die Zyklenzahl bei der diese Schwelle zwischen Hintergrund und signifikanten Signal überschritten wird. Die  $C_t$  Werte werden dann herangezogen, um quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge der Ziel-DNA zu machen. Zum Vergleich wird neben dem zu untersuchendem Gen („gene of interest“ GOI) ein Referenzgen („Haushaltsgen“, z.B.  $\beta$ -Aktin), welches ubiquitär exprimiert wird, analysiert.

Um die Genexpression zu untersuchen, wurde das QuantiFast<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Hierbei wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green in die entstehende doppelsträngige DNA eingebaut. Bei den eingesetzten Primern handelte es sich um QuantiTect Primer Assays (unter 2.1.8 beschrieben).

Reaktionsmix (25  $\mu$ l Gesamtvolumen):

2x SYBR <sup>®</sup> Green Mastermix	12.5 $\mu$ l
Primer	2.5 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l
RNase freies Aqua dest.	8 $\mu$ l

Programm für das Applied Biosystems PCR-System 7300

	<b>Abschnitte</b>	<b>Wiederholungen</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit (min)</b>
1	Hotstart	1	95.0°C	05:00
2	Denaturierung	40	95.0°C	00:10
	Annealing/Elongation		60.0°C	00:30
3	Denaturierung	1	95.0°C	00:30
4	Annealing/Elongation	1	60.0°C	00:30
5	Dissoziation	1	95.0°C	00:15
			60.0°C	01:00
			95.0°C	00:15

Ab Abschnitt 2/2. Zyklus werden die Daten gesammelt. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt von Abschnitt 3 bis 5.

Bei der Auswertung wurden die C<sub>t</sub>-Werte (Doppelbestimmung) der jeweiligen Proben zunächst gemittelt und die Werte des GOI daraufhin gegen die Werte des Haushaltsgens normalisiert (nach *Livak et al.*):

$$\left( \frac{2^{-Ct_{GOI}}}{2^{-Ct_{Ref\ Gen}}} \right)$$

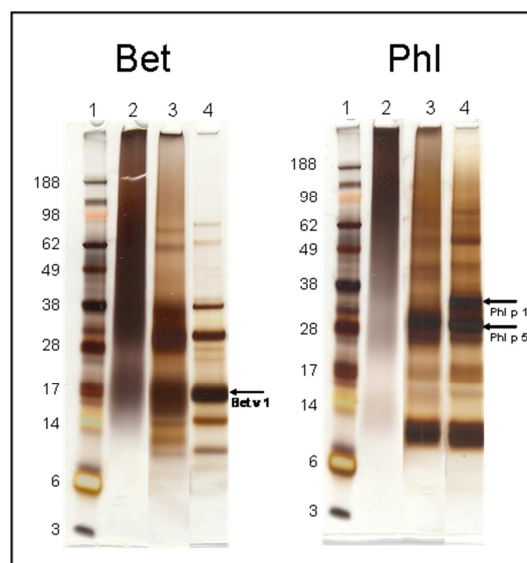
Die normalisierten Werte der Proben wurden untereinander verglichen um Unterschiede in der Genexpression zu ermitteln.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse von nativen Allergenen und Allergoiden

In der Arbeit wurden native Allergenextrakte von Birkenpollen (*Betula verrucosa*) und Lieschgras (*Phleum pratense*) sowie die entsprechenden modifizierten Allergoide hinsichtlich ihrer Allergenität und Immunogenität verglichen.

Die verwendeten Allergen- und Allergoid-Präparationen wurden von ALK-Abelló (Hørsholm, Dänemark) hergestellt. Die Allergoide wurden wahlweise mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd modifiziert. Die Modifizierung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Allergoide, die mit Glutaraldehyd behandelt wurden, zeigten bei einem hohen Molekulargewicht einen Schmier im Gel, der sich auf eine hohe Aggregation der Proteine zurückführen lässt. Abgegrenzte Banden, wie sie bei dem intakten Allergenextrakt zu sehen waren, waren nicht erkennbar. Bei dem mit Formaldehyd modifizierten Allergoid war dieser Schmier deutlich reduziert und distinkte Banden waren auf dem Gel zu erkennen. Zusätzlich änderte sich während der Prozedur die Ladung der Proteine (die Durchführungen erfolgte im Labor in Hørsholm, Dänemark).



**Abbildung 6: Nachweis der Formaldehyd- und Glutaraldehyd-Modifizierung von Allergoiden mittels Westernblot**

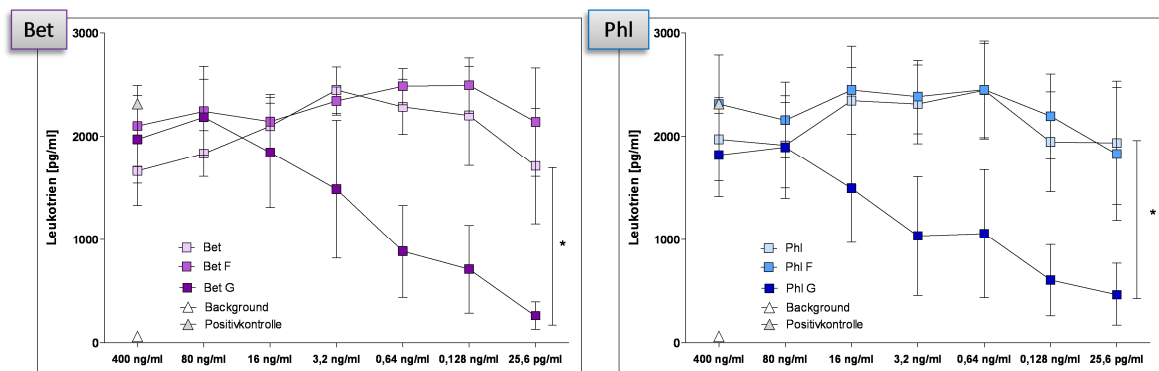
Auf dem 10%igen Polyacrylamidgel wurden der intakte Allergenextrakt und die jeweils entsprechenden modifizierten Allergoide (jeweils 5 µg/Spur) aufgetragen. Für Bet: Spur 1: Marker (in kDa), Spur 2: Glutaraldehyd-Allergoid, Spur 3: Formaldehyd-Allergoid, Spur 4: intakter Allergenextrakt; Phl: Spur 1: Marker, Spur 2: Glutaraldehyd-Allergoid, Spur 3: Formaldehyd-Allergoid, Spur 4: intakter Allergenextrakt; die Pfeile zeigen die jeweiligen Hauptallergene; Bet: *Betula verrucosa*, Phl: *Phleum pratense*

Bevor die Präparationen in den Versuchen eingesetzt wurden, wurde mit Hilfe des Limulus-Assays der Endotoxingehalt bestimmt und die Konzentrationen mittels BCA-Assays überprüft. Der Endotoxingehalt der jeweiligen Präparationen war sehr gering (nicht gezeigt) und sollte keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Experimente nehmen.

### 3.1.1 Verminderte Leukotrien-Ausschüttung durch Basophile nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoiden

Durch die Bindung von Allergen an Allergen-spezifisches IgE auf der Oberfläche basophiler Granulozyten kommt es zur Kreuzvernetzung des Immunglobulins und zu einer Ausschüttung von Allergiemediatoren, wie z.B. Leukotriene. Zur Analyse der Allergene und Allergoide hinsichtlich ihrer IgE-Bindekapazität und der resultierenden Fähigkeit, Basophile zu aktivieren, wurde die Leukotrien-Freisetzung aus Basophilen atopischer Spender nach Stimulation mit den Allergenen und Allergoiden mittels ELISA quantifiziert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an intaktem Allergen und den jeweiligen Allergoiden stimuliert. Als Positivkontrolle diente ein Antikörper gegen den hochaffinen IgE Rezeptor (FcεRI). Die Negativkontrolle (Background) bestand aus Zellen, die ausschließlich mit dem Stimulationspuffer behandelt wurden.

Beide intakten Allergenextrakte und Formaldehyd-Allergoide bewirkten eine hohe Freisetzung von Leukotrienen aus den Basophilen (Abbildung 7). Auch bei verminderten Allergenkonzentrationen blieb die Freisetzung ähnlich hoch wie die Positivkontrolle. Bei der Zugabe der Glutaraldehyd modifizierten Allergoide zeigte sich eine signifikante Verminderung der Leukotrien-Freisetzung wenn die Konzentration an Allergoid reduziert wurde.



**Abbildung 7: Leukotrien-Freisetzung Basophiler nach Stimulation mit Allergen und Allergoid**

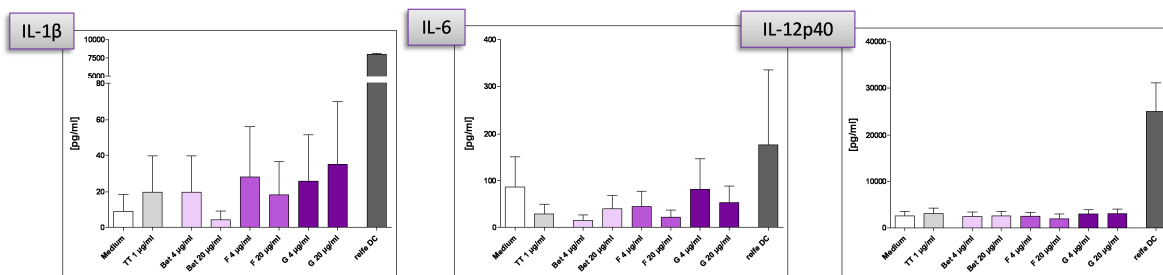
Basophile allergischer Spender wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Allergenen und Allergoid stimuliert und die resultierende Freisetzung von Leukotrienen mittels ELISA quantifiziert. Bet/Phi: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid, Background: Basophile mit Stimulationspuffer, Positivkontrolle: Zugabe des Anti-FcεRI Antikörpers; gezeigt sind die Mittelwerte von 10 unabhängigen Experimenten, \* $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3.1.2 Zytokinproduktion dendritischer Zellen

Um zu untersuchen ob die Zugabe von Allergenen und Allergoiden zu dendritischen Zellen zu einer unterschiedlichen Produktion an Zytokinen führt, wurden unreife DC allergischer Spender an Tag 6 der Kultur mit Birken und Lieschgras Allergen oder den jeweiligen modifizierten Allergoiden gepulst und nach weiteren 48h Überstände abgenommen. Als Negativkontrolle bzw. Positivkontrolle dienten hier sowie auch in allen folgenden Experimenten Zellen, welche nur mit dem Kulturmedium behandelt wurden bzw. Zellen, welche mit Tetanustoxoid (1 µg/ml) beladen waren.

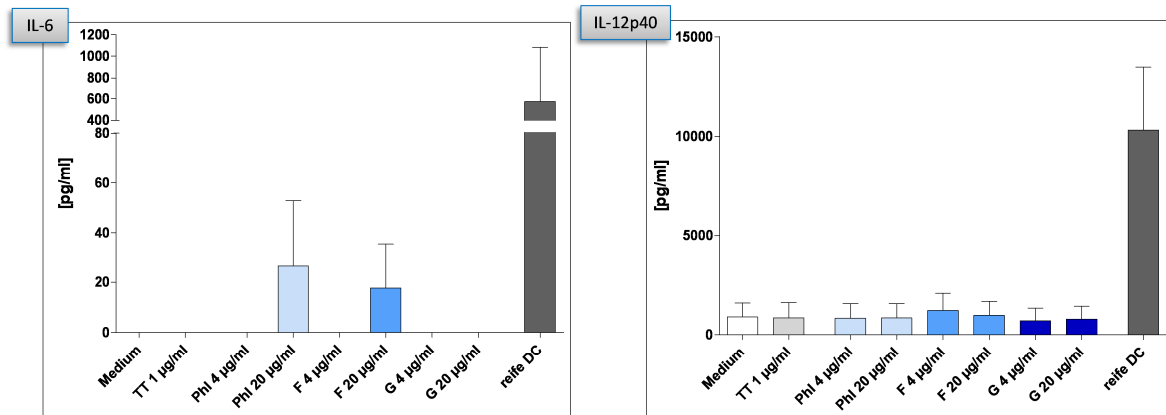
Mittels ELISA wurde die Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12p40 quantifiziert. Als Kontrolle wurden DC mit einem Cocktail aus pro-inflammatorischen Zytokinen ausgereift (reife DC). Unreife DC produzierten nach Stimulation mit Bet Allergen und Allergoid nur geringe Mengen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12p40 (Abbildung 8), die sich nicht von mit Allergen und Allergoid stimulierten und unstimulierten Zellen (Medium) unterschieden. Lediglich die Freisetzung von IL-1 $\beta$  wurde durch die Zugabe von Allergen und Allergoid im Vergleich zu unstimulierten Zellen in geringem, nicht signifikantem Maß beeinflusst.

Mit Phl Allergen und Allergoiden gepulste DC zeigten, verglichen mit der Behandlung von Bet Allergen und Allergoiden, eine verringerte Zytokinproduktion. IL-1 $\beta$  wurde nur in der Positivkontrolle (reife DC) gemessen (nicht gezeigt). IL-6 war lediglich in den Überständen von Allergen – und Formaldehyd-Allergoid-gepulsten DC (20 µg/ml) nachweisbar. IL-12p40 wurde, wie auch schon bei der Zugabe von Bet Allergen und Allergoid beobachtet, gleichermaßen freigesetzt. Insgesamt ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion von Allergen- und Allergoid-gepulsten unreifen dendritischen Zellen feststellen.



**Abbildung 8: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Bet Allergen und Allergoiden**

DC wurden an Tag 6 in Kultur mit 4 bzw. 20 µg/ml Allergenextrakt oder Allergoid gepulst und nach 48 h die Zytokinproduktion in den Überständen mittels ELISA bestimmt. TT: Tetanustoxoid, Bet: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte von 7 unabhängigen Experimenten.

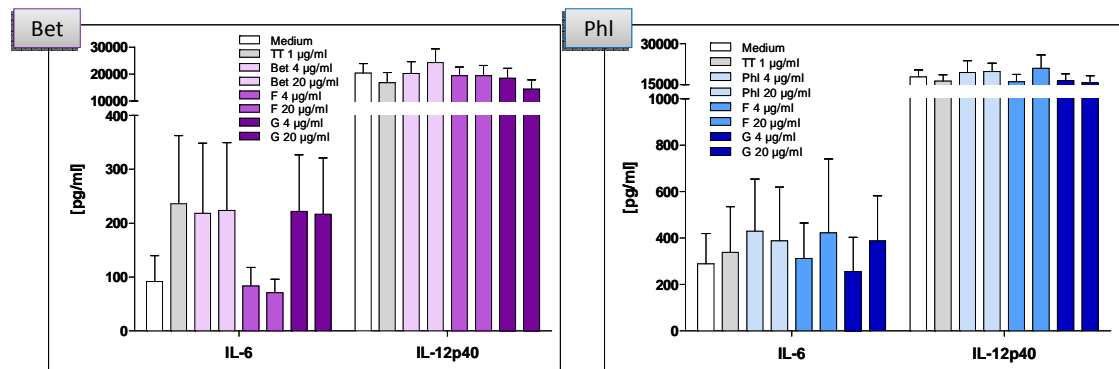


**Abbildung 9: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Phl Allergen und Allergoiden**

DC wurden an Tag 6 in Kultur mit 4 bzw. 20 µ/ml Allergenextrakt oder Allergoid gepulst und nach 48 h die Zytokinproduktion in den Überständen mittels ELISA bestimmt. TT: Tetanustoxoid, Phl: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 7 unabhängiger Experimente.

Des Weiteren wurden DC allergischer Spender an Tag 6 der Kultur zusätzlich zur Stimulation mit Bet oder Phl Allergen und Allergoid mit einem Cocktail aus pro-inflammatorischen Zytokinen behandelt um reife DC zu generieren. Nach 48 h wurden Kulturüberstände abgenommen und mittels ELISA die produzierten Zytokine quantifiziert. Bestimmt wurden hierbei nur IL-6 und IL-12p40, da IL-1β Bestandteil des Zytokin-Cocktails ist. Ähnlich wie bei unreifen DC war die Produktion an IL-6 geringer als die Produktion an IL-12p40 (Abbildung 10). Bei letzterem Zytokin zeigten sich keine Unterschiede zwischen unstimulierten und mit Allergen oder Allergoid stimulierten Zellen. Wurden die Zellen mit TT, Bet intaktem Allergen und Glutaraldehyd-Allergoid behandelt, so zeigte sich eine leicht erhöhte IL-6 Produktion, welche jedoch nicht signifikant war. Die Zugabe von Phl Allergen und Allergoid zu den DC bewirkte unter allen Bedingungen eine ähnliche Freisetzung von IL-6 und IL-12p40 (Abbildung 10). Auch reife DC wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Produktion von IL-6 und IL-12p40 auf, wenn sie mit intaktem Allergenextrakt oder modifizierten Allergoiden behandelt wurden.





**Abbildung 10: IL-6 und IL-12p40 Produktion reifer DC nach Stimulation mit intakten Allergenextrakten und Allergoiden**

DC wurden an Tag 6 ausgereift und mit 4 bzw. 20 µg/ml intaktem Allergenextrakt oder den modifizierten Allergoiden gepulst. Nach 48 h wurden in den Überständen IL-6 und IL-12p40 bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte 10 unabhängiger Experimente für Bet und 9 unabhängiger Experimente für Phl.

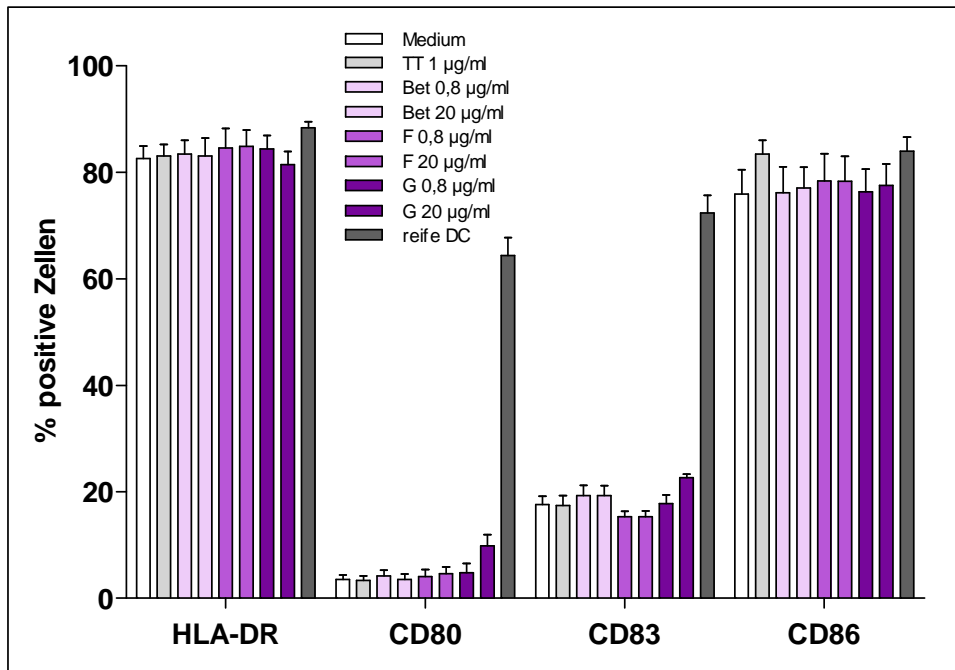
### 3.1.3 DC Oberflächenmarker

Um zu untersuchen ob das Beladen von DC mit Allergen und Allergoid einen Effekt auf die Ausreifung der Zellen hat, wurden die Oberflächenmoleküle HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 analysiert. Untersucht wurden unreife und reife DC. Nach Tag 6 in Kultur wurden die Zellen ausgereift oder im unreifen Zustand belassen und mit den intakten Allergenen und Allergoiden gepulst. Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet und nach Inkubation mit fluoreszenz-markierten Antikörpern die Oberflächenmarker mittels Durchfluss-zytometrie bestimmt.

Gab man Bet Allergenextrakt und Allergoid zu unreifen DC, so zeigten sich keine Unterschiede bei der Expression der DC-Marker. HLA-DR und CD86 waren gleichermaßen hochreguliert. CD80 und der DC Reifungsmarker CD83 waren in unreifen DC unter allen Bedingungen schwach exprimiert. Reife DC exprimierten aller vier Oberflächenmarker (bei HLA-DR und CD86 nicht prozentual, sondern nur im Mean) verstärkt.

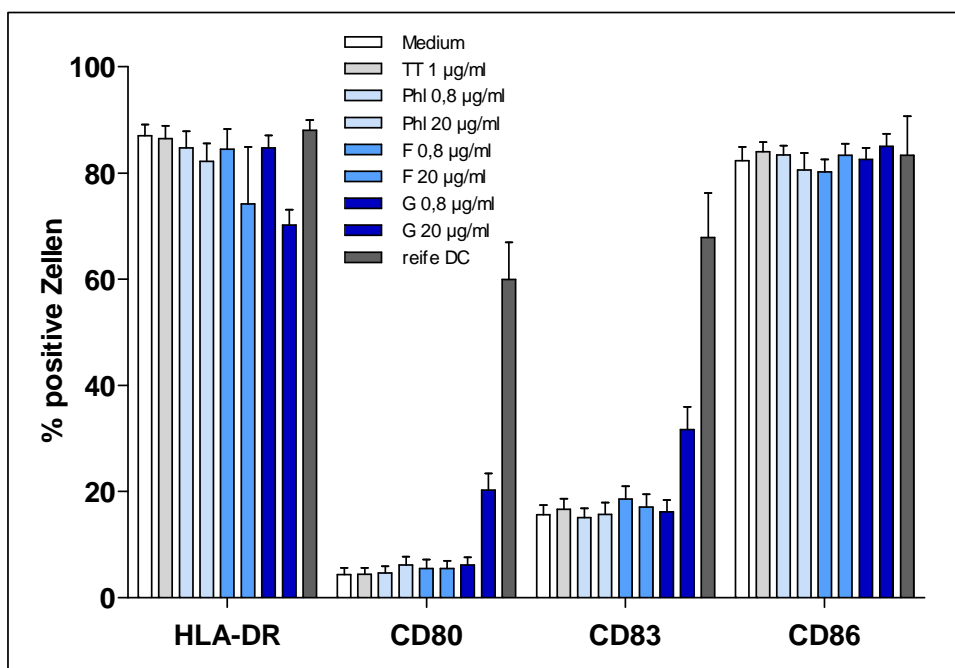
Bei der Zugabe des Gräserallergens Phl konnte man ähnliche Beobachtungen machen. Hier waren jedoch die CD80 und CD83 Expression leicht erhöht, wenn Glutaraldehyd-Allergoid in einer Konzentration von 20 µg/ml zu den DC gegeben wurde. Da die Allergene und Allergoide auf ihren Endotoxingehalt hin untersucht wurden und dieser sehr gering war, kann ein Einfluss von LPS ausgeschlossen werden.

Reife DC zeigten nach der Stimulation mit den intakten Allergenen und Allergoiden eine hohe Expression (> 90%) der Oberflächenmarker. Diese waren bereits auf unstimulierten Zellen hoch bzw. maximal exprimiert und konnte auch nach Zugabe von Allergen und Allergoid nicht gesteigert exprimiert werden (nicht gezeigt).



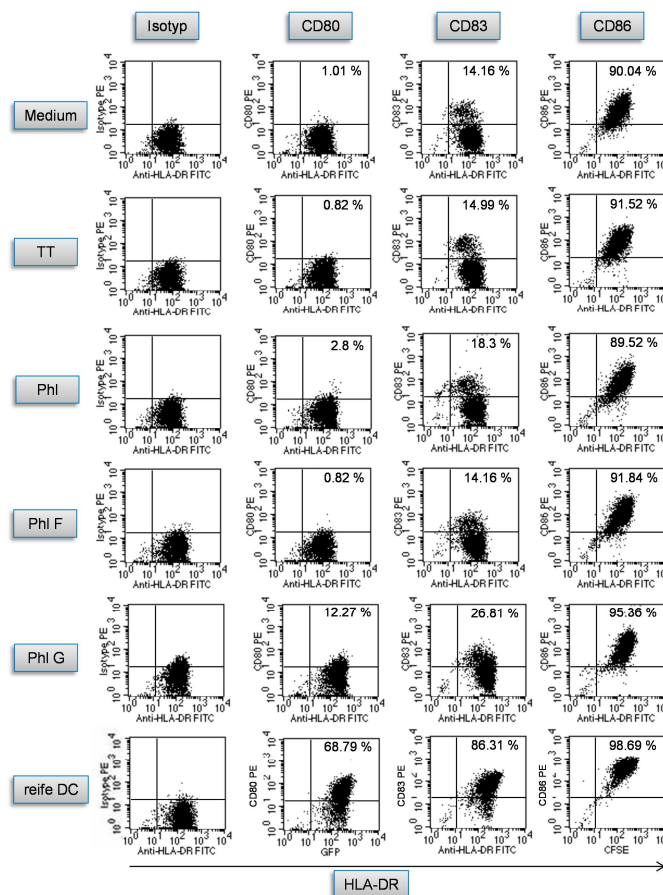
**Abbildung 11: Expression der Oberflächenmarker unreifer DC nach Stimulation mit Bet Allergenextrakt und Allergoiden**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit 0,8 oder 20 µg/ml Bet Allergen oder Allergoid gepulst und nach weiteren 48 h mit fluoreszenz-markierten Antikörpern die Expression von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie bestimmt. TT: Tetanustoxoid, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 7 unabhängiger Experimente.



**Abbildung 12: Expression der Oberflächenmarker unreifer DC nach Stimulation mit Phl Allergenextrakt und Allergoiden**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit Phl Allergen oder Allergoid gepulst und nach weiteren 48 h mit fluoreszenz-markierten Antikörpern die Expression von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie bestimmt. TT: Tetanustoxoid, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 8 unabhängiger Experimente.



**Abbildung 13: Expression der Oberflächenmarker nach Stimulation mit Phl Allergenextrakt und Allergoiden (Dotplot)**

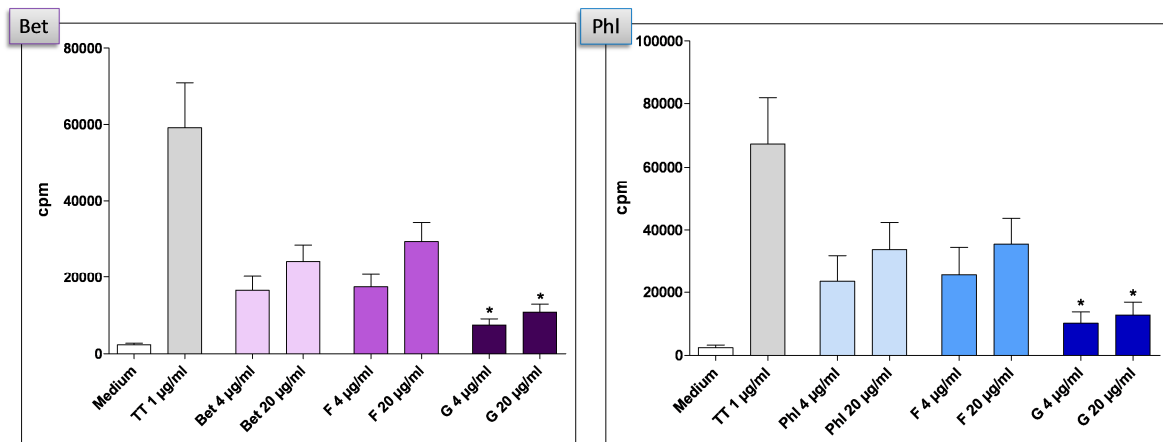
Anhand von einem Spender ist ein Beispiel für die Expression der DC-Oberflächenmarker HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gezeigt; die DC wurden mit 20 µg/ml Allergen bzw. Allergoid behandelt.

### 3.1.4 Glutaraldehyd-Allergoid behandelte DC induzieren eine verminderte Proliferation autologer CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Zu Analyse der Immunogenität der intakten Allergenextrakte und der zugehörigen modifizierten Allergoide wurde die T-Zellreaktivität CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert. DC allergischer Spender wurden ausgereift, mit 4 µg/ml bzw. 20 µg/ml Allergen oder den entsprechenden Allergoiden gepulst und mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Die allergenspezifische Proliferation der T-Zellen wurde über den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen.

Für Bet und Phl Allergene bzw. Allergoide konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Dendritische Zellen, die mit den intakten Allergenen und den entsprechenden Allergoiden gepulst wurden, waren alle in der Lage autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. T-Zellen, welche mit intakten Allergenen oder Formaldehyd-Allergoiden gepulsten DC kokultiviert wurden, zeigten eine ähnlich hohe Proliferation. Die T-Zellreaktivität war abhängig von der Konzentration an zugegebenem Antigen. Wurden DC mit den entsprechenden Glutaraldehyd-Allergoiden behandelt, so war die Proliferation der

autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zum intakten Allergenextrakt und dem mit Formaldehyd modifizierten Allergoid signifikant verringert. Auch hier war die Proliferation konzentrationsabhängig.



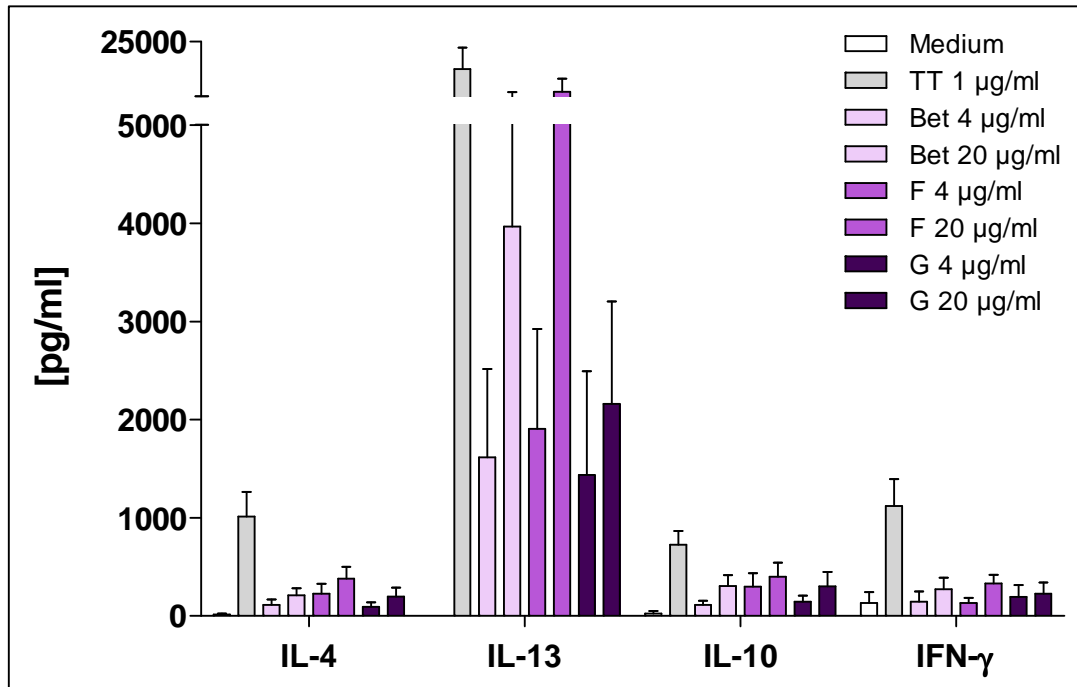
**Abbildung 14: Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit autologen Allergen- und Allergoid-gepulsten DC**

Allergen- und Allergoid-gepulste reife DC wurden mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Die Proliferation wurde über den Einbau von radioaktivem [<sup>3</sup>H]-Thymidin bestimmt; TT: Tetanustoxoid, Bet/Phl: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 16 unabhängiger Experimente für Bet und 21 Experimente für Phl; die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, \* $p \leq 0.05$  wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

### 3.1.5 Reduzierte Bildung von Th1/Th2 Zytokinen nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoid gepulsten DC

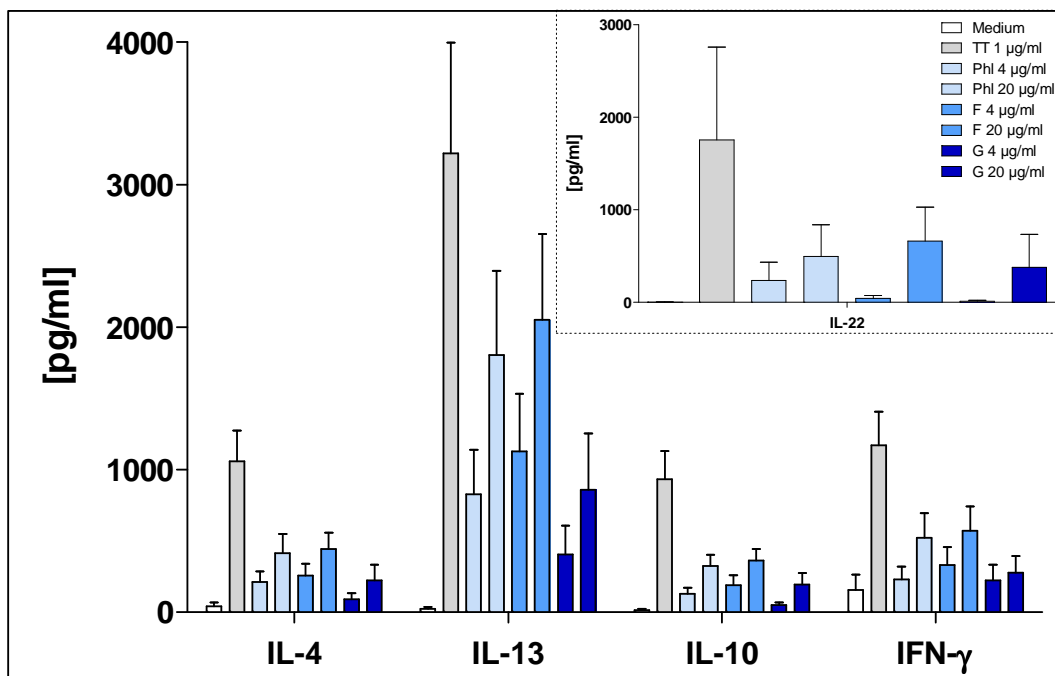
Neben einer Induzierung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde die Fähigkeit von Allergen und Allergoid gepulsten DC die Zytokinproduktion in CD4<sup>+</sup> Zellen anzuregen getestet. Hierzu wurden reife Allergen- bzw. Allergoid-gepulste DC mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und an Tag 7 mit neu generierten und gleichermaßen behandelten DC restimuliert, um messbare Mengen an Zytokin zu erhalten. Nach weiteren 24h wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Zytokinproduktion quantifiziert.

Im ELISA wurden für Phl und Bet Allergene und deren Allergoide, wie auch schon im Proliferations-Assay, ähnliche Ergebnisse erzielt. Unter allen Bedingungen produzierten T-Zellen vorwiegend IL-13. CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Glutaraldehyd-Allergoid gepulsten DC stimuliert wurden, zeigten hierbei eine verminderte IL-13 Produktion im Vergleich zu T-Zellen, die mit Allergen und Formaldehyd-Allergoid behandelten DC stimuliert wurden. Die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  wurden in geringerem Maße gebildet. Auch hier zeigten Glutaraldehyd-stimulierte Zellen eine verminderte Produktion der genannten Zytokine. Obwohl die reduzierte Zytokinproduktion nach Stimulation mit Glutaraldehyd modifizierten Allergoiden nicht signifikant war, spiegelte sie die Beobachtungen wieder, die bereits bei der T-Zell Proliferation gemacht werden konnten.



**Abbildung 15: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet Allergen- bzw. Allergoid-gepulsten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 4 bzw. 20 μg/ml Allergen und Allergoid behandelten DC kokultiviert und an Tag 7 mit frischen DC für 24 h restimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA bestimmt. TT: Tetanustoxoid, Bet: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind Mittelwerte 16 unabhängiger Experimente.



**Abbildung 16: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit PhI Allergen- bzw. Allergoid-gepulsten DC**

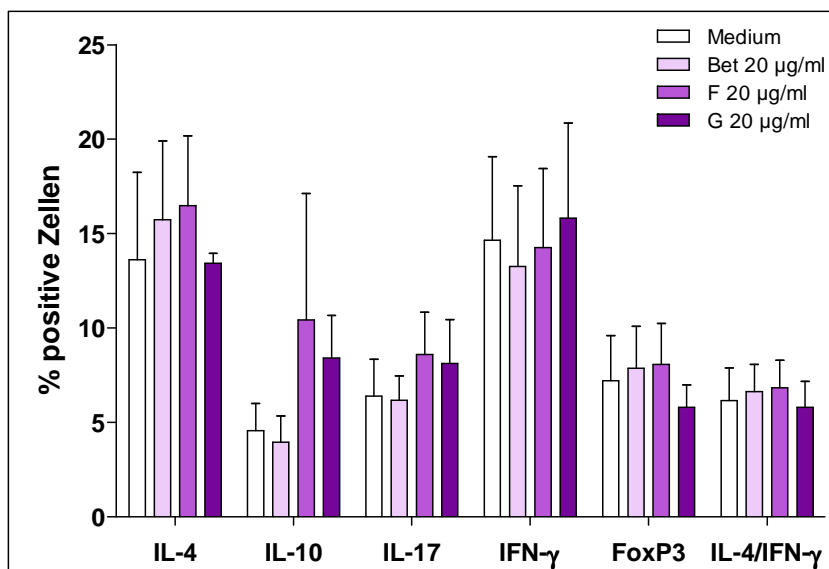
CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 4 bzw. 20 μg/ml Allergen und Allergoid behandelten DC co-kultiviert und an Tag 7 mit frischen DC für 24 h restimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA bestimmt. TT: Tetanustoxoid, PhI: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid. Gezeigt sind die Mittelwerte 21 unabhängiger Experimente; für IL-22 sind die Mittelwerte von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Bei der Stimulation mit Phl Allergen und Allergoiden wurden zusätzlich IL-17A und IL-22 analysiert. IL-17A wurde unter allen Bedingungen nur sehr gering bzw. gar nicht detektiert (nicht gezeigt). Bei der IL-22 Produktion gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Allergen- und Allergoid-stimulierten Zellen.

### 3.1.6 Produktion intrazellulärer Zytokine in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

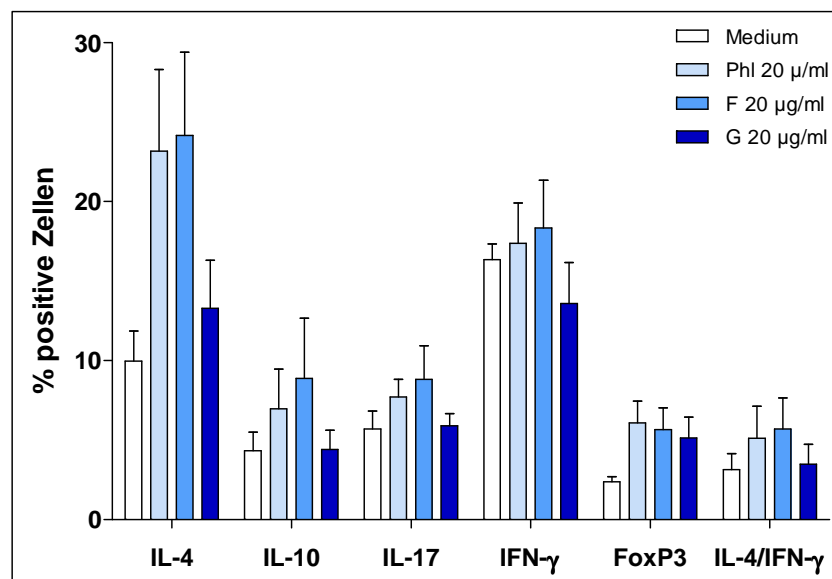
Neben der Produktion von Zytokinen, die ins Medium sezerniert wurden, wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Allergen- und Allergoid-gepulsten DC, wie unter 2.2.2.6 beschrieben, analysiert. Zwischen Bet Allergen und Allergoid stimulierten Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede. Unstimulierte DC führten bereits zu einer intrazellulären Zytokinproduktion, die sich nach Stimulation mit Allergen- oder Allergoid-gepulsten DC nicht signifikant verstärkte. Lediglich IL-10 und IL-17 waren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit Bet Allergoid gepulsten DC stimuliert wurden leicht, jedoch nicht signifikant erhöht.

Phl Allergen und Formaldehyd-Allergoid gepulste DC führten zu einer erhöhten Produktion der Zytokine IL-4, IL-10, IL-17 und IFN- $\gamma$ . Die Anzahl an FoxP3-positiven Zellen war hier unter allen Bedingungen ähnlich. Tendenziell war also passend zu den gemessenen Zytokinen im Zellkulturüberstand zumindest bei Phl die Anzahl Zytokinproduzierender Zellen ebenfalls niedriger, wenn CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Glutaraldehyd-Allergoid-gepulsten DC stimuliert wurden.



**Abbildung 17: Intrazelluläre Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet Allergen- und Allergoid-gepulsten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 20 µg/ml Allergen und Allergoid gepulsten reifen DC stimuliert und nach 7 Tagen mit frischen gleich behandelten DC restimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurden die intrazellulär befindlichen Zytokine nach zusätzlicher Stimulation mit PMA/Ionomycin/GolgiStop<sup>TM</sup> für 5h analysiert. Bet: intaktes Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 4 unabhängiger Experimente.



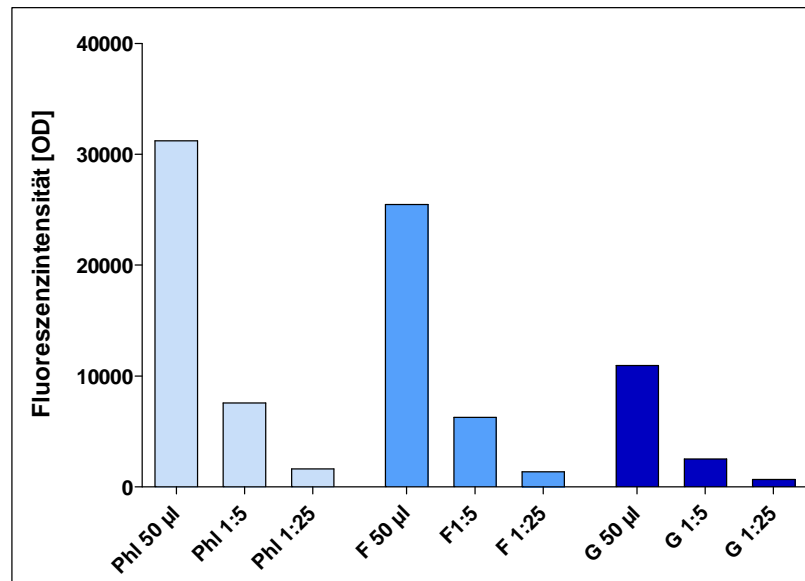
**Abbildung 18: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit PhI Allergen- und Allergoid-gepulsten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 20 µg/ml Allergen und Allergoid gepulsten DC stimuliert und nach 7 Tagen mit frischen gleich behandelten DC restimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurden die intrazellulär befindlichen Zytokine nach zusätzlicher Stimulation mit PMA/Ionomycin/GolgiStop<sup>TM</sup> für 5h analysiert. PhI: intaktes Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 5 unabhängiger Experimente.

### 3.1.7 Aufnahme von fluoreszenz-markierten Allergenen und Allergoiden in DC

Um Unterschiede bei der Aufnahme von Allergenen und Allergoiden in dendritische Zellen zu untersuchen, wurden PhI Allergen und die jeweiligen Allergoide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Verwendet wurden Alexa Fluor 488<sup>®</sup> und der pH-sensitive Farbstoff pHrodo<sup>TM</sup> Red. Nach dem Markierungsvorgang wurden die Konzentrationen und die Fluoreszenz überprüft.

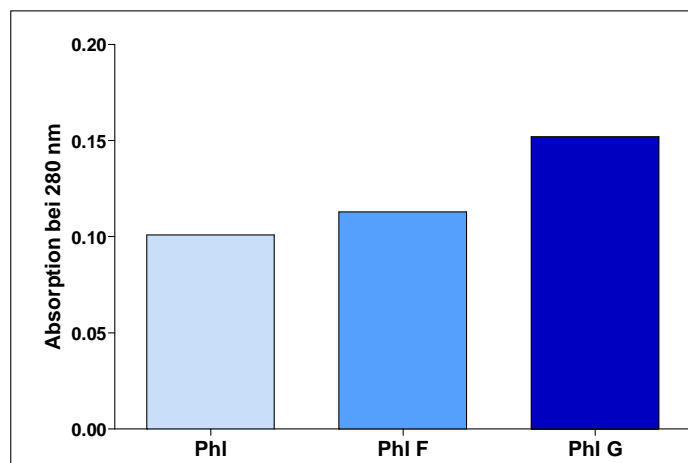
Zunächst wurden der PhI Allergenextrakt und die entsprechenden modifizierten Allergoide mit dem Alexa Fluor 488<sup>®</sup> Protein Labeling Kit markiert. Optisch sah man nach dem Markierungsvorgang bereits erhebliche Unterschiede in der Farbintensität zwischen Allergenextrakt, Formaldehyd-Allergoid und Glutaraldehyd-Allergoid. Letzteres wies dabei die schwächste Grünfärbung auf. Daraufhin wurde die genaue Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers nachgewiesen (Abbildung 19). Hierbei ließen sich die Unterschiede hinsichtlich der Markierungseffizienz bestätigen. Die Fluoreszenz des Glutaraldehyd-modifizierten Allergoids war um mehr als die Hälfte reduziert im Vergleich zum intakten Allergenextrakt und zum Formaldehyd-modifizierten Allergoid.



**Abbildung 19: Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor 488<sup>®</sup> markiertem Allergen und Allergoid**

Phi Allergen und die Allergoide wurden unverdünnt (50 µl) und verdünnt im Fluoreszenzphotometer gemessen; Phi: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid

Auf Grund der unterschiedlichen Markierungseffizienz wurde ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, pHrodo<sup>™</sup> Red, getestet. Dieser ist pH-sensitiv und soll lediglich im sauren Milieu fluoreszieren. Es wurde eine gleichmäßigere Markierungseffizienz erzielt als bei der Markierung mit Alexa Fluor 488<sup>®</sup> (Abbildung 20). Hier schien das Glutaraldehyd-modifizierte Allergoid stärker mit dem Farbstoff markiert zu sein. Da der Farbstoff mittels Fluoreszenzphotometrie nicht analysiert werden konnte, wurde hier die Farbintensität im ELISA-Reader bei 494 nm gemessen.



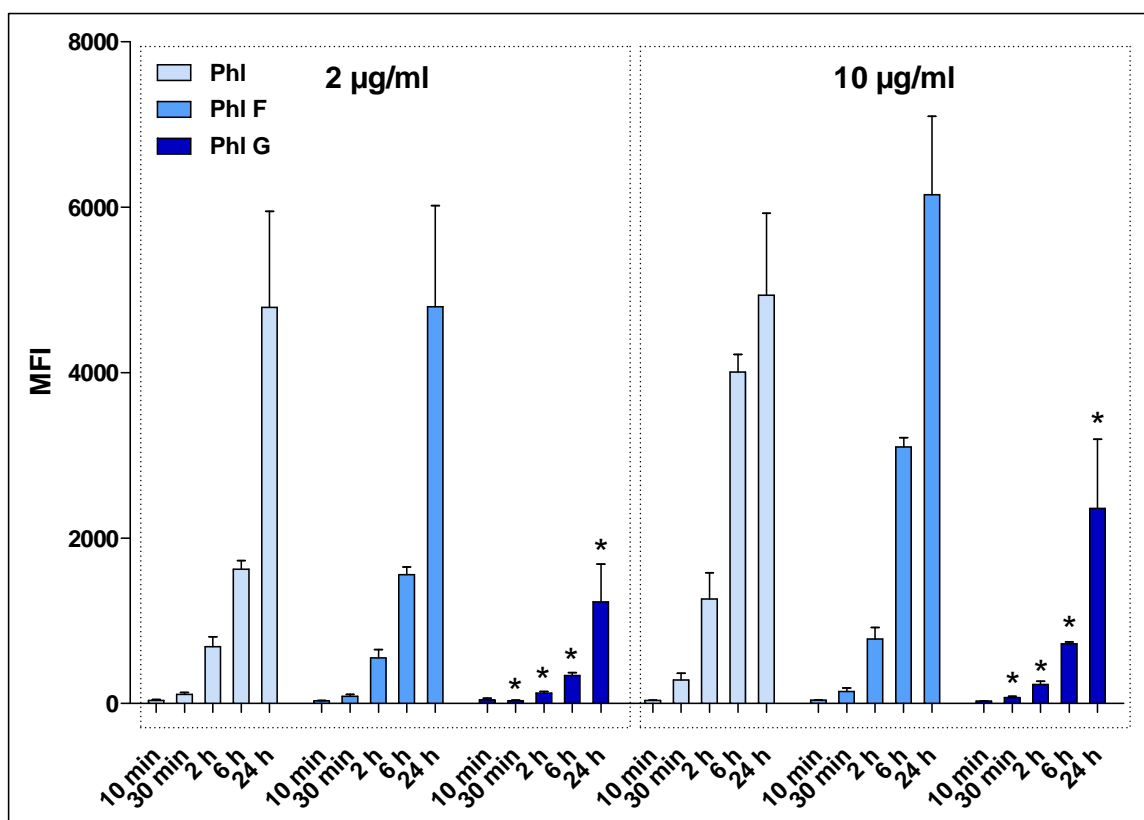
**Abbildung 20: Absorption von pHrodo<sup>™</sup> Red markiertem Allergen und Allergoid**

50 µl des Allergenextrakts und der modifizierten Allergoide wurden bei einer Wellenlänge von 494 nm am ELISA-Reader gemessen; Phi: intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoid, G: Glutaraldehyd-Allergoid



In den Experimenten wurden alle Fluoreszenz-markierten Allergene und Allergoide getestet.

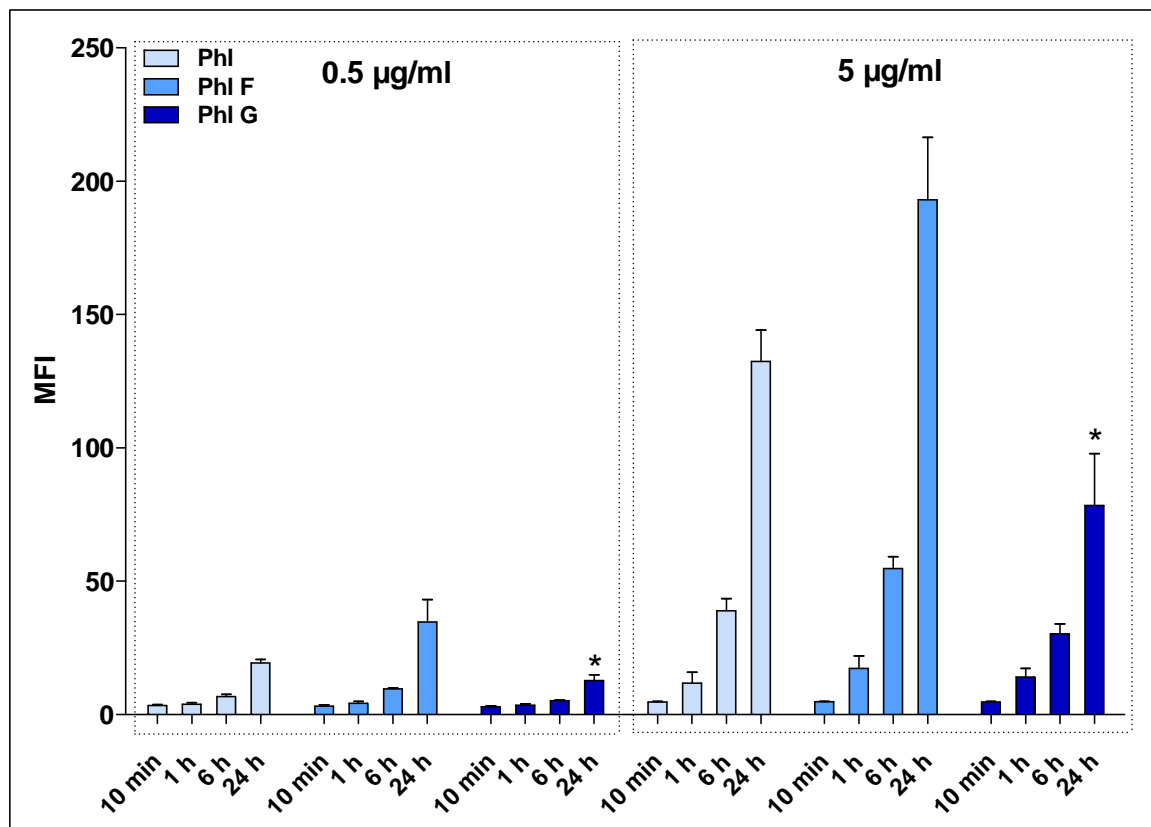
Zunächst wurde die Aufnahme der markierten Antigene mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden die Allergen und Allergoide in verschiedenen Konzentrationen an Tag 6 der Kultur zu unreifen DC geben und die Aufnahme in die Zellen nach 10 min, 30 min, 2h, 6h und 24h analysiert. Als Maß der Allergen- und Allergoidaufnahme in die Zellen wurde der MFI (Mean Fluorescence Intensity) herangezogen. Bereits nach 10 min wurden die markierten Allergene und Allergoide von unreifen DC aufgenommen und die Aufnahme stieg mit der Zeit und der Konzentration weiter an (Abbildung 21). Die Aufnahme zwischen intaktem Allergenextrakt und Formaldehyd-Allergoid unterschied sich nur gering. Im Vergleich dazu war die Aufnahme von Glutaraldehyd-Allergoid in unreife DC signifikant verringert. Der MFI war hier nach Zugabe von 2 µg/ml Allergen bzw. Allergoid fast viermal niedriger und bei der Zugabe von 10 µg/ml um ca. die Hälfte reduziert.



**Abbildung 21: Aufnahme von Alexa Fluor 488<sup>®</sup> markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC**

2 µg/ml und 10 µg/ml Fluoreszenz-markiertes Allergen und Allergoid wurden zu unreifen DC gegeben und die Aufnahme mittels Durchflusszytometrie gemessen. PhI: intakter Allergenextrakt, PhI F: Formaldehyd-Allergoid, PhI G: Glutaraldehyd-Allergoid, MFI: Mean fluorescence intensity; gezeigt sind die Mittelwerte 4 unabhängiger Experimente, die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, dabei wird \*= $p \leq 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

Da man nicht eindeutig ausschließen konnte, dass die beobachteten Unterschiede durch die geringere Fluoreszenzmarkierung des Glutaraldehyd-Allergoids zustande gekommen waren, wurden auch die Allergene und Allergoide, welche mit pHrodo™ Red markiert wurden, analysiert. Hier war die Markierungseffizienz für alle Antigene annähernd ähnlich (Abbildung 20). Zudem sollte nur Antigen, das in die Lysosomen internalisiert wurde, fluoreszieren und es ließen sich somit Zellen differenzieren, die das Allergen und die Allergoide tatsächlich internalisiert haben, und Zellen, auf denen die Antigene nur auf der Oberfläche binden. Markiertes Allergen und Allergoid wurde in einer Konzentration von 0.5 und 5 µg/ml zu unreifen DC gegeben. Im Vergleich zu 0.5 µg/ml war der MFI nach Zugabe von 5 µg/ml Allergen und Allergoid erhöht (Abbildung 22). Eine signifikant verminderte Aufnahme des Glutaraldehyd-modifizierten Allergoids im Vergleich zum Allergenextrakt und zum Formaldehyd-modifizierten Allergoid wurde hier nach 24h ebenfalls beobachtet.

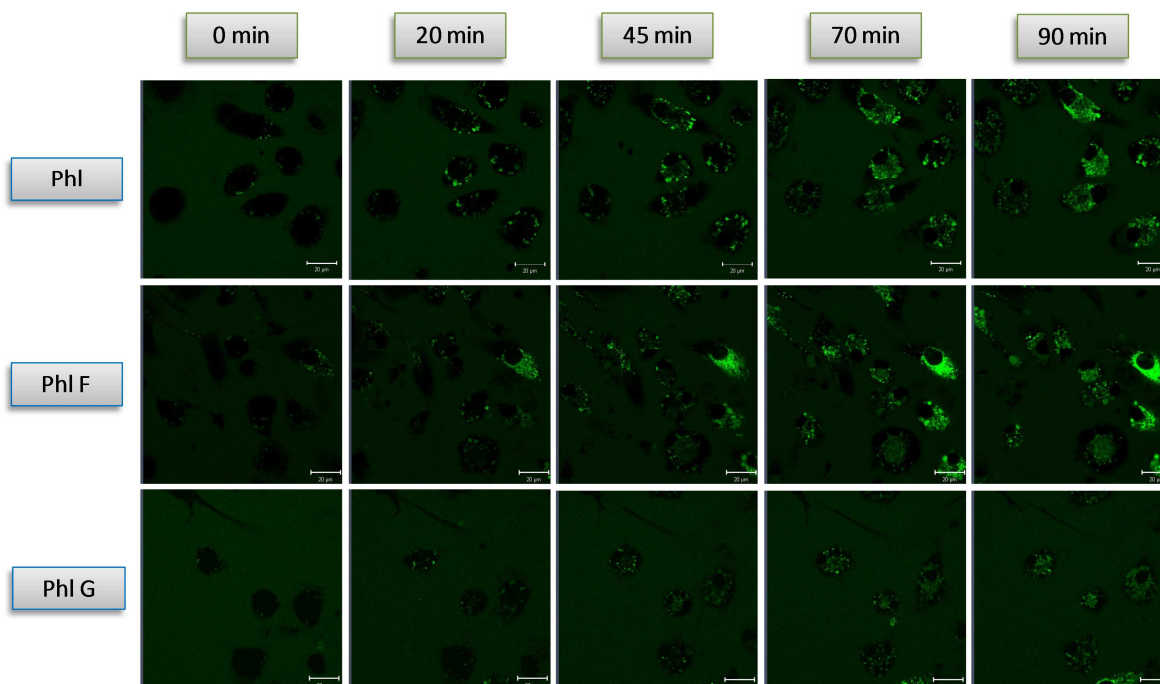


**Abbildung 22: Aufnahme von pHrodo™ Red markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC**

0.5 µg/ml und 5 µg/ml der markierten Allergen und Allergoide wurden zu unreifen DC gegeben und die Aufnahme nach vier verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie untersucht, PhI: intakter Allergenextrakt, PhI F: Formaldehyd-Allergoid, PhI G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind Mittelwerte 4 unabhängiger Experimente; die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, dabei wird \*= $p \leq 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

Um eindeutig auszuschließen, dass die fluoreszierenden Allergene und Allergoide nicht nur an der Oberfläche der DC haften, wurden lebende Zellen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (LSM) untersucht. Die Aufnahme der Alexa Fluor 488<sup>®</sup> markierten Allergene und Allergoide wurde über einen Zeitraum von 90 min gefilmt. In den Experimenten wurden die Zellen zusätzlich mit LysoTracker Red DND-99 behandelt, um die Co-Lokalisation in den Lysosomen darzustellen (nicht gezeigt). pHrodo<sup>™</sup> Red markierte Allergene und Allergoide wurden zu unreifen DC gegeben und diese nach 6 h fotografiert.

In beiden Ansätzen konnten die Beobachtungen, welche mittels Durchflusszytometrie gemacht wurden, bestätigt werden. Allergenextrakt und das Formaldehyd-Allergoid wurden von den Zellen gut aufgenommen (Abbildung 23). Im Vergleich dazu war die Internalisierung des Glutaraldehyd-modifizierten Allergoid reduziert, was sich an einer schwächeren Grünfärbung der DC zeigte.

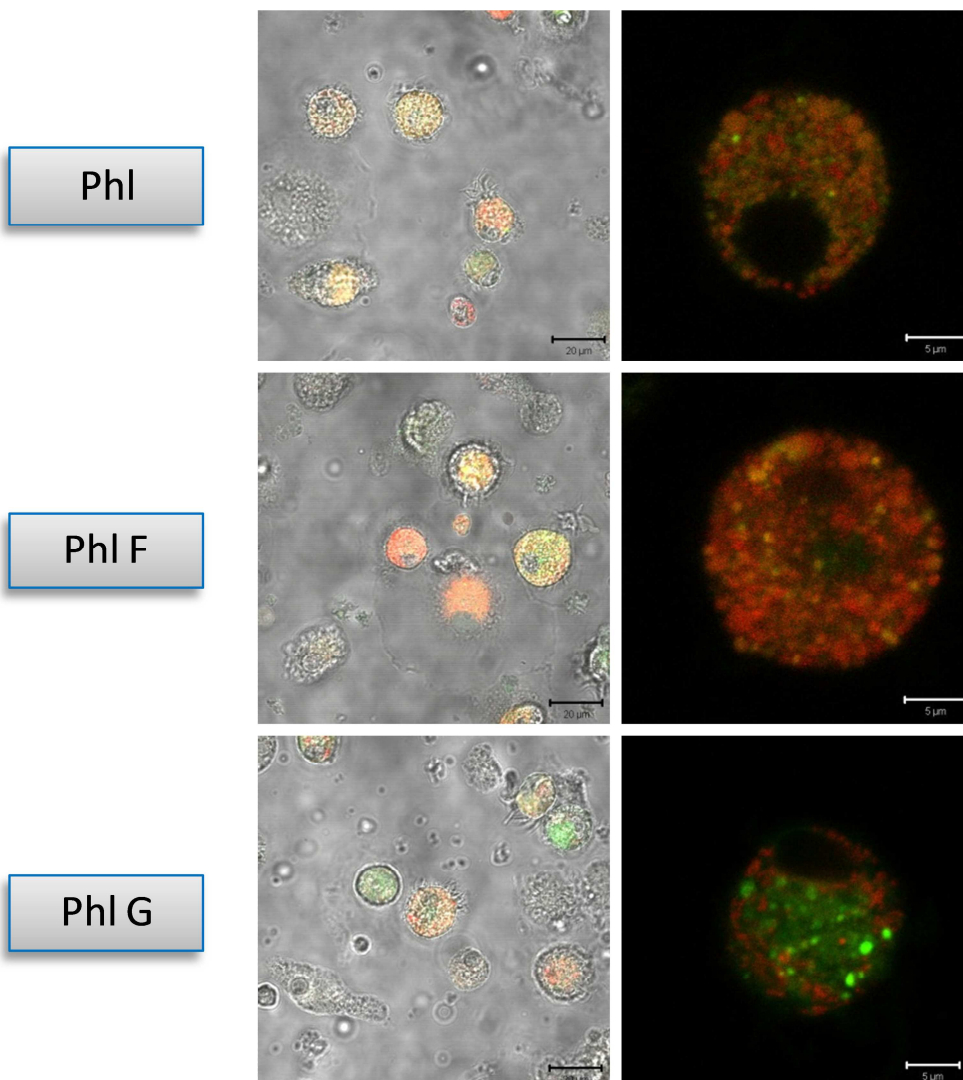


**Abbildung 23: Aufnahme von Alexa Fluor 488<sup>®</sup> markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC**

10 µg/ml Allergen und Allergoid wurden an Tag 6 zu unreifen DC gegeben und die Aufnahme mittels Laserscanning Mikroskopie für 90 min beobachtet. Dargestellt sind Sequenzen zu Zeitpunkten 0 min, 20 min, 45 min, 70 min und 90 min. Der Größenbalken entspricht 20 µm. PhI: intakter Allergenextrakt, PhI F: Formaldehyd-Allergoid, PhI G: Glutaraldehyd-Allergoid

Die zeitliche Verfolgung der Aufnahme war für die pHrodo<sup>™</sup> Red markierten Antigene zu zeitintensiv, da in diesem Fall die Fluoreszenz erst im sauren Milieu zu beobachten ist. Zur Analyse der pHrodo<sup>™</sup> Red markierten Allergene und Allergoide wurden diese an Tag 6 der Kultur zu den unreifen DC gegeben und für 6h inkubiert. Danach wurden mittels LSM mehrere Ebenen der dendritischen Zellen fotografiert. Um eine Co-Lokalisation der Allergene und Allergoide in den Lysosomen darzustellen, wurden die Zellen zusätzlich mit

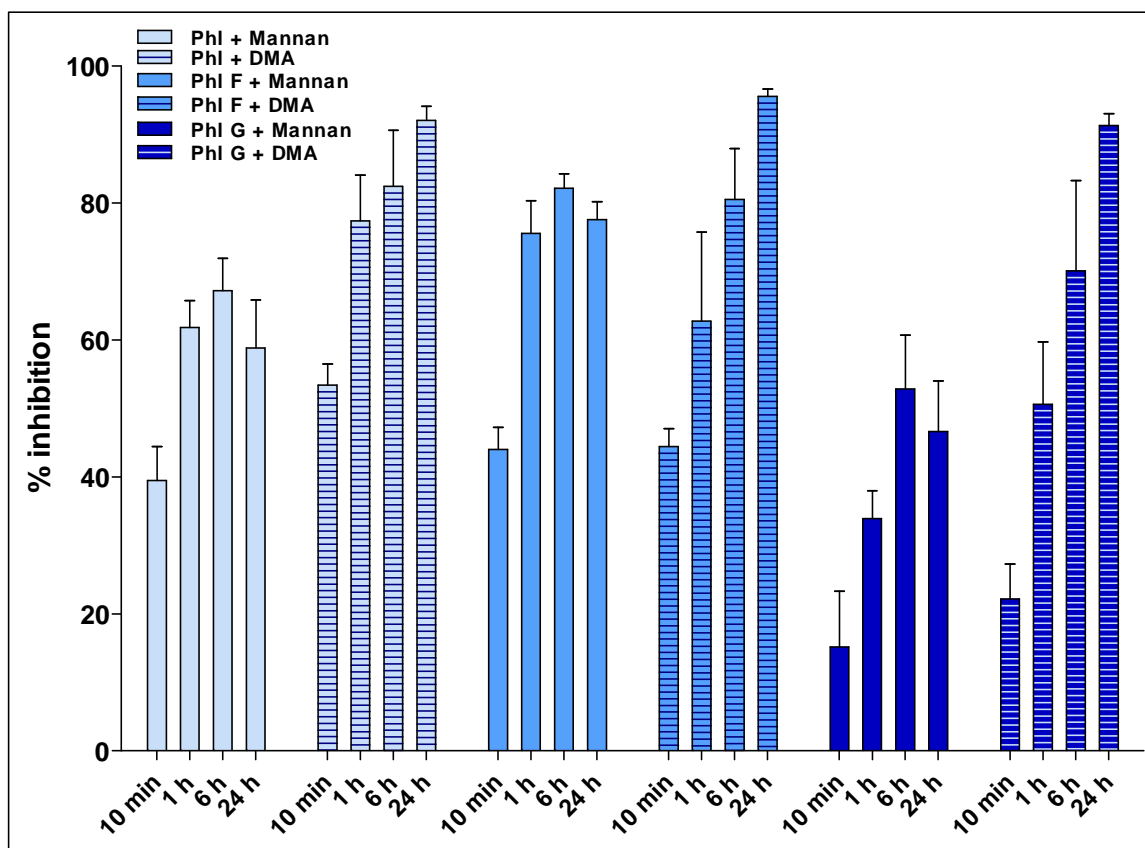
LysoTracker Green DND-26 angefärbt. Dieser Farbstoff färbt spezifisch Lysosomen an. Intaktes Allergenextrakt und das Formaldehyd-Allergoid wurden effektiver von unreifen DC aufgenommen und befanden sich bereits nach 6 h in den Lysosomen, erkennbar durch eine erhöhte Gelbfärbung der Zellen (Abbildung 24). Auch die Vergrößerung einzelner Zellen zeigte eine Orange- bzw. Gelbfärbung und somit eine Co-Lokalisation von Allergen bzw. Allergoid im Lysosom. Die Aufnahme des Glutaraldehyd-Allergoids war zu diesem Zeitpunkt noch nicht so weit vorangeschritten. In der Vergrößerung erkennt man, dass sich noch ein Großteil des Allergoids membranständig befindet und noch nicht in den Lysosomen auffindbar ist.



**Abbildung 24: Aufnahme von pHrodo™ Red markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC**

Unreife DC wurden mit 10 µg/ml Allergen und Allergoid beladen und für 6 h bei 37°C inkubiert. Bevor die Zellen unter dem LSM untersucht wurden erfolgte die Zugabe von 60 nM LysoTracker Green DND-26. Gezeigt sind links eine Übersichtsaufnahme der DC und rechts vergrößert ein Schnitt durch jeweils eine dendritische Zelle. Der linke Größenbalken entspricht 20 µm, der rechte Balken 5 µm. PhI: intakter Allergenextrakt, PhI F: Formaldehyd-Allergoid, PhI G: Glutaraldehyd-Allergoid

Um den Mechanismus der Aufnahme von Allergen und Allergoid näher zu untersuchen, wurden zwei Aufnahmewege dendritischer Zellen inhibiert. Um die Internalisierung über den Mannoserezeptor zu unterbinden, wurde Mannan zugegeben. Makropinozytose wurde durch die Zugabe von DMA blockiert. Beide Inhibitoren wurden 30 min vor Zugabe der Allergene und Allergoide zu unreifen DC gegeben. Durch die Blockierung der Makropinozytose wurde die Aufnahme fast komplett inhibiert (Abbildung 25). Nach Zugabe von Mannan kam es zu einer Reduzierung der Aufnahme um 50-75%.



**Abbildung 25: Blockierung der Allergen/Allergoid-Aufnahme in unreife DC durch Mannan und DMA**

30 min vor Stimulierung der DC mit 0.5 µg/ml Allergen und Allergoid wurden die Inhibitoren Mannan (200 µg/ml) und DMA (300 µM) zugegeben. Nach 10 min, 1 h, 6 h und 24 h wurde die Aufnahme in unreife DC mittels Durchflusszytometrie analysiert. Phi: intakter Allergenextrakt, Phi F: Formaldehyd-Allergoid, Phi G: Glutaraldehyd-Allergoid; gezeigt sind die Mittelwerte 4 unabhängiger Experimente.

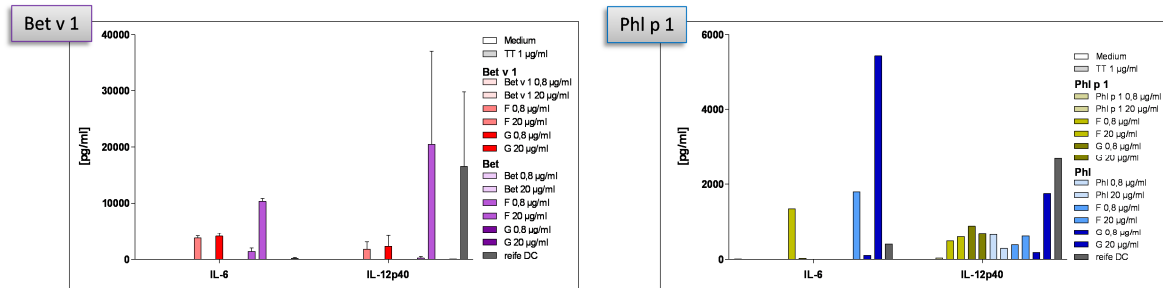
### **3.1.8 Analyse der Einzelallergene Bet v 1 und Phl p 1**

Neben den Allergengemischen wurden die Einzelallergene bzw. Hauptallergene Bet v 1 der Birke und Phl p 1 des Lieschgrases untersucht. Intakte Bet v 1 und Phl p 1 Allergenextrakte wurden ebenfalls mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd modifiziert (neue Charge an Allergenen und Allergoiden, ALK Abelló, Hørsholm, Dänemark). Verglichen wurden dabei die Einzelallergene und ihre modifizierten Allergoide mit den entsprechenden Allergengemischen und den entsprechenden Allergoiden.

### **3.1.9 Verstärkte Produktion von DC Zytokinen nach Stimulation mit Allergoiden**

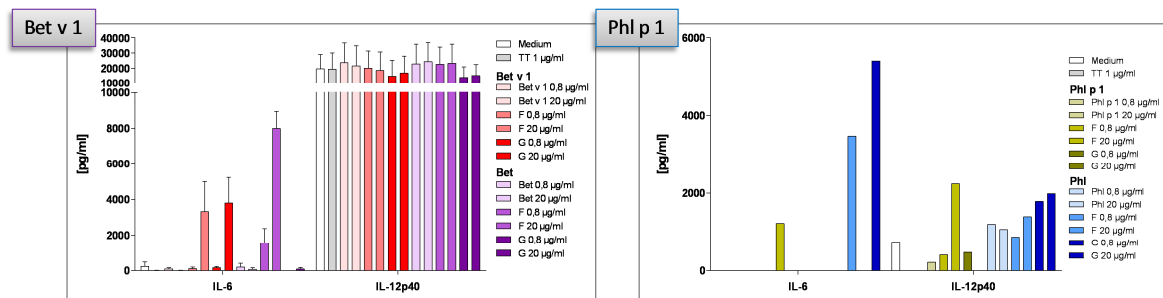
Reife und unreife DC allergischer Spender wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Einzelallergene und den entsprechenden Allergoiden behandelt und nach 2 Tagen die Zytokinproduktion im Überstand mittels ELISA gemessen (Abbildung 26 und Abbildung 27). Dabei zeigten unreife DC, die mit Bet v 1 Allergoiden stimuliert wurden eine erhöhte Produktion von IL-6 und IL-12p40. Das Formaldehyd-Allergoid des Bet Allergengemisches führte ebenfalls zu einer erhöhten Produktion dieser Zytokine. Phl p 1 und die entsprechenden Allergoide produzierten ähnlich hohe Mengen an IL-12p40 verglichen mit dem Phl Allergengemisch und den Allergoiden. Phl p 1 Formaldehyd Allergoid und die beiden Phl Allergoide führten zu einer erhöhten Produktion von IL-6. IL-1 $\beta$  war lediglich in der Positivkontrolle (reife DC) nachweisbar (nicht gezeigt).

Um reife DC zu generieren, erfolgte neben der Zugabe von Allergen und Allergoid die Ausreifung mit Hilfe eines Cocktails aus pro-inflammatorischen Zytokinen. Bei den reifen DC wurde wie in Abbildung 10 nur die Produktion von IL-6 und IL-12p40 gemessen (Abbildung 27). Eine erhöhte Produktion von IL-6 konnte auch hier wieder durch die Zugabe der Formaldehyd-Allergoide und durch Stimulation mit Bet v 1 und Phl Glutaraldehyd-Allergoid induziert werden. Die IL-12p40 Produktion war bereits in unstimulierten Zellen sehr hoch und konnte durch die Zugabe von Allergen und Allergoid nicht weiter gesteigert werden. Lediglich das Phl Formaldehyd-Allergoid führte in reifen DC zu einer verminderten Sezernierung des Zytokins in den Überstand.



**Abbildung 26: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Einzelallergenen**

Unreife DC wurden an Tag 6 für 48 h mit den Einzelallergenen bzw. den Allergengemischen und den jeweiligen Allergoiden stimuliert und die Zytokinproduktion mittels ELISA quantifiziert; gezeigt sind die Mittelwerte 2 unabhängiger Experimente für Bet v 1 bzw. 1 Experiment für Phl p 1.



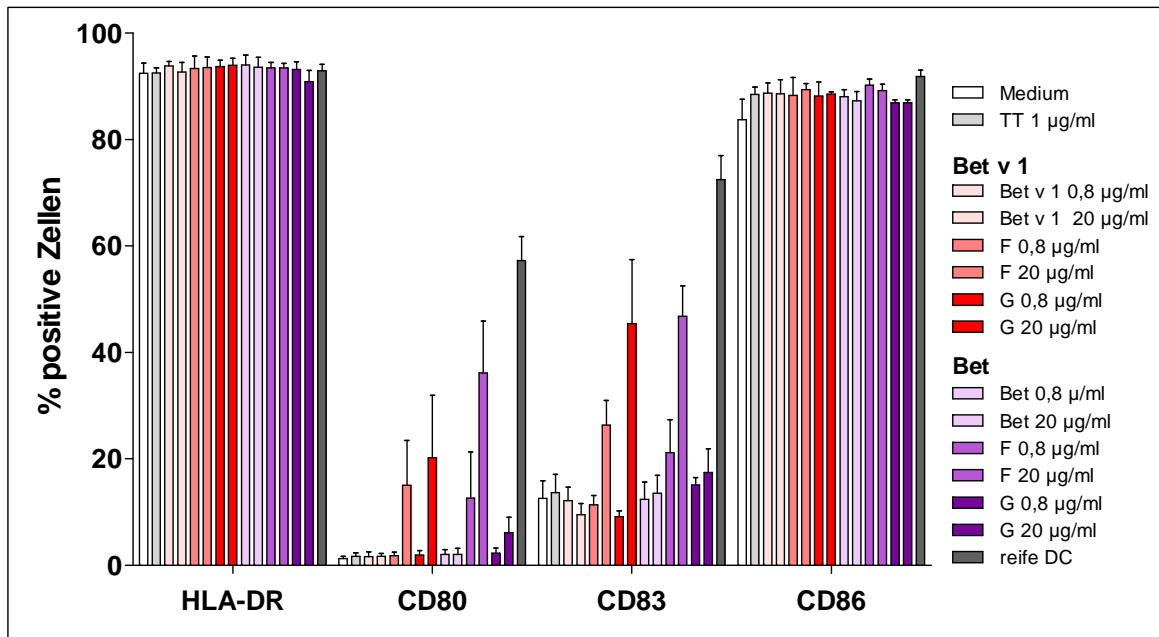
**Abbildung 27: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Einzelallergenen**

DC wurden an Tag 6 mit den Allergenen und Allergoiden stimuliert und gleichzeitig mit Hilfe von pro-inflammatorischen Zytokinen ausgereift; gezeigt sind die Mittelwerte 3 unabhängiger Experimente für Bet v 1 und 1 Experiment für Phl p 1.

### 3.1.10 Erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD83 auf unreifen DC nach Stimulation mit Allergoiden

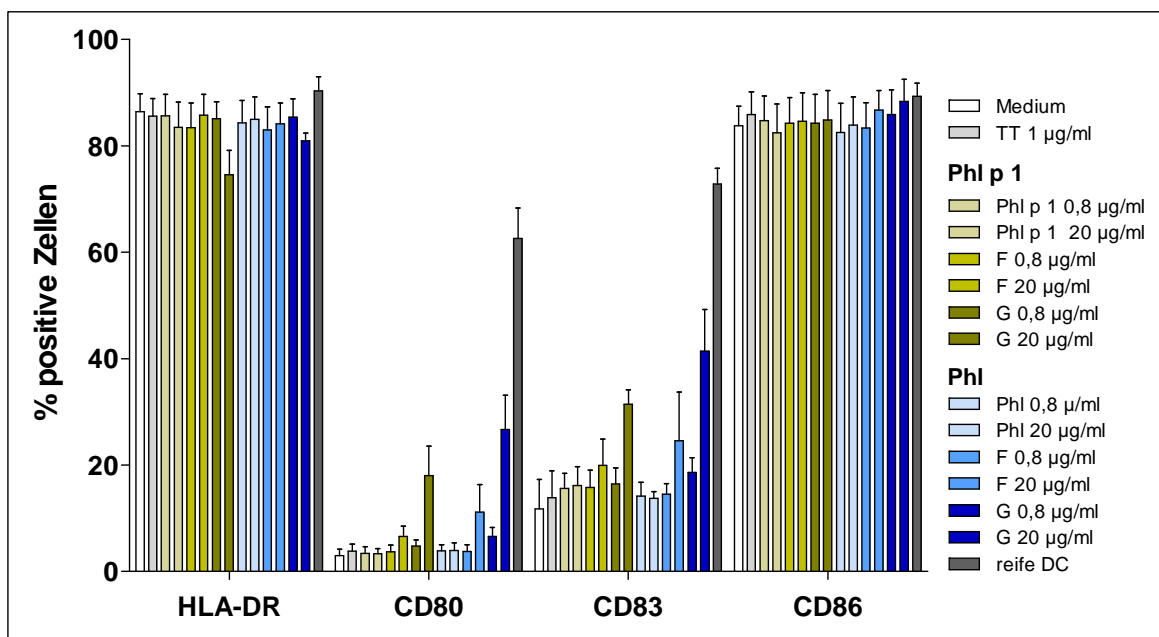
Neben der Zytokinproduktion durch DC allergischer Spender wurde die Expression von DC Oberflächenmarker nach Zugabe der Einzelallergene und ihrer Allergoide analysiert. HLA-DR und das co-stimulatorische Molekül CD86 wurden unter allen Bedingungen gleichermaßen hoch exprimiert. Die Bet v 1 Allergoide und das Bet Formaldehyd-Allergoid zeigten eine erhöhte Expression von CD80 und CD83 (Abbildung 28). Ebenfalls konnte man bei den Phl p 1 und Phl Glutaraldehyd-Allergoiden eine gesteigerte Expression dieser Marker beobachten (Abbildung 29). Neben diesen Auffälligkeiten bestehen bei der Bildung von DC Oberflächenmarkern keine Unterschiede zwischen Einzelallergenen und Allergengemischen.

Reife DC wurden ebenfalls analysiert. Hier zeigte sich in unstimulierten reifen DC bereits eine hohe Expression (> 90%) aller Marker, die nach Zugabe von Allergenen und Allergoiden nicht weiter anstieg (nicht gezeigt).



**Abbildung 28: Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen DC nach Stimulation mit Bet v 1 Allergenen und Allergoiden**

Unreife DC wurden mit 0,8 oder 20 µg/ml Allergenen bzw. Allergoid stimuliert und nach 48 h die Oberflächenmarker-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert; gezeigt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.



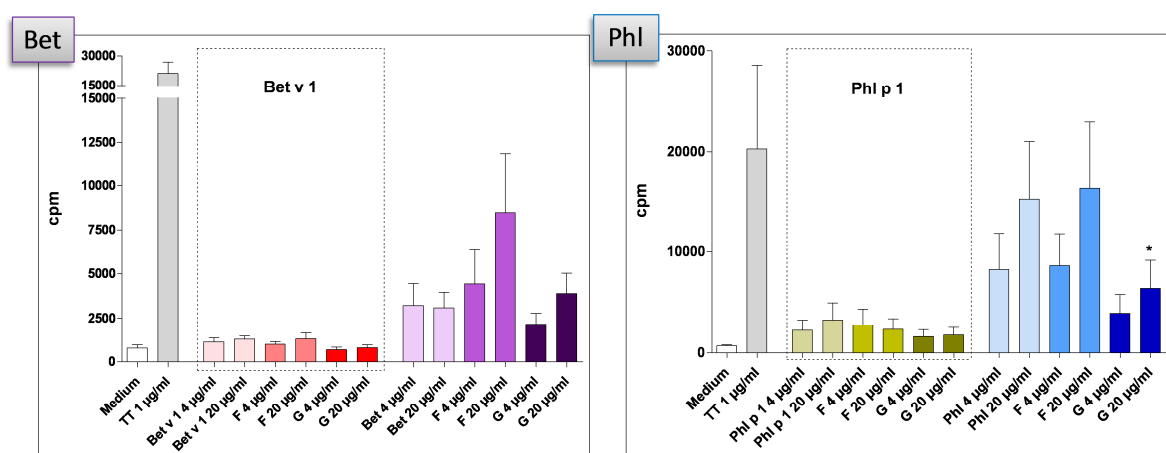
**Abbildung 29: Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen DC nach Stimulation mit Phl p 1 Allergenen und Allergoiden**

Unreife DC wurden mit 0,8 oder 20 µg/ml Allergenen bzw. Allergoid stimuliert und nach 48 h die Oberflächenmarker-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert; gezeigt sind die Mittelwerte von 4 unabhängigen Experimenten.



### 3.1.11 Bet v 1 und Phl p 1 Glutaraldehyd-Allergoide induzieren eine verminderte T-Zellproliferation verglichen mit den unbehandelten Einzelallergenen und den entsprechenden Formaldehyd-Allergoiden

Dendritische Zellen, die mit den Einzelallergenen bzw. den entsprechenden Allergoiden behandelt wurden, induzierten eine verminderte Proliferation in autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen mit DC, die mit Allergengemischen und den zugehörigen Allergoiden beladen wurden (Abbildung 30). Glutaraldehyd-modifiziertes Bet v 1 und Phl p 1 bewirkten ebenfalls eine reduzierte T-Zellproliferation im Vergleich zu den intakten Einzelallergenen und den Formaldehyd-Allergoiden. Bei den Allergengemischen zeigte nur Glutaraldehyd-modifiziertes Phl Allergoid eine signifikant verminderte T-Zellreaktivität. DC, die mit intaktem Bet Allergenextrakt und dem Glutaraldehyd-Allergoid stimuliert wurden, führten zu einer verminderten Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Formaldehyd-Allergoid behandelten DC.

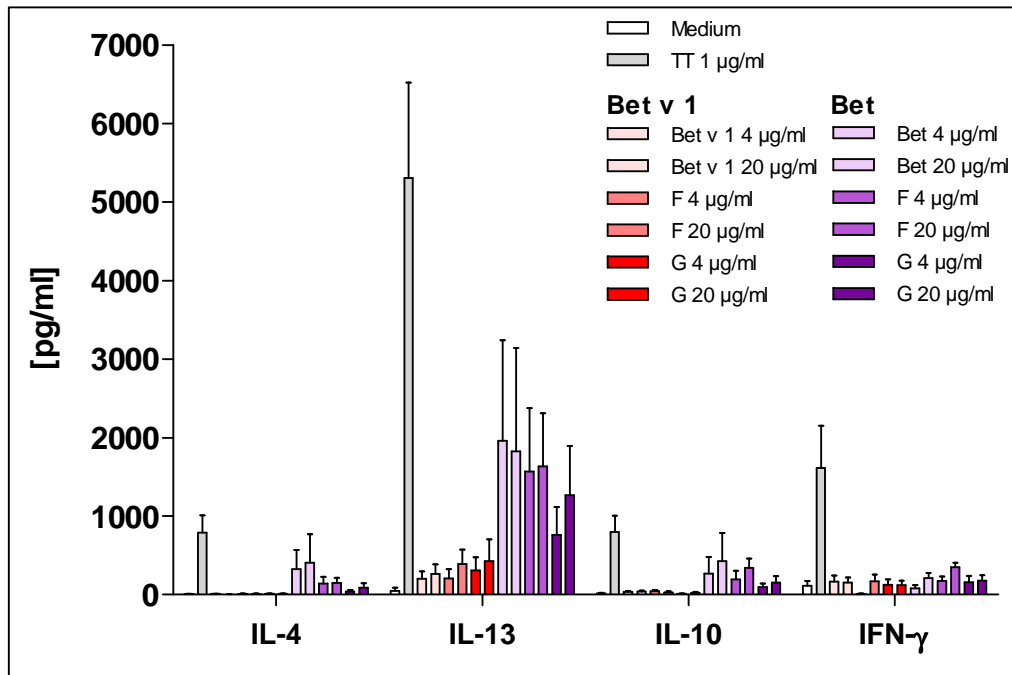


**Abbildung 30: Verminderte Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet v 1 und Phl p 1 Allergen- und Allergoid-gepulsten DC**

Reife Allergen- und Allergoid-gepulste DC wurden mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und die Proliferation über den Einbau von radioaktiven Thymidin gemessen; gezeigt sind die Mittelwerte 7 unabhängiger Experimente für Bet v 1 bzw. 9 für Phl p 1, die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, dabei wird \*= $p \leq 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

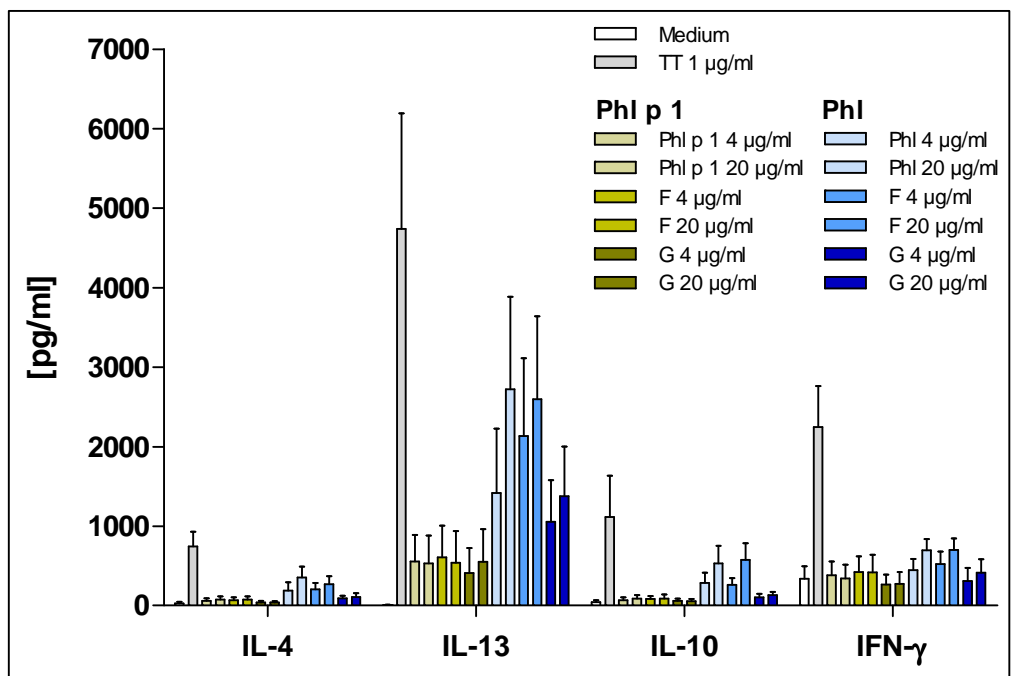
### 3.1.12 Vergleichbare Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet v 1 und Phl p 1 Allergen und Allergoid behandelten DC

Neben der allergen-spezifischen T-Zellproliferation war auch die Th1/Th2 Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit intaktem Bet v 1 oder Phl p 1 bzw. Allergoid gepulsten DC stark reduziert im Vergleich zu den Allergengemischen (Abbildung 31 und Abbildung 32). Intakter Allergenextrakt und die entsprechenden Allergoide der Einzelallergene zeigten hierbei keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion. Bei den Bet und Phl Allergengemischen war die Zytokinproduktion durch die Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoid gepulsten DC, wie bereits in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt, vermindert.



**Abbildung 31: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet v 1 Allergen- und Allergoid-gepulsten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 4 bzw. 20 µg/ml Allergen und Allergoid behandelten DC kokultiviert und an Tag 7 mit frischen DC für 24h restimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA bestimmt; dargestellt sind die Mittelwerte 7 unabhängiger Experimente.



**Abbildung 32: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Phl p 1 Allergen- und Allergoid-gepulsten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit 4 bzw. 20 µg/ml Allergen und Allergoid behandelten DC kokultiviert und an Tag 7 mit frischen DC für 24h restimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA bestimmt; dargestellt sind die Mittelwerte 9 unabhängiger Experimente.

### **3.2 Analyse von an Aluminiumhydroxid adsorbierten Allergenen und Allergoiden**

Da in den meisten in der Medizin verwendeten Impfstoffen Aluminiumhydroxid als Wirkverstärker enthalten ist, wurden die Allergene und Allergoide mit Alum versetzt und deren Allergenität und Immunogenität verglichen. Für die folgenden Experimente wurden Lieschgraspollenallergen und Birkenpollenallergen und die entsprechenden Allergoide an Aluminiumhydroxid (1.14 mg/ml) adsorbiert. Die Konzentrationen wurden mit Coca-Puffer eingestellt (durchgeführt von ALK Abelló in Hørsholm, Dänemark). Als Vergleich wurden unadsorbierte Allergene und Allergoide eingesetzt. Zunächst wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Allergen bzw. Allergoid mit entsprechend unterschiedlichen Alum-Konzentrationen verwendet.

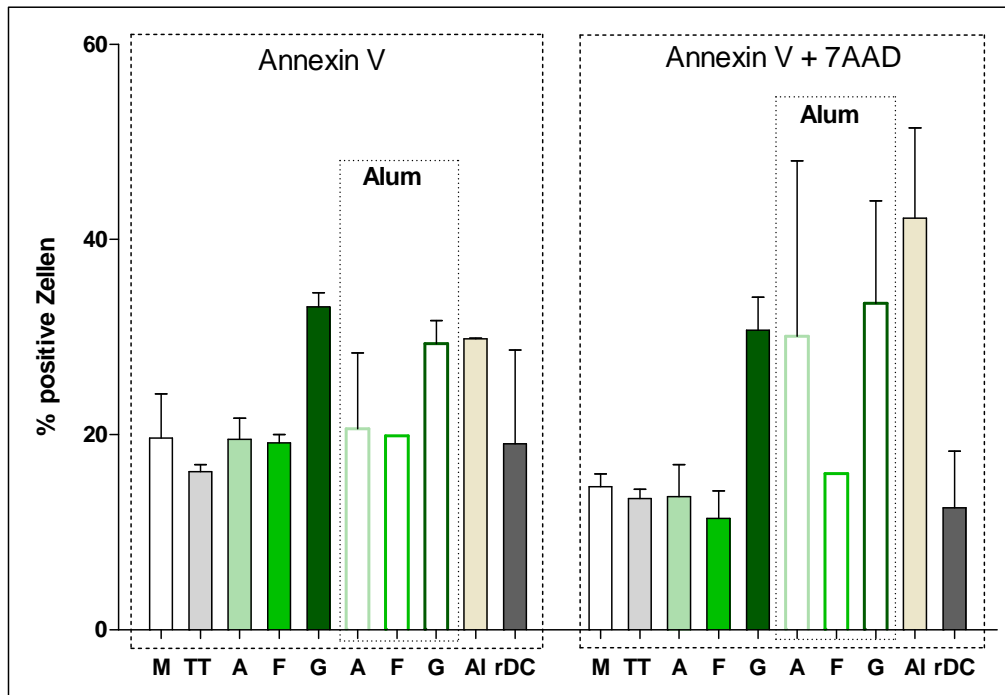
#### **3.2.1 Induktion von Apoptose durch Alum-adsorbierte Allergene/Allergoide**

Nach Zugabe von Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden zu unreifen DC an Tag 6 für 48 h sah man morphologisch, dass ein Großteil der Zellen tot war. Um nun apoptotische und nekrotische Zellen zu identifizieren und das Ausmaß der Toxizität der Allergene und Allergoide zu bestimmen, wurde ein Apoptose-Assay durchgeführt. Reife und unreife DC wurden 48 h nach Beladung mit Allergen oder Allergoid mit Annexin V und 7AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Bereits unbehandelte unreife DC beinhalteten 15-20% apoptotische und nekrotische Zellen (Abbildung 33). Nach der Zugabe von Glutaraldehyd-Allergoiden und Alum-adsorbierten Allergenextrakten sowie Formaldehyd-Allergoiden war die Anzahl an nekrotischen, Annexin V<sup>+</sup> und 7AAD<sup>+</sup> Zellen auf über 30% erhöht. Auch die Stimulation mit 200 µl Aluminiumhydroxid (Alhydrogel) alleine führte zu einem Anstieg von nekrotischen Zellen (42%). Die Anzahl an frühapoptotischen Zellen (Annexin V<sup>+</sup> und 7AAD<sup>-</sup>) war durch die Stimulation mit allen Glutaraldehyd-Allergoiden (30-33%) und durch die Zugabe von Alum alleine (30%) leicht erhöht.

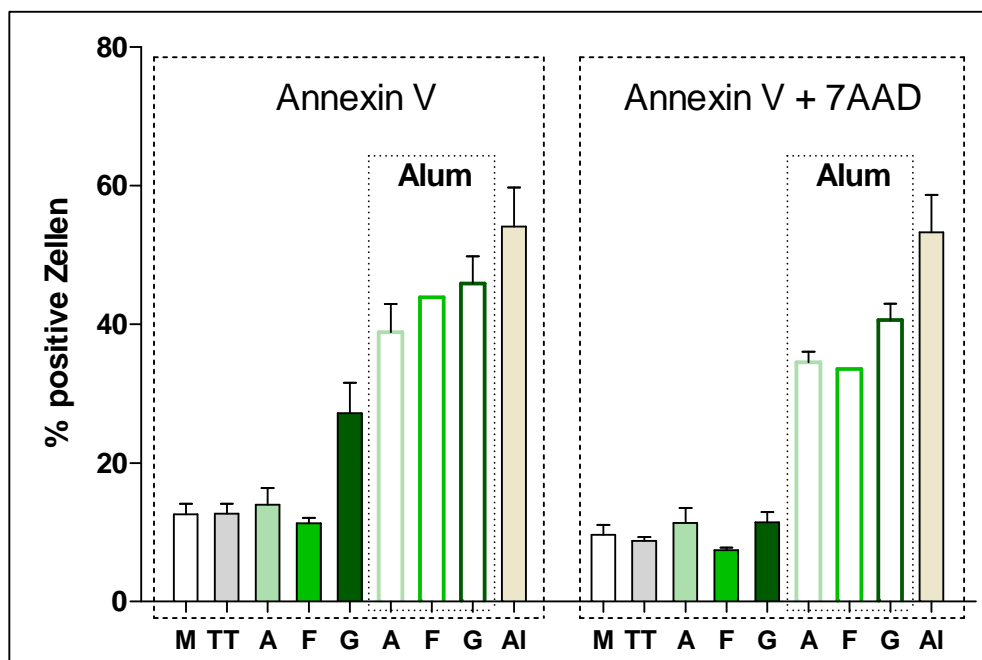
Bei den reifen DC befanden sich über 40% der Zellen in der frühen Apoptose wenn sie mit Alum-adsorbiertem Allergenextrakt oder den entsprechenden Allergoiden inkubiert wurden (Abbildung 34). Auch 27% der DC, welche mit unadsorbierten Glutaraldehyd-Allergoiden gepulst wurden sind frühapoptotisch. Zwischen 30-40% der Alum gepulsten DC sind nekrotisch bzw. befinden sich in einem späten Apoptosestadium. Die Zugabe von Aluminiumhydroxid alleine führt bei über 50% der Zellen zur frühen Apoptose bzw. Nekrose. Im Vergleich dazu waren unstimulierte Zellen nur zu 10-12% apoptotisch oder nekrotisch.

In den weiteren Versuchen wurden die lebenden DC mittels Trypanblau-Färbung gezählt, um die benötigten Zellzahlen für die Experimente anzupassen.



**Abbildung 33: Apoptose unreifer DC nach Stimulation mit Aluminiumhydroxid**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit 20 µg/ml Allergen und Allergoid beladen und nach 2 Tagen mit Annexin V und 7AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Phl und Bet wurden in den Mittelwerten zusammengefasst dargestellt. M: Medium, TT: 1 µg/ml Tetanustoxoid, A: Bet/Phl intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoide, G: Glutaraldehyd-Allergoide, Al: 200 µl Alum, rDC: reife DC; gezeigt sind die Mittelwerte 2 unabhängiger Experimente.



**Abbildung 34: Apoptose reifer DC nach Stimulation mit Aluminiumhydroxid**

Reife DC wurden an Tag 6 mit 20 µg/ml Allergen und Allergoid beladen und nach 2 Tagen mit Annexin V und 7AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Phl und Bet wurden in den Mittelwerten zusammengefasst dargestellt. M: Medium, TT: 1 µg/ml Tetanustoxoid, A: Bet/Phl intakter Allergenextrakt, F: Formaldehyd-Allergoide, G: Glutaraldehyd-Allergoide, Al: 200 µl Alum; gezeigt sind die Mittelwerte 4 unabhängiger Experimente.

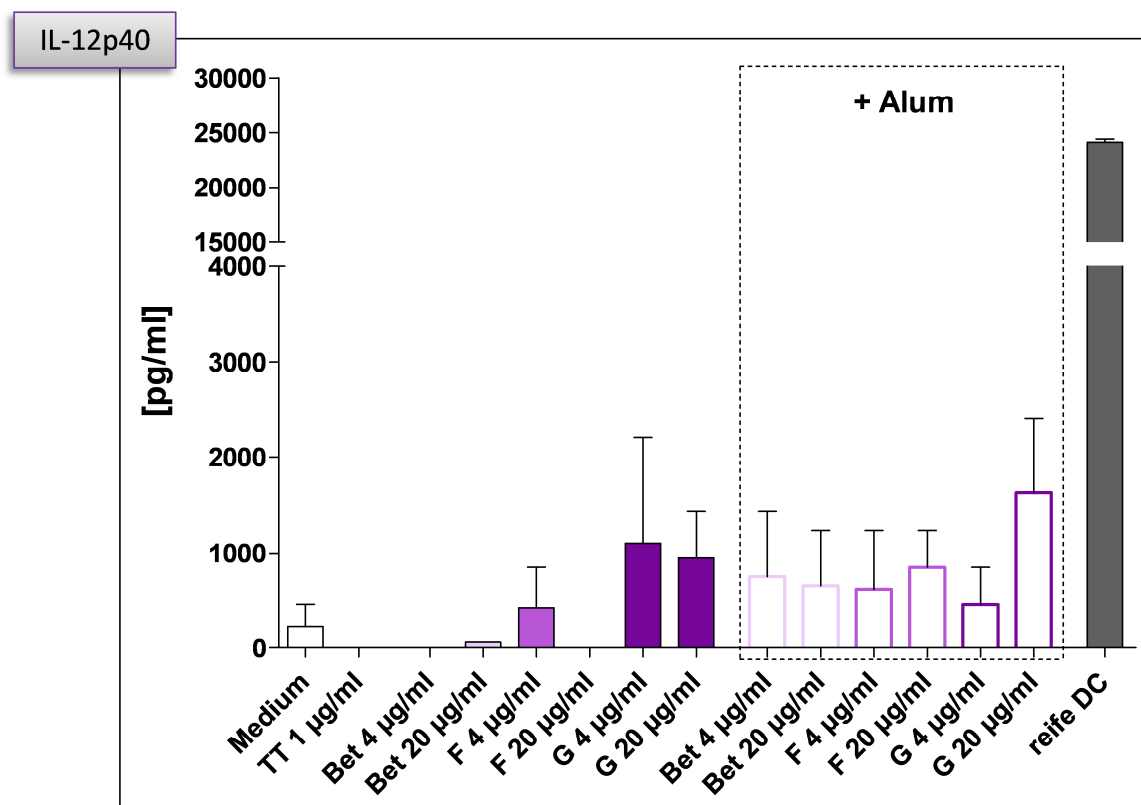
### 3.2.2 DC Zytokinproduktion nach Stimulation mit unadsorbierten und Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden

Um eine mögliche Veränderung der Zytokinproduktion unreifer und reifer DC nach Zugabe von Alum-adsorbiertem Allergen und Allergoid zu untersuchen, wurden unreife DC an Tag 6 mit adsorbiertem und unadsorbiertem Allergen oder Allergoid stimuliert und nach 48 h die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12p40 im Überstand mittels ELISA bestimmt.

IL-1 $\beta$  und IL-6 waren in den Kulturüberständen unreifer DC nicht nachweisbar.

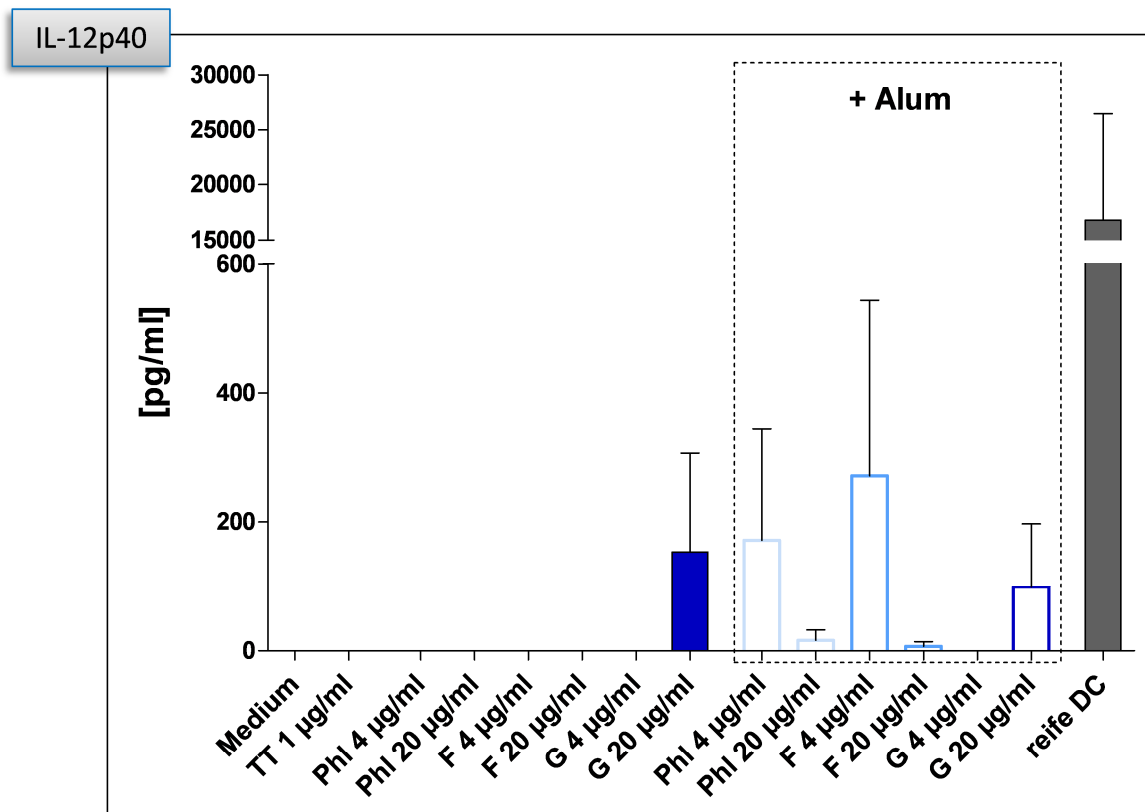
Die Zugabe von Alum-adsorbiertem Bet Allergen oder Allergoid führte lediglich zu einer leicht erhöhten IL-12p40 Produktion im Vergleich zu DC, die mit intaktem Allergenextrakt oder Formaldehyd-Allergoid stimuliert wurden (Abbildung 35). Zur Kontrolle wurden reife DC analysiert, welche große Mengen an IL-12p40 produzieren.

IL-12p40 wurde vermehrt nach Zugabe des Phi Glutaraldehyd-Allergoids (20  $\mu$ g/ml) und nach Zugabe der Alum-adsorbierten Allergene und Allergoide gebildet (Abbildung 36). In der Kontrolle, den reifen DC, konnte IL-12p40 in hohen Mengen nachgewiesen werden.



**Abbildung 35: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulierung mit Alum-adsorbierten Bet Allergenextrakt und Allergoiden**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit 4 bzw. 20  $\mu$ g/ml Alum-adsorbierten und unadsorbierten Allergenen oder Allergoiden beladen und die Zytokinproduktion mittels ELISA bestimmt; dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten.

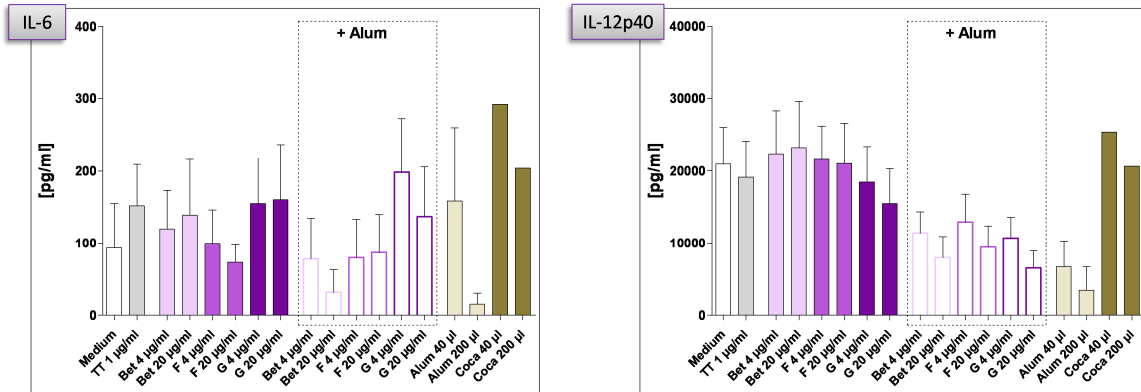


**Abbildung 36: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulierung mit Alum-adsorbierten Phl Allergenextrakt und Allergoid**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit 4 bzw. 20 µg/ml Alum-adsorbierten und unadsorbierten Allergenen oder Allergoiden beladen und die Zytokinproduktion mittels ELISA bestimmt; dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten.

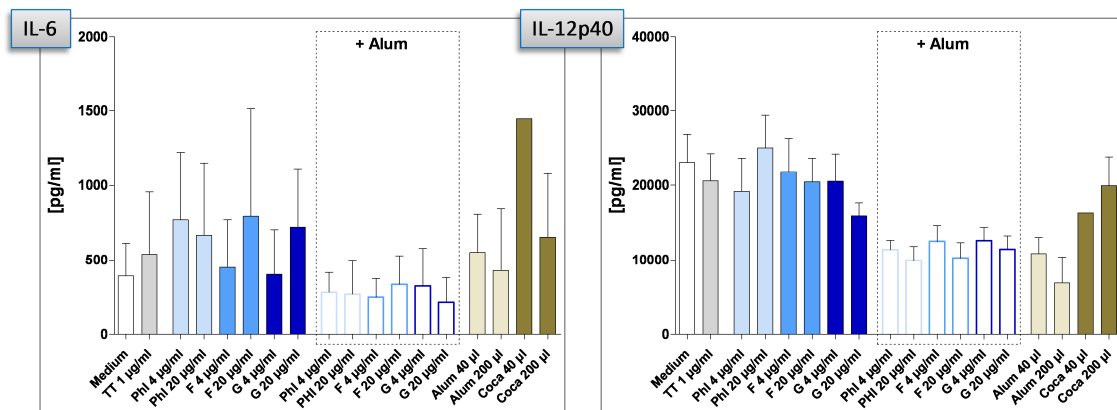
In reifen DC war die Produktion von IL-6 durch DC, welche mit den Bet Formaldehyd-Allergoiden stimuliert wurden, leicht vermindert (Abbildung 37). Eine reduzierte Freisetzung von IL-6 zeigten auch DC, welche mit Alum-adsorbiertem Bet Allergenextrakt und Alum alleine stimuliert wurden. IL-12p40 wurde in reifen DC bereits von unstimulierten Zellen in hohen Mengen gebildet. Unabhängig davon konnte man beobachten, dass die Freisetzung von IL-12p40 im Vergleich zu unadsorbierten Allergenen und Allergoiden durch die Zugabe von Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden sowie von Alum alleine leicht vermindert wurde.

Die IL-6 und IL-12p40 Produktion von reifen DC nach Zugabe von Alum-adsorbiertem Phl Allergen und Allergoid war im Vergleich zu unadsorbiertem Antigen ebenfalls leicht reduziert (Abbildung 38). Bei allen Experimenten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Allergenen und Allergoiden.



**Abbildung 37: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Bet Allergenextrakt und Allergoiden**

DC wurden an Tag 6 der Kultur ausgereift und gleichzeitig mit 2 µg/ml und 20 µg/ml Alum-adsorbierten oder unbehandelten Allergenen oder Allergoiden stimuliert. Die IL-6 und IL-12p40 Produktion wurde mittels ELISA bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte 7 unabhängiger Experimente.



**Abbildung 38: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Phl Allergenextrakt und Allergoiden**

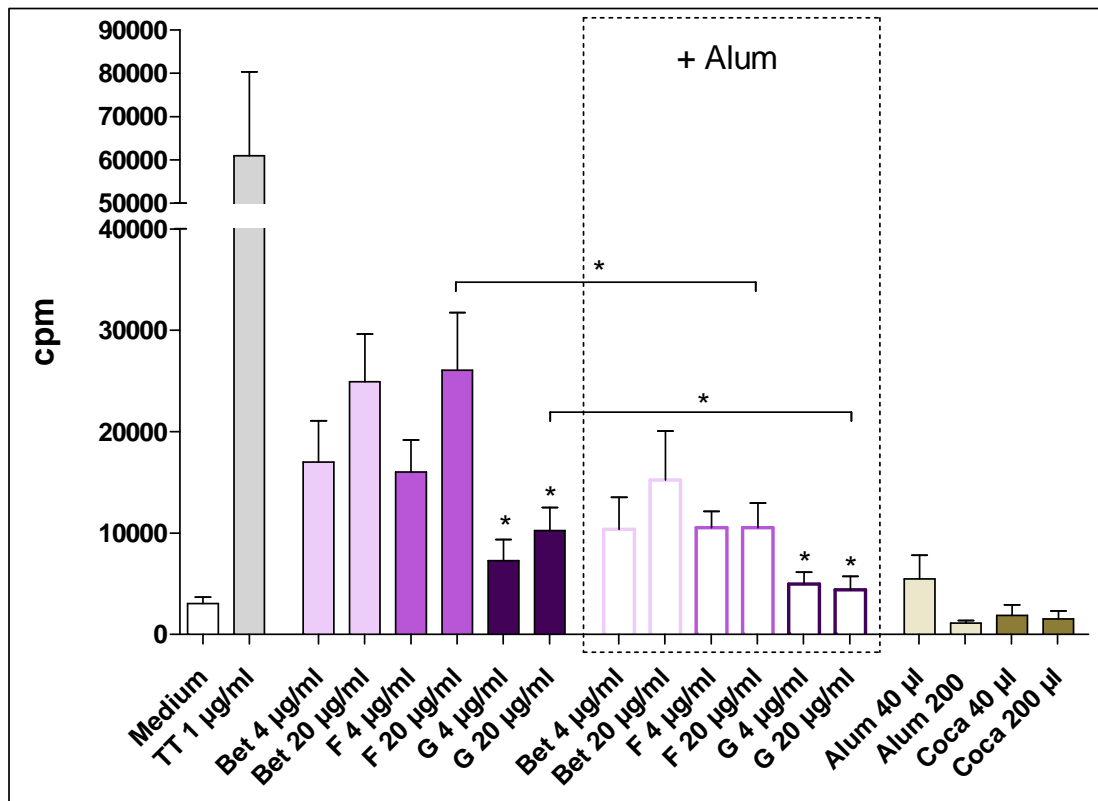
DC wurden an Tag 6 der Kultur ausgereift und gleichzeitig mit 2 µg/ml und 20 µg/ml Alum-adsorbierten oder unbehandelten Allergenen oder Allergoiden stimuliert. Die IL-6 und IL-12p40 Produktion wurde mittels ELISA bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte 4 unabhängiger Experimente.

### 3.2.3 Verminderte Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gelulsten DC

Um mögliche Effekte von Aluminiumhydroxid auf die T-Zellreaktivität zu untersuchen, wurden Allergen und Allergoid gepulste DC allergischer Spender mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und die Proliferation gemessen.

Die Zugabe von Alum-adsorbierten Bet Allergenen und Allergoiden zu DC führte im Folgenden zu einer verminderten Aktivierung der autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu DC, die Allergen und Allergoid ohne Alum erhalten hatten (Abbildung 39). Für die beiden Allergoide war diese verminderte Aktivierung signifikant. Analog zu den nicht-adsorbierten Bet Glutaraldehyd-Allergoiden führten auch Alum-adsorbierte Bet

Glutaraldehyd-Allergoide zu einer signifikant verminderten T-Zellreaktivität im Vergleich mit den entsprechenden intakten Allergenextrakten. Als Kontrolle wurden DC mit 40 µl und 200 µl Alum bzw. Coca-Puffer beladen. Die Stimulation mit 40 µl Alum führte zu einem geringen Anstieg der T-Zellproliferation im Vergleich zur Negativkontrolle (Medium). Die höhere Alumkonzentration und die Zugabe des Coca-Puffers hatten keinen Effekt auf die T-Zellreaktivität.

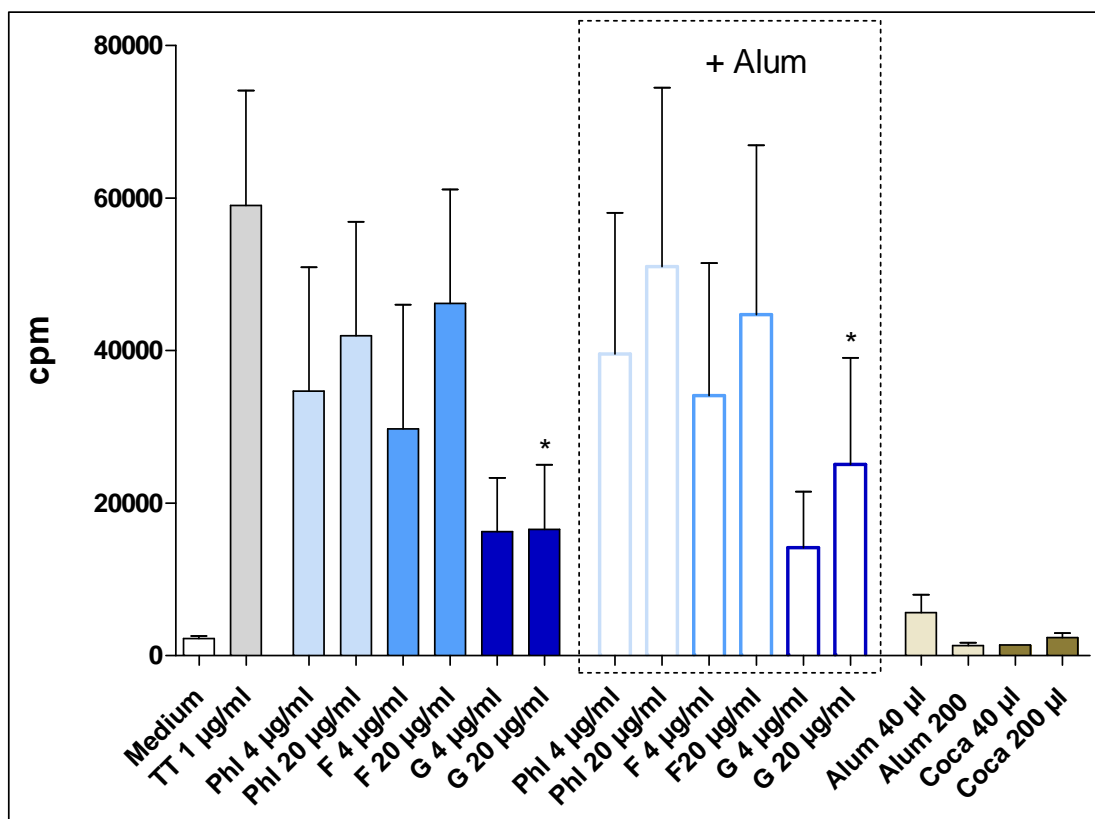


**Abbildung 39: Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Bet Allergen und Allergoid behandelten DC**

Reife DC wurden mit autologen T-Zellen kokultiviert und die T-Zellreaktivität anhand der Proliferation gemessen. Als Kontrollen dienten Alum und Coca-Puffer alleine; gezeigt sind die Mittelwerte 8 unabhängiger Experimente, die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, dabei wird  $*=p \leq 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

Bei dem Vergleich von PhI Allergen und Allergoid mit den entsprechenden Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden beobachtete man keine signifikanten Unterschiede in der T-Zellreaktivität (Abbildung 40). CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit unadsorbiertem Allergen und Allergoid gepulsten DC stimuliert wurden, zeigten eine ähnlich hohe Proliferation wie Zellen, die mit den entsprechenden Alum-adsorbierten Antigenen stimuliert wurden. Die Glutaraldehyd-Allergoide induzierten jeweils eine signifikant verminderte T-Zellreaktivität im Vergleich zu den intakten Allergenextrakten. Auch hier führt die Zugabe von 40 µl Alum zu einem leichten Anstieg der Proliferation im Vergleich zu Medium.





**Abbildung 40: Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Phl Allergen und Allergoid behandelten DC**

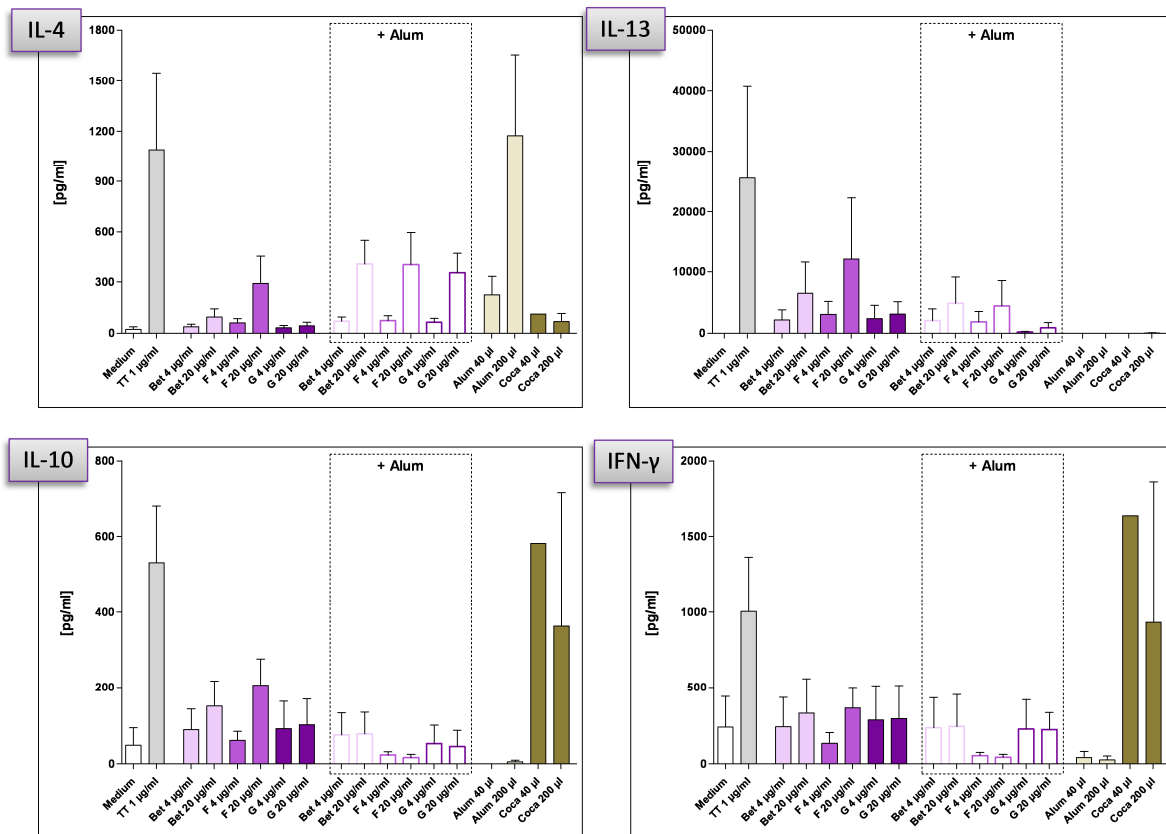
Reife DC wurden mit autologen T-Zellen kokultiviert und die T-Zellreaktivität anhand der Proliferation gemessen. Als Kontrollen dienten Alum und Coca-Puffer alleine; gezeigt sind die Mittelwerte 10 unabhängiger Experimente, die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, dabei wird  $*=p \leq 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

### 3.2.4 Verminderte Produktion von IL-13, IL-10 und IFN- $\gamma$ durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC

Die Fähigkeit von Allergen- und Allergoid-gepulsten DC, die Zytokinproduktion in autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren, wurde mittels ELISA überprüft. Es wurden Alum-adsorbierte mit unadsorbierten Allergenen und Allergoiden verglichen.

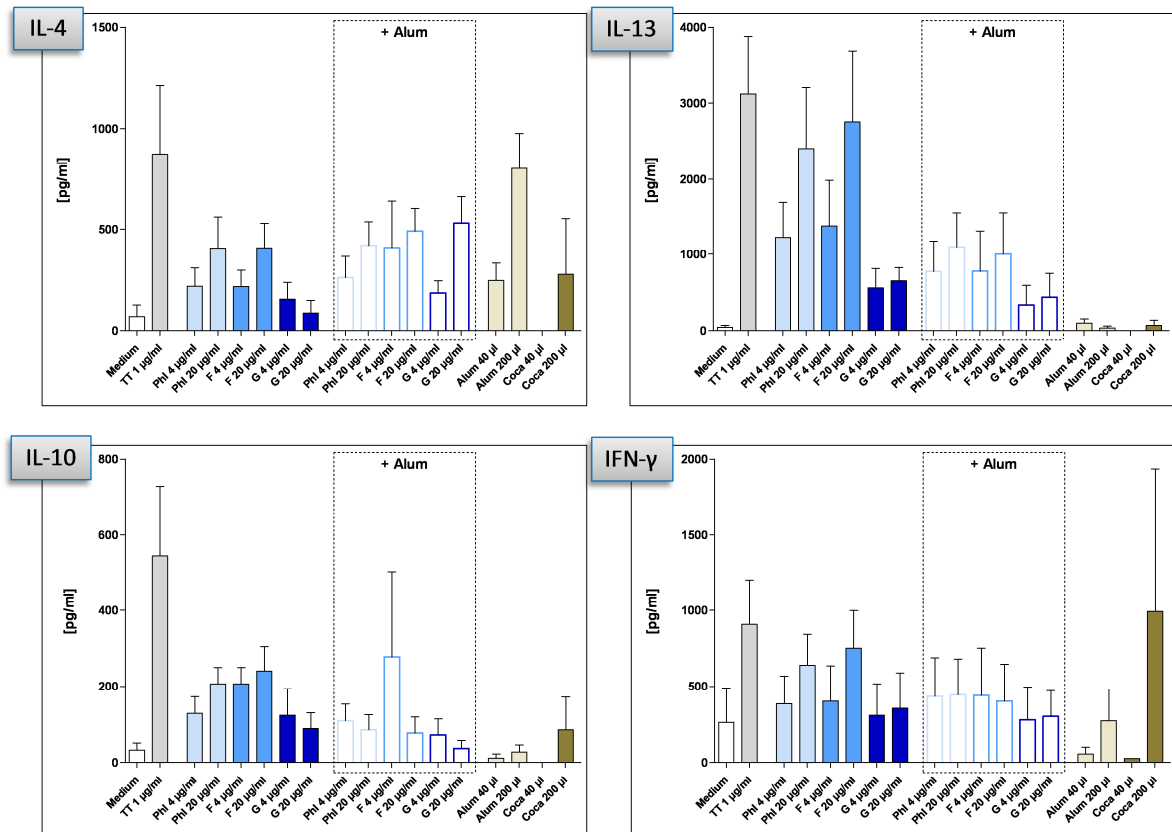
Die zusätzliche Zugabe von Aluminiumhydroxid mit dem Bet Allergenextrakt und den Allergoiden zu DC führte zu einer Zunahme der IL-4 Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 41). Auch die Stimulation mit Alum ohne Allergen bewirkte einen Anstieg von IL-4 im Überstand. IL-13 wurde nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC vermindert gebildet. Alum und der Coca-Puffer alleine stimulierten keine Zytokinproduktion. IL-10 und IFN- $\gamma$  wurden ebenfalls nach Behandlung mit Alum in geringerem Maße sezerniert. Verglichen mit Alum-adsorbierten Allergenextrakt und Glutaraldehyd-Allergoid war die Produktion dieser Zytokine nach Zugabe des Formaldehyd-Allergoid noch stärker reduziert.

Bei den Alum-adsorbierten PhI Allergenextrakt und Allergoiden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion im Vergleich zu den unadsorbierten Allergenen und Allergoiden (Abbildung 42). Die IL-4 Produktion war auch hier durch Alum erhöht. IL-13 wurde ebenfalls wie bei Bet durch Alum-adsorbiertes Allergen und die Allergoide in geringeren Mengen produziert. In allen Experimenten wurde wieder tendenziell eine geringere Zytokinproduktion bei den Glutaraldehyd-Allergoiden verglichen mit dem intakten Allergenextrakten und dem Formaldehyd-Allergoiden beobachtet, vor allem bei IL-13.



**Abbildung 41: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Bet Allergen und Allergoid behandelten DC**

Allergen und Allergoid behandelte reife DC wurden mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und an Tag 7 mit neu generierten DC für 24 h restimuliert. In den Überständen wurden die Zytokine mittels ELISA bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte 8 unabhängiger Experimente.



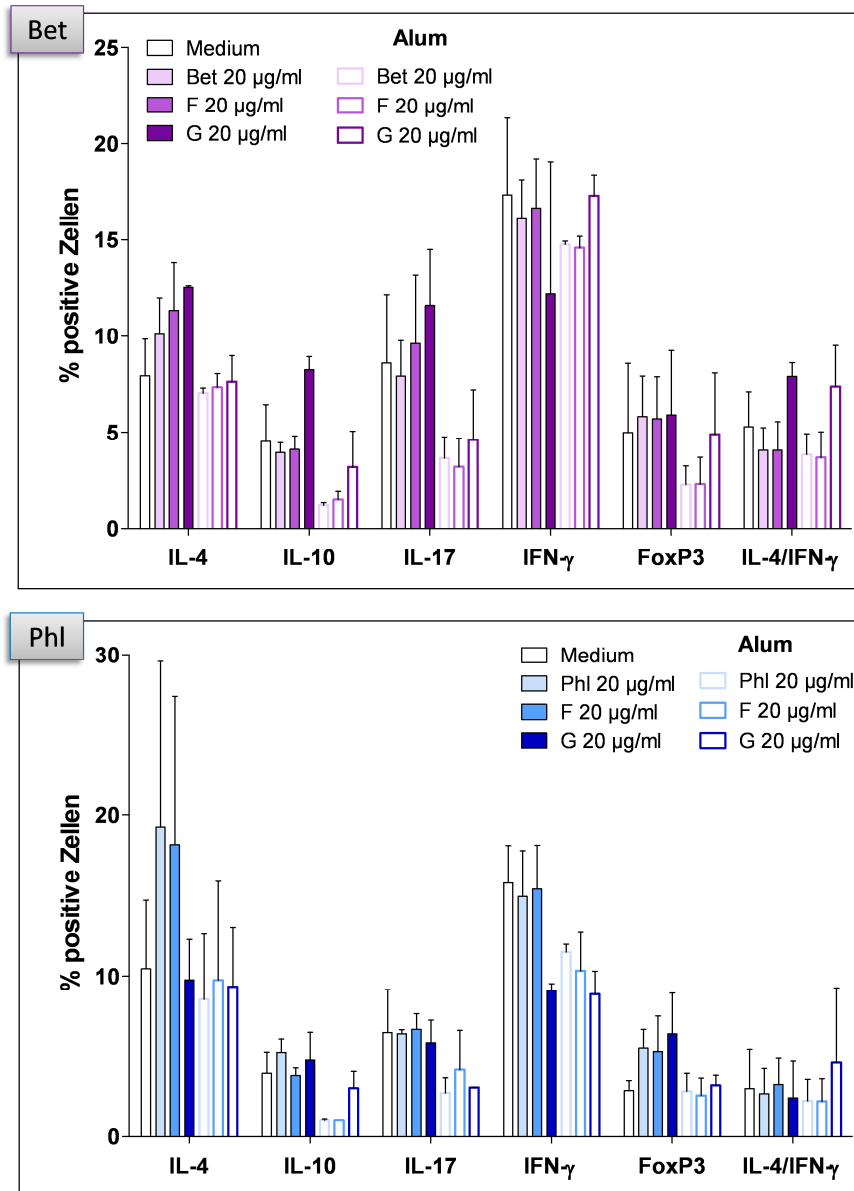
**Abbildung 42: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem PhI Allergen und Allergoid behandelten DC**

Allergen und Allergoid behandelte reife DC wurden mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und an Tag 7 mit neu generierten DC für 24 h restimuliert. In den Überständen wurden die Zytokine mittels ELISA bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte 10 unabhängiger Experimente.

### 3.2.5 Verminderte intrazelluläre Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gelulsten DC

Neben den Zytokinen, die von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gebildet wurden und ins Medium sezerniert wurden, wurde die intrazelluläre Produktion von Zytokinen nach Stimulierung mit Alum-adsorbierten Allergen- und Allergoid-gelulsten DC untersucht. Eine leicht erhöhte IL-4 Produktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte durch Bet Allergen und Allergoid gelulste DC induziert werden, nicht aber durch Alum-adsorbiertes Allergen und Allergoid (Abbildung 43). IL-10 und IL-17 wurden nur nach Kokultur mit Glutaraldehyd-Allergoid gelulsten DC vermehrt gebildet. Die Anzahl an IL-4/IFN-γ positiven Zellen war ebenfalls nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoid gelulsten DC erhöht. Aluminiumhydroxid hatte keinen großen Effekt auf die Zytokinproduktion. In der Regel war hier die Bildung von Zytokinen vergleichbar mit unstimulierten Zellen oder sogar noch stärker vermindert. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Zugabe von PhI Allergen und Allergoid zu DC beobachtet. Alum-adsorbierte Allergen- und Allergoid-behandelte DC induzierten hier in CD4<sup>+</sup> T-Zellen generell eine verminderte Zytokinproduktion. Außerdem wurden IL-4 und IFN-γ nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoid gelulsten DC in geringerem Maße von

CD4<sup>+</sup> T-Zellen gebildet, verglichen mit dem intakten Allergenextrakt und dem Formaldehyd-Allergoid.



**Abbildung 43: Intrazelluläre Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen und Allergoid behandelten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Allergen und Allergoid gepulsten DC stimuliert und nach 7 Tagen mit frischen gleich behandelten DC für 24 h restimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurden die intrazellulär produzierten Zytokine nach zusätzlicher Stimulation mit PMA/Ionomycin/GolgiStop für 5h analysiert; gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

### 3.3 Analyse von Allergenen und Allergoiden mit gleichbleibender Alummeng

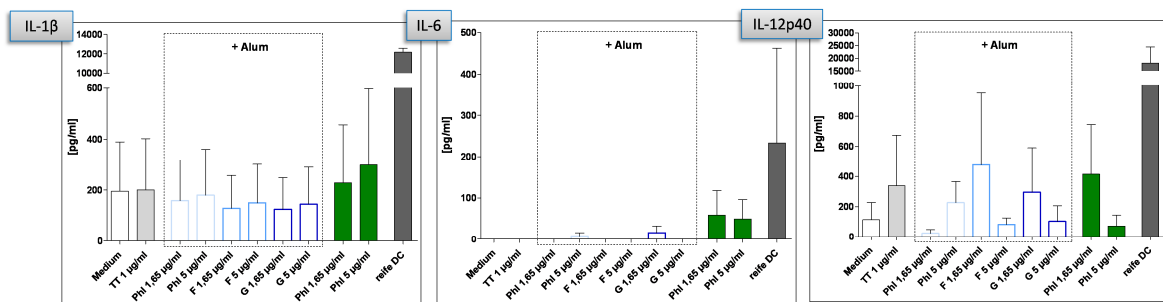
Um Auswirkungen von Aluminiumhydroxid auf die die Immunogenität der intakten Allergenextrakte und der entsprechenden Allergoide weiter zu vergleichen, wurden diese in den folgenden Experimenten in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, jedoch mit stets gleichbleibender Menge an Aluminiumhydroxid eingesetzt. Somit änderte sich nur die Allergenkonzentration, nicht aber die Konzentration an Aluminiumhydroxid. Verglichen

wurden die mit Alum-adsorbierten intakten Allergenextrakte mit den entsprechenden Allergoiden. Als Kontrolle wurde kommerziell erhältliches Gräserallergen der Firma ALK Abelló (Wedel, Deutschland) eingesetzt.

### 3.3.1 DC Zytokine

Auch hier wurde zwei Tage nach Stimulierung der reifen und unreifen DC mit Allergenen und Allergoid die Zytokinproduktion mittels ELISA in den Überständen gemessen.

Die Produktion von IL-1 $\beta$  durch unreife DC unterschied sich nicht zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen (Abbildung 44). Unstimulierte Zellen zeigten ähnliche Mengen an IL-1 $\beta$  wie DC, die mit Alum-adsorbierten Phl Allergenen oder den Allergoiden stimuliert wurden. Auch das kommerziell erhältliche Phl Allergenextrakt wies eine nur leicht verstärkte IL-1 $\beta$  Produktion auf. IL-6 war lediglich nach Stimulation mit Phl Allergenextrakt und in reifen DC detektierbar. Die IL-12p40 Produktion war ähnlich in DC, die mit den Alum-adsorbierten Phl Allergoiden und dem kommerziellen Allergenextrakt behandelt wurden. Hier war die Zytokinproduktion jeweils nach Zugabe der niedrigeren Konzentration erhöht.

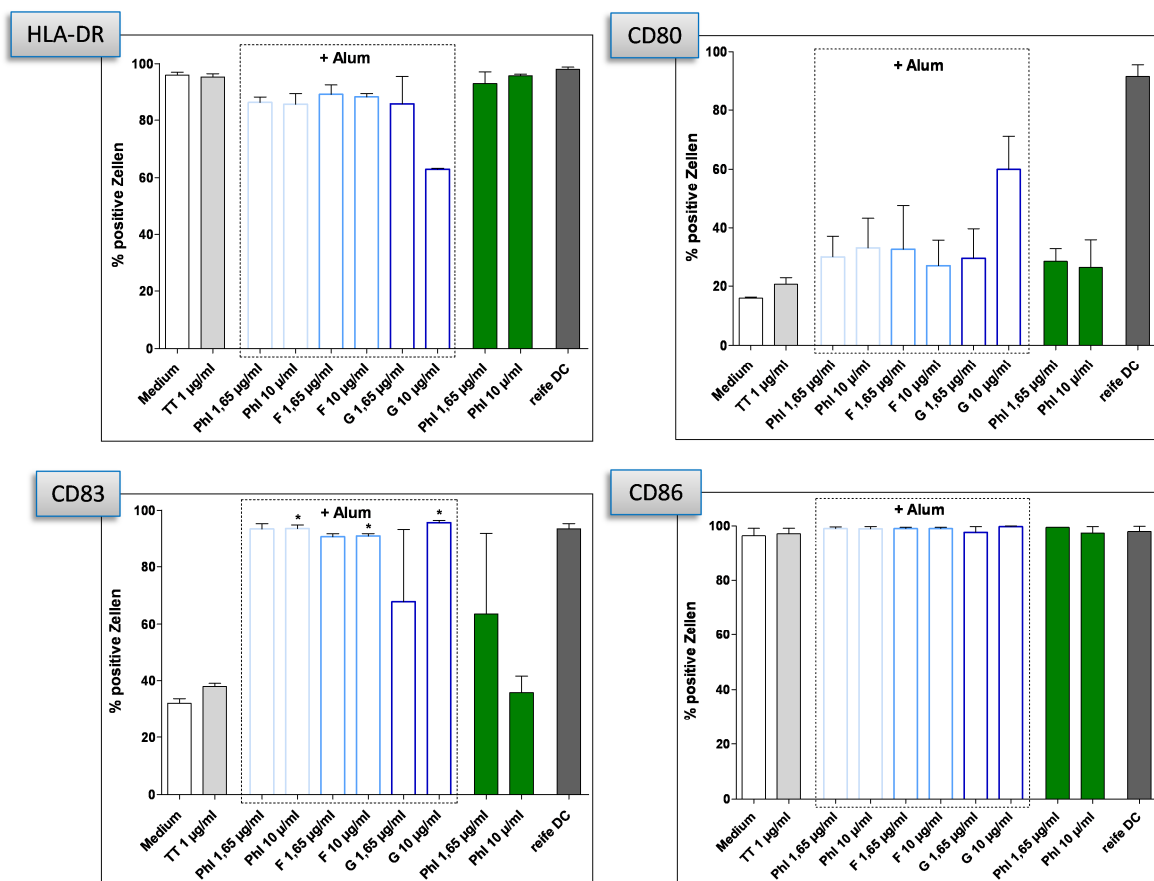


**Abbildung 44: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Allergen und Allergoiden**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit Alum-adsorbiertem intaktem Allergenextrakt und den entsprechenden Allergoiden für 48 h stimuliert. Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils 5 unabhängigen Experimenten.

Reife DC produzierten lediglich nach Stimulation mit Phl Allergenextrakt erhöhte Mengen an IL-6 (Abbildung 45). Die Produktion von IL-12p40 war nur nach Stimulation mit 5 µg/ml Phl Allergenextrakt leicht erhöht. Auch hier bildeten bereits unbehandelte DC das Zytokin. Zwischen Alum-adsorbiertem Allergenextrakt und den entsprechenden Allergoiden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinproduktion.



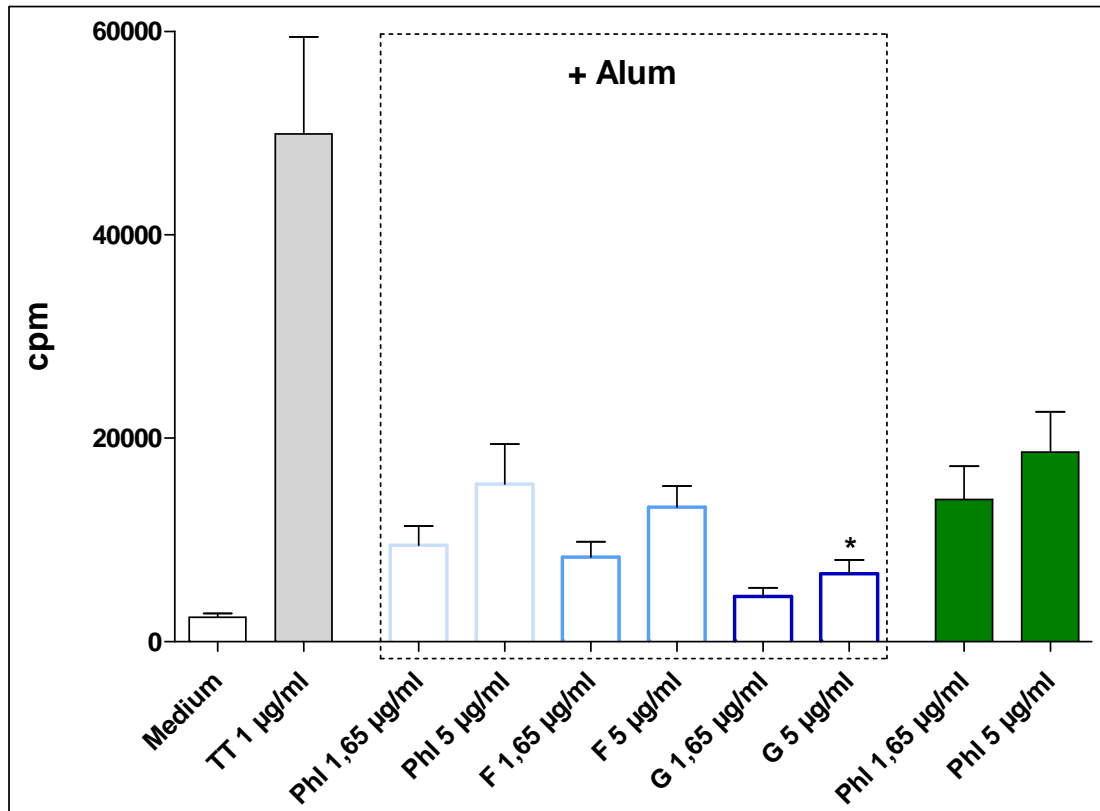


**Abbildung 46: Oberflächenmarker unreifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Allergenextrakt und Allergoiden**

Unreife DC wurden an Tag 6 mit 1.65 oder 10 µg/ml Alum-adsorbiertem Allergenextrakt oder den Allergoiden stimuliert und die Oberflächenmarker nach 48 h mittels Durchflusszytometrie analysiert; gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

### 3.3.3 Verminderte Induktion der Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Glutaraldehyd-Allergoid

Wie bei den unadsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC war die Fähigkeit CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren bei den mit Alum-adsorbierten Glutaraldehyd-Allergoid gepulsten DC signifikant geringer im Vergleich zu intaktem Allergenextrakt und dem Formaldehyd-Allergoid (Abbildung 47). Zwischen Alum-adsorbierten und unadsorbierten Allergen/Allergoid-gepulsten DC gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Induktion der T-Zell Proliferation. Die zusätzliche Zugabe von Aluminiumhydroxid zu den Allergoiden führte demnach zu keiner gesteigerten Reaktivität autologer CD4<sup>+</sup> T-Zellen.



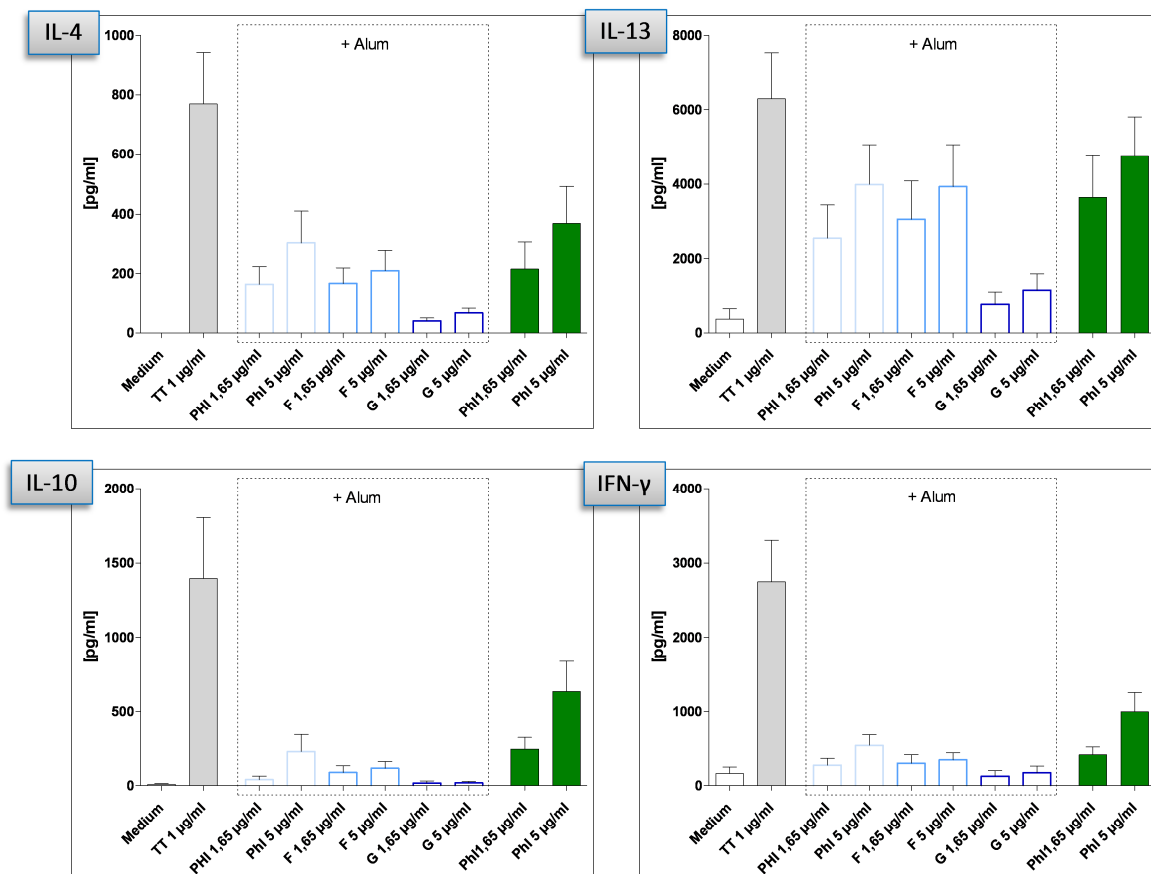
**Abbildung 47: Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum- adsorbierten PhI Allergen- und Allergoid-behandelten DC**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Alum-adsorbiertem Allergen und Allergoid gepulsten DC kokultiviert und die Proliferation gemessen; gezeigt sind die Mittelwerte von 13 unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt, dabei wird  $*=p \leq 0.05$  als statistisch signifikant angesehen.

### 3.3.4 Verminderte Zytokinproduktion nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Glutaraldehyd-Allergoid

Die Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit autologen Alum-adsorbierten oder unadsorbierten Allergen- und Allergoid-gepulsten DC wurde mittels ELISA bestimmt. Generell war hier die Produktion aller Zytokine vermindert, wenn T-Zellen mit PhI Glutaraldehyd-Allergoid behandelten DC stimuliert wurden (Abbildung 48). Des Weiteren gab es keine signifikanten Unterschiede in der Produktion von IL-4 und IL-13 nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergenextrakt- und Allergoid-gepulsten DC im Vergleich zu unadsorbiertem Allergenextrakt/Allergoiden, während IL-10 und IFN- $\gamma$  etwas geringer sezerniert wurden. Aluminiumhydroxid führte somit auch hier zu keiner vermehrten Induktion Th2 spezifischer Zytokine.





**Abbildung 48: Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem PhI Allergen oder Allergoid behandelten DC**

Allergen und Allergoid gepulste DC wurden mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und an Tag 7 für 24 h mit frischen DC restimuliert und die Zytokine in den Überständen mittels ELISA bestimmt; gezeigt sind die Mittelwerte von 13 unabhängigen Experimenten.

### 3.4 Untersuchungen zum Einfluss von Aluminiumhydroxid auf die IL-1 $\beta$ Expression

Es wurde bereits beschrieben, dass Aluminiumhydroxid über das NALP3 Inflammasom die vermehrte Bildung von IL-1 $\beta$  induzieren kann. In den oben beschriebenen Experimenten konnte IL-1 $\beta$  mittels ELISA nicht in den Überständen unreifer DC nachgewiesen werden. Es konnten somit keine Effekte von Alum auf die IL-1 $\beta$  Produktion festgestellt werden. Um die Adjuvanzwirkung weiter zu untersuchen, wurde die IL-1 $\beta$  Produktion durch LPS-stimulierte Monozyten analysiert. Des Weiteren wurde auf RNA-Ebene die Expression von IL-1 $\beta$  in unreifen DC untersucht.

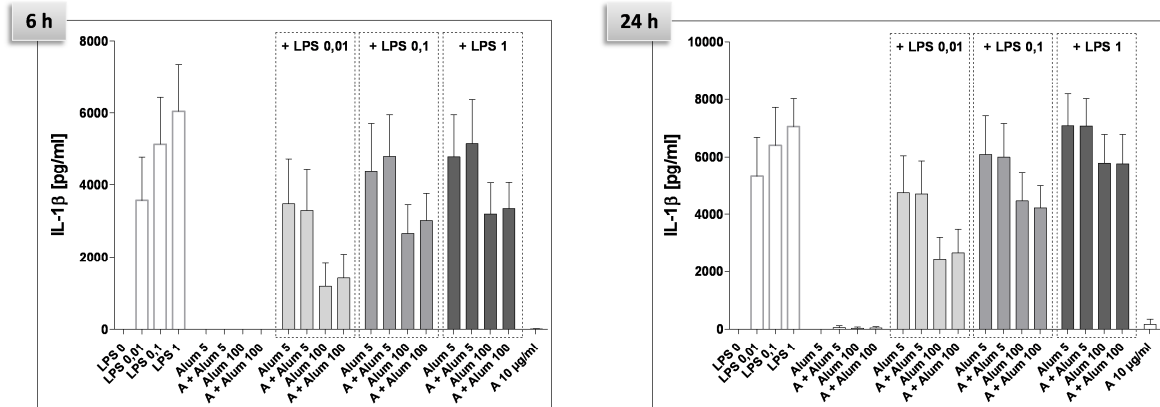
#### 3.4.1 IL-1 $\beta$ Produktion in Monozyten

In früheren Publikationen<sup>(71)</sup> konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von LPS zu Monozyten zu einer erhöhten IL-1 $\beta$  Produktion führen kann.

Da in unreifen DC keine IL-1 $\beta$  Freisetzung nachgewiesen werden konnte, wurden Monozyten allergischer Spender für 6 bzw. 24 h mit LPS und Alum (von Pierce) stimuliert

und die Produktion von IL-1 $\beta$  im Überstand mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen in einigen Ansätzen mit Allergen (10  $\mu$ g/ml, ALK Abelló, Wedel) behandelt.

Hierbei induzierte LPS alleine, abhängig von der Konzentration, eine hohe IL-1 $\beta$  Produktion, die durch die Zugabe von Allergen und Alum nicht weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 49). Die Stimulierung mit Allergen oder Alum in Abwesenheit von LPS konnte keine verstärkte IL-1 $\beta$  Produktion in Monozyten bewirken.



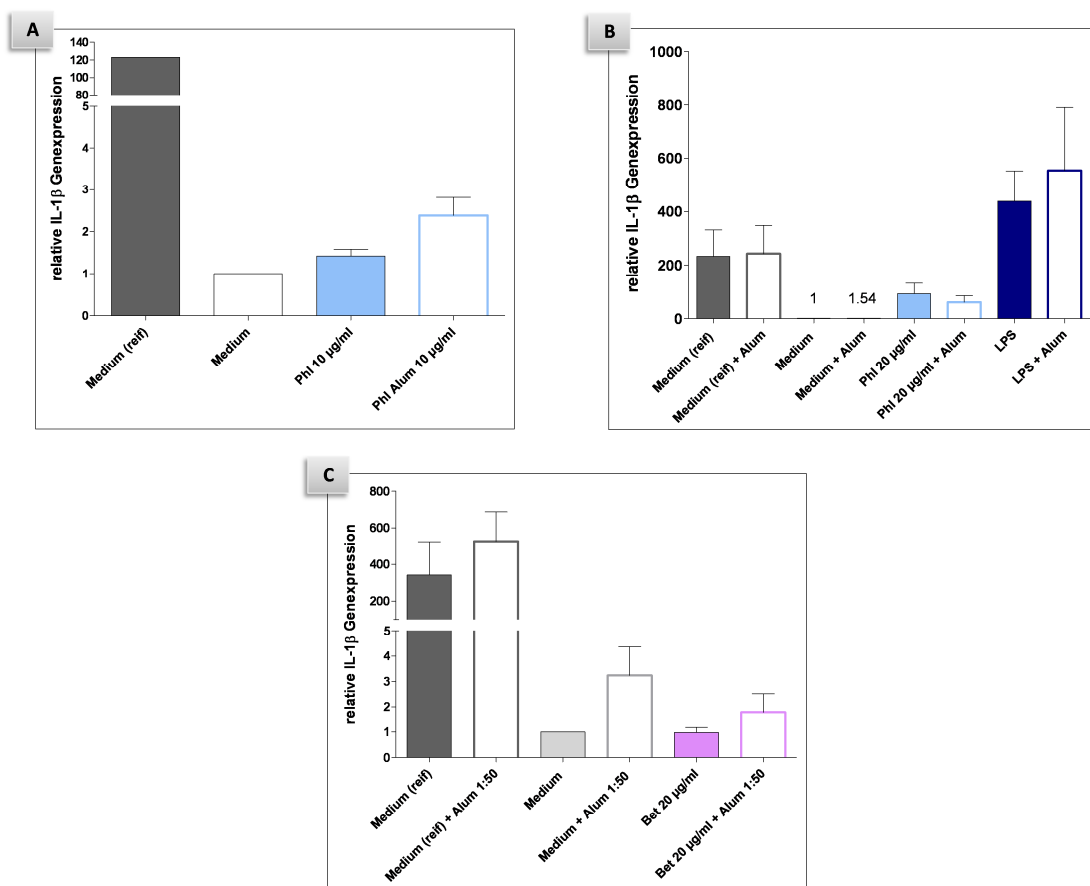
**Abbildung 49: IL-1 $\beta$  Produktion durch Monozyten nach Zugabe von LPS, Allergen und Alum**  
 Monozyten allergischer Spender wurden mit LPS (0,01-1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Alum (5 oder 100  $\mu$ g/ml) und Allergen (Phl oder Bet 10  $\mu$ g/ml). Nach 6 und 24 h wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die IL-1 $\beta$  Produktion quantifiziert. A: Allergen; dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Experimenten.

### 3.4.2 Nachweis von IL-1 $\beta$ in unreifen DC mittels quantitativer Real Time PCR

Da die Produktion von IL-1 $\beta$  durch unreife DC mittels ELISA nicht nachweisbar war und in Monozyten keine Effekte nach Zugabe von Allergen und Alum erkennbar waren, wurde die Genexpression des Zytokins auf RNA-Ebene mittels quantitativer Real Time PCR untersucht. Getestet wurden verschiedene Alum-Präparationen. Diese wurden an Tag 6 zu unreifen DC allergischer Spender gegeben und die Zellen nach 2-48 h geerntet. Aus diesen wurde die RNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und diese in der Real Time qPCR eingesetzt. Als Kontrolle wurde die IL-1 $\beta$  Expression reifer DC bestimmt. Dargestellt wurde die relative Genexpression im Vergleich zu unbehandelten unreifen DC (Medium).

Abbildung 50 A zeigt die Genexpression nach Zugabe von intaktem Phl Allergenextrakt im Vergleich zu intaktem Alum-adsorbiertem Phl Allergenextrakt (Alum-Präparation von ALK Abelló, unter 3.2 beschrieben) nach 48 h. Als Kontrolle wurde hier die Genexpression von unbehandelten reifen und unreifen DC ohne Zugabe von Alum untersucht. Erhielten unreife DC neben dem Allergen einen zusätzlichen Stimulus durch Alum, so war die IL-1 $\beta$  Expression leicht erhöht. Reife DC zeigten im Vergleich zu unreifen DC eine erhöhte Genexpression. In einer Kinetik konnte gezeigt werden, dass die IL-1 $\beta$  Expression in reifen DC nach 2 h am höchsten war (nicht gezeigt). Im Folgenden wurden deshalb die

unreifen DC für 2 h mit Allergenen und Alum stimuliert. In diesen Experimenten wurde Alum der Firma Pierce in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu den DC gegeben. Hier stieg die IL-1 $\beta$  Expression nach zusätzlicher Gabe von Alum in reifen DC und in DC, die mit LPS stimuliert wurden, leicht an (Abbildung 50 B). Zellen die kein Allergen erhielten exprimierten nach Stimulation mit Alum ebenfalls leicht erhöhte Mengen an IL-1 $\beta$ . Die IL-1 $\beta$ -Produktion in unreifen DC nach Stimulation mit Allergen konnte durch Zugabe von Alum nicht erhöht werden. Die Expression des Zytokins war lediglich im Vergleich zu unbehandelten unreifen DC nach Zugabe von Allergen leicht erhöht. Eine weitere Alum-Präparation (Alhydrogel, Brenntag Biosector) wurde zusätzlich zu dem Allergen bzw. zu unbehandelten Zellen im Verhältnis 1:50 in die DC Kultur gegeben (Abbildung 50 C). Mit Alum stimulierte Zellen produzierten dabei vermehrt IL-1 $\beta$ , verglichen mit Zellen, die kein Alum erhielten. Diese Induktion des Zytokins war bei unbehandelten unreifen Zellen ausgeprägter als bei Allergen behandelten unreifen DC.



**Abbildung 50: IL-1 $\beta$  Expression unreifer DC nach Zugabe von Aluminiumhydroxid**

A: DC wurden für 48 h mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Alum-adsorbiertem und unadsorbiertem Allergen stimuliert, n=2. B: DC wurden 2 h mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Phi Allergen oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Alum (Pierce), n=7. C: DC wurden für 2 h mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Bet Allergen und Alum, 1:50 in der Kultur verdünnt, behandelt, n=3.

#### 4. Diskussion

Für die vorliegende Arbeit wurden native *Phleum pratense* und *Betula verrucosa* Allergenextrakte mit den entsprechenden chemisch modifizierten Allergenen, den Allergoiden, verglichen. Die Modifizierung erfolgte mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifizierung der nativen Allergene mit Glutaraldehyd effektiver war. Mittels SDS-PAGE konnten weniger distinkte Banden dargestellt werden. Zudem zeigten sich größere Aggregate mit einem hohen Molekulargewicht verglichen mit dem Formaldehyd-Allergoid und dem unbehandelten Allergenextrakt. Hinsichtlich der Allergenität konnte beobachtet werden, dass Glutaraldehyd-modifizierte Allergoide zu einer verminderten Leukotrien-Freisetzung durch Basophile sensibilisierter Spender führten. Dies war nach Stimulation mit den Formaldehyd-Allergoiden und nativen Allergenextrakten nicht der Fall. Daraus lässt sich schließen, dass IgE-Bindungs-Epitope durch die Behandlung mit Glutaraldehyd effektiv zerstört worden sind. Es erfolgte somit eine reduzierte Kreuzvernetzung von Zell-gebundenem IgE und dadurch eine verminderte Freisetzung von Mediatoren, in diesem Fall von Leukotrienen. Bei Betrachtung der Immunogenität der Allergenextrakte und Allergoide war auch diese durch Glutaraldehyd-modifizierte Allergoide im Vergleich zu nativen Allergenextrakten und Formaldehyd-Allergoiden reduziert. Dies zeigte sich an der verminderten Fähigkeit von Glutaraldehyd-Allergoid gepulsten DC CD4<sup>+</sup> T-Zellen effektiv zu stimulieren, was sich in einer signifikant verminderten T-Zellproliferation und der verminderten Produktion der Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und IFN- $\gamma$  nach Cokultur mit Allergen- und Allergoid-gepulsten DC widerspiegelte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben den B-Zellepitopen, die für die Bindung an IgE wichtig sind, möglicherweise auch lineare T-Zellepitope durch die chemische Modifizierung zerstört worden sein könnten, wodurch die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren beeinträchtigt wurde. Eindeutig könnte dies aber nur durch den Einsatz von T-Zell-Linien oder T-Zellklonen geklärt werden.

Die Zytokinproduktion von unreifen und reifen DC wurde durch die Zugabe von Allergenen und Allergoiden nicht signifikant beeinflusst. DC produzierten vor allem IL-12p40 und IL-6 und waren somit in der Lage sowohl Th1-Zellen als auch Th2-Zellen zu induzieren<sup>(72)</sup>. Bei Analyse der Oberflächenmarker konnte in unreifen DC gezeigt werden, dass die Expression von CD80 und CD83 nach Stimulation mit Glutaraldehyd-Allergoiden leicht erhöht war. Morphologisch waren dabei keine Unterschiede erkennbar. Durch die vorherige Messung des Endotoxingehalts in den Präparationen konnte ausgeschlossen werden, dass diese Effekte auf Grund von erhöhten LPS-Konzentrationen zustande kamen. In reifen DC konnte nach Zugabe des Reifungscocktails und den Allergenen bzw. Allergoiden keine stärkere Expression von CD80 und CD83 induziert werden. Glutaraldehyd-Allergoide scheinen somit unreife DC in geringem Maße zu aktivieren,

indem sie die Reifung bzw. die Expression von co-stimulatorischen Molekülen induzieren. Dies steht zunächst im Widerspruch zu der Tatsache, dass Glutaraldehyd-modifizierte Allergoide langsamer in unreife DC aufgenommen werden als native Allergene oder Formaldehyd-Allergoide, was mittels Durchflusszytometrie und Laser Scanning Mikroskopie gezeigt werden konnte. Allerdings wurden die Oberflächenmarker erst nach 48h gemessen, die Aufnahme in DC jedoch nach 0-90 min bzw. nach 6h. Nach 48h waren keine Unterschiede mehr in der Aufnahme von Glutaraldehyd-Allergoiden verglichen mit Formaldehyd-Allergoiden bzw. Allergenextrakten erkennbar (nicht gezeigt). Somit könnte der aktivierende Effekt zu einem späteren Zeitpunkt während der 48 stündigen Stimulation entstehen.

Die Beobachtungen stimmen mit anderen Studien überein, in denen ebenfalls eine verminderte T-Zellreaktivität durch chemisch modifizierte Allergoide gezeigt werden konnte, welche jedoch die Zytokinproduktion nicht beeinflussten<sup>(41-44)</sup>. In anderen Studien konnte wiederum beobachtet werden, dass durch die Modifizierung nur die IgE-Bindekapazität beeinflusst wird, nicht jedoch die durch Allergen und Allergoid induzierte Proliferation von PBMC<sup>(39;73)</sup>. Zu erklären wären unterschiedliche Beobachtungen mit der Möglichkeit, dass die T-Zellreaktivität abhängig von den APC ist, die in den verschiedenen Studien eingesetzt werden. *Kahlert et al.* konnten zeigen, dass Allergen- und Allergoid-behandelte DC T-Zellen in gleichem Maße stimulieren können. Andere APC, wie z.B. PBMC oder B-Zellen, induzieren hingegen nach Behandlung mit Allergoiden eine verminderte T-Zellproliferation<sup>(45)</sup>. Für die vorliegende Arbeit wurden ebenfalls PBMC anstelle von DC eingesetzt und mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. In diesen Versuchen konnte eine stark verminderte Proliferation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). DC könnten Allergoide möglicherweise mittels Phagozytose und Makropinozytose besser aufnehmen und prozessieren als über einen Fc-Rezeptor-vermittelten Mechanismus, verglichen mit B-Zellen oder PBMC<sup>(74;75)</sup>. Die Aufnahme von Allergenen und Allergoiden in unreife DC sollte somit eigentlich ähnlich sein. Um dies zu untersuchen wurden für diese Arbeit Allergen und Allergoide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und die Aufnahme in unreife DC mittels Durchflusszytometrie und Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Verglichen mit dem nativen Allergenextrakt und den Formaldehyd-Allergoiden wurden die Glutaraldehyd-Allergoide langsamer aufgenommen. Auch eine Co-Lokalisation in den Lysosomen fand hier erst zu einem späteren Zeitpunkt statt. Um die Aufnahme weiter zu analysieren wurden die Mechanismen, über die DC Antigene aufnehmen können, die Makropinozytose und der Mannoserezeptor, blockiert. Wie auch bereits *Sallusto et al.*<sup>(74)</sup> und *Noirey et al.*<sup>(76)</sup> demonstrieren konnten, zeigte sich auch hier, dass nach der Blockierung des Mannoserezeptors und des Signalweges der Pinozytose die Aufnahme von Allergen und Allergoiden in unreife DC stark bzw. komplett

inhibiert war. Dabei wurde die Aufnahme von Glutaraldehyd-Allergoid nach der Blockierung des Mannoserezeptors in geringerem Maße beeinflusst. Dies könnte daran liegen, dass bei der chemischen Modifizierung auch Bindestellen für diesen Rezeptor zerstört wurden. Neben dem Mannoserezeptor exprimieren von Monozyten abgeleitete DC auch den hoch-affinen IgE-Rezeptor, FcεRI<sup>(77)</sup>. Die verminderte T-Zellreaktivität nach Stimulation mit Birken- und Gräserpollen Glutaraldehyd-Allergoiden gepulsten DC in dieser Studie und Milben bzw. Birkenpollen Allergoiden in anderen Studien<sup>(41-43;78)</sup>, könnte auf eine beeinträchtigte Aufnahme über den FcεRI auf Grund der zerstörten IgE-Bindestellen zurückzuführen sein. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass das dissoziierte Schabenallergen Per a 3 schneller in DC aufgenommen wurde und eine verstärkte Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierte als die intakte Form des Moleküls, welches ein Hexamer darstellt<sup>(79)</sup>. Die Unterschiede bei der Aufnahme von Formaldehyd-Allergoid und Glutaraldehyd-Allergoid scheinen durch unterschiedliche Polymerisierung zustände zu kommen. Die dadurch verlangsamte Aufnahme und Prozessierung der Glutaraldehyd-Allergoide scheint in Zusammenhang mit der verminderten Fähigkeit zu stehen, Glutaraldehyd-Allergoid-gepulster DC CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum proliferieren zu bringen und Zytokine zu bilden. Des Weiteren könnte die Zerstörung spezifischer T-Zellepitope bei der verminderten stimulatorischen Aktivität von Allergoid-gepulsten DC beteiligt sein, worauf bereits Studien mit spezifischen T-Zellklonen hingedeutet haben<sup>(41; 42)</sup>. Trotz der verloren gegangenen Reaktivität einiger allergen-spezifischer T-Zellklone gegenüber Allergoiden konnte in mehreren klinischen Studien gezeigt werden, dass die Therapie mit Allergoiden erfolgreich sein kann, vor allem wenn diese mit Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid oder Monophosphoryl Lipid A (MPL<sup>®</sup>) kombiniert werden<sup>(80-85)</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die verbleibenden, auf Allergoide ansprechenden T-Zellklone ausreichen, um immunologische Veränderungen, wie beispielsweise die Herunterregulierung von IgE, die Induktion von IgG/IgG<sub>4</sub> und die Produktion von IFN-γ und IL-10 während der spezifischen Immuntherapie zu induzieren<sup>(81;82;86-88)</sup>. Klinische Studien, welche direkt die Wirksamkeit bzw. die immunologischen Effekte von Allergenen im Vergleich zu Allergoiden bei der SIT untersuchen existieren aber noch nicht.

Bei der Optimierung und Weiterentwicklung der spezifischen Immuntherapie spielen neben dem Einsatz von Allergoiden, rekombinante Allergene eine wichtige Rolle. Für die Allergiediagnostik und die SIT haben rekombinante Allergene einige Vorteile gegenüber natürlichen Allergenextrakten. In letzteren sind oftmals nicht-allergene Materialien bzw. Kontaminationen enthalten. Des Weiteren variieren die Chargen untereinander. Einige wichtige Allergene sind nur in geringeren Mengen vorhanden, andere Allergene weisen eine geringe Immunogenität auf und variieren in ihrer Wirksamkeit. Die Generierung

rekombinanter Allergene ermöglicht hingegen das Entwickeln von reinen Allergenen ohne Kontaminationen. Die hergestellten Moleküle können weiterhin modifiziert werden um beispielsweise unerwünschte Nebenwirkungen bei der SIT zu vermindern. Des Weiteren können Mengenangaben der enthaltenen Antigene einfacher ermittelt werden. <sup>(89;90)</sup>. Es existieren bereits mehrere Studien, in denen rekombinante Birken- und Gräserallergene für die SIT positiv hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet wurden <sup>(91;92)</sup>.

Für die Arbeit wurden neben den Birken- und Gräserpollen Allergengemischen (hier wurde eine neue Charge verwendet) auch deren Einzelallergene Bet v 1 und Phl p 1 untersucht. Hierbei wurden nativer Phl p 1 und rekombinanter Bet v 1 Allergenextrakte mit den entsprechenden Formaldehyd- und Glutaraldehyd-modifizierten Allergoiden hinsichtlich der Immunogenität verglichen. Im Vergleich zu den Gesamtextrakten zeigten die Einzelallergenextrakte einen Einfluss auf unreife DC. Hier war die Zytokinproduktion von IL-6 und IL-12 nach Zugabe von Bet v 1 Allergoiden und dem Formaldehyd-Allergoid des Birken-Gesamtextrakts erhöht. Für Phl p 1 lassen sich jedoch keine genauen Aussagen treffen, da hier nur ein Experiment auswertbar war. Betrachtete man sich den Endotoxingehalt, so war dieser in diesem Fall für die Bet v 1 Allergoide im Vergleich zu nativen Bet v 1 Allergenextrakt erhöht. Bei den Gesamtextrakten war lediglich der Endotoxingehalt für das Formaldehyd-modifizierte Allergoid erhöht. Für die Gräserpollen Präparationen sah dies ähnlich aus. Phl p 1 Formaldehyd-Allergoid wies mehr Endotoxin auf, wohingegen Phl p 1 Allergenextrakt und das Phl p 1 Glutaraldehyd-Allergoid frei davon waren. Bei den Gesamtextrakten war lediglich der Phl Allergenextrakt nahezu frei von LPS. Reife DC produzierten nach Stimulation mit Bet v 1 und Bet Allergenen und Allergoiden gleiche Mengen an IL-12p40. Die Produktion von IL-6 war lediglich nach Behandlung mit den oben genannten LPS-kontaminierten Allergoiden erhöht. Bei der Zytokinproduktion nach Zugabe der Phl p 1 und Phl Allergene bzw. Allergoide war wieder nur ein Experiment auswertbar und die in diesem Experiment beobachteten Effekte auf DC ebenfalls durch den erhöhten Endotoxingehalt der Präparationen zu erklären. Die erhöhte Konzentration von Endotoxin würde ebenfalls die erhöhte Expression von Oberflächenmarkern, des co-stimulatorische Moleküls CD80 und des Reifemarkers CD83, auf unreifen DC erklären, da diese beispielsweise durch LPS über den TLR4 induziert werden <sup>(1;93)</sup>. Nach Zugabe der Bet v 1 Allergoide und des Bet Formaldehyd-Allergoids waren diese verstärkt messbar. Auch nach Zugabe beider Phl Allergoide war deren Expression erhöht. Interessanterweise war hier nach Zugabe von Phl p 1 Glutaraldehyd-Allergoid eine Zunahme von CD80 und CD83 messbar, obwohl diese Präparation frei von LPS war. Dies konnte bereits bei dem oben aufgeführten Vergleich zwischen den Gesamtextrakten beobachtet werden. Somit scheint auch das chemisch modifizierte Einzelallergen Phl p 1 eine Reifung in DC zu induzieren. Die T-Zellreaktivität der

Einzelallergene und Allergoide war verglichen mit der der Gesamtextrakte und den entsprechenden Allergoiden stark vermindert. Wie bereits bei dem Gesamtallergenextrakt gezeigt werden konnte, war auch die Fähigkeit von reifen DC, die mit Bet v 1 oder Phl p 1 Glutaraldehyd-Allergoiden gepulst wurden, CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren leicht, jedoch nicht signifikant vermindert im Vergleich zu den nativen Allergenextrakten und Formaldehyd-Allergoiden. Neben der T-Zellproliferation war dabei auch die Produktion von IL-4, IL-13 und IL-10 durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen reduziert. Für die Experimente wurden Spender verwendet, die zuvor mittels ImmunoCAP<sup>®</sup> positiv auf die jeweiligen Einzelallergene getestet wurden. Somit scheinen die eingesetzten Einzelallergene bzw. Allergoide *in vitro* nicht ausreichend zu sein, um eine adäquate Immunantwort hervorzurufen. In diesem Fall scheinen alle Allergenkomponenten nötig zu sein, um eine starke Immunreaktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren. In anderen Studien konnte allerdings beobachtet werden, dass rekombinantes Bet v 1 sowie natürliches Bet v 1 durchaus in der Lage sind Basophile allergischer Spender zur Degranulation zu bringen sowie in Bet v 1 spezifischen T-Zellen eine Proliferation zu induzieren<sup>(94;95)</sup>.

Neben der SIT wäre der Einsatz von rekombinanten Allergenen auch in der Diagnostik von Vorteil. Hierbei könnte gezielt die Sensibilisierung gegenüber spezifischen Allergenen untersucht werden und somit eine Immuntherapie, die speziell auf das Sensibilisierungsprofil des Patienten ausgerichtet ist, ermöglicht werden<sup>(89;90)</sup>. Weitere Modifizierungen der rekombinanten Allergene versprechen eine Verbesserung der SIT. Genetisch modifizierte Formen von rekombinantem Bet v 1, sog. Hypoallergene, wie z.B. Bet v 1 Fragmente oder Trimere, sollen dabei beispielsweise die allergene Aktivität stark reduzieren<sup>(96-98)</sup>.

Bei der SIT werden die spezifischen Allergene in der Regel zusammen mit einem Adjuvanz, wie z.B. Aluminiumhydroxid, verabreicht, welches die Immunantwort auf das Antigen verstärken soll. Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit native Allergenextrakte und die entsprechenden Allergoide an Alum adsorbiert und die Fähigkeit CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren analysiert.

In der DC-Kultur konnte nach Zugabe von Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden nach 48 h unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass ein Großteil der DC tot war. Der Apoptose-Assay bestätigte diese Beobachtung. Alum scheint somit in hohen Konzentrationen eine toxische Wirkung auf die Zellen zu haben. Auch andere Arbeiten haben gezeigt, dass Alum abhängig von der Konzentration in der Zellkultur toxisch wirken kann<sup>(99;100)</sup>. Da die Allergene und Allergoide an Alum-adsorbiert vorlagen, war es nicht möglich die Konzentration von Alum herabzusetzen. Eine Verminderung des Volumens ging hier immer mit der Reduzierung der Allergen- bzw. Allergoid-Konzentration einher.



Würde diese zu weit herabgesetzt werden, so ließen sich keine messbaren T-Zellreaktionen mehr stimulieren. Für die Cokulturen wurden in den Experimenten mittels Trypanblaufärbung lediglich die lebenden Zellen ausgezählt und entsprechend eingesetzt. Reife DC, die mit Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden gepulst wurden, konnten im Vergleich zu unadsorbierten Allergenen und Allergoiden die Proliferation in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht weiter steigern. Möglicherweise sind während der Cokultur mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt DC, die mit Alum behandelt wurden im Gegensatz zu DC, die mit unadsorbierten Antigenen beladen wurden, gestorben und die Kapazität T-Zellen zu stimulieren ging dadurch verloren. Betrachtete man jedoch die Zytokinproduktion, so war die Produktion von IL-4 nach Zugabe von Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden sowie nach Gabe von Alum alleine erhöht im Gegensatz zu den unadsorbierten Antigenen, während die Zytokine IL-13, IL-10 und IFN-g vermindert produziert wurden. Nach Zugabe von Alum-adsorbiertem Allergen und Allergoid zu unreifen DC konnte beobachtet werden, dass die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD83 im Vergleich zu unadsorbiertem Allergenextrakt ansteigt. Für CD83 war dies sogar signifikant. Alum-adsorbiertes Glutaraldehyd-Allergoid induzierte CD80 in stärkerem Maße im Gegensatz zu dem Allergenextrakt und dem Formaldehyd-Allergoid. Diese Beobachtung konnte bereits bei den Studien von unadsorbierten Allergenextrakten und Allergoiden gemacht werden. Da es sich bei den eingesetzten Glutaraldehyd-Allergoiden um die gleichen handelte, die hier nun zusätzlich an Alum adsorbiert vorlagen, war dies nicht verwunderlich. *Ulanova et al.* konnten bereits in einer Studie an Monozyten zeigen, dass diese nach Behandlung mit Alum verstärkt MHC II Moleküle, CD83 und CD86 exprimieren. Des Weiteren wurde in dieser Studie eine Hochregulierung der IL-4 mRNA nach Zugabe von Alum gemessen. Es konnte beobachtet werden, dass die Hochregulierung der Oberflächenmarker in Zusammenhang mit der IL-4 Produktion steht, da nach Zugabe eines neutralisierenden IL-4 Antikörpers eine erhöhte Expression nicht mehr auftrat. Auch nach Depletion von CD4<sup>+</sup> Zellen war keine erhöhte Expression der Marker zu messen, was darauf hinwies, dass T-Zellen für die Produktion von IL-4 verantwortlich sind und in diesem Fall zur Hochregulierung der Marker führten<sup>(101)</sup>. Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit wurden bei *Ulanova et al.* jedoch Monozyten aus PBMC gesunder Spender untersucht und keine DC. Zudem konnten in den hier untersuchten unreifen DC keine Unterschiede in der Expression von HLA-DR und CD86 beobachtet werden. Da für die Generation von unreifen DC IL-4 bereits im Kulturmedium vorhanden war, ist es schwierig Schlüsse über eine Beteiligung des Zytokins bei der Induktion von CD80 und CD83 durch Alum zu ziehen. Außerdem sollten in der DC-Kultur keine CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden sein, die zusätzlich IL-4 produzieren. In einer weiteren Studie konnten *Rimaniol et al.* zeigen, dass Alum auch in humanen Makrophagen die

Expression von CD83 sowie CD86, jedoch unabhängig von IL-4, induziert<sup>(99)</sup>. In einer murinen Studie konnte, wie auch hier, eine erhöhte Expression von CD80 nach Zugabe von Aluminiumhydroxid beobachtet werden. Auch die vermehrte Produktion von IL-4 durch T-Zellen nach Stimulation mit Alum-behandelten DC konnte im murinen System dargestellt werden<sup>(100)</sup>.

Eine vermehrte Zytokinproduktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 oder IL-12p40 war in reifen und unreifen DC nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden nicht zu beobachten, was für IL-6 und IL-12p40 mit den Daten der murinen Studie übereinstimmt<sup>(100)</sup>.

In einer Studie von *Wilcock et al.* wurden PBMC allergischer Spender hinsichtlich ihrer Immunantwort nach Stimulation mit Alum und Phl Allergenextrakt untersucht. Hier war ebenfalls kein Effekt von Alum auf die Proliferation der PBMC zu erkennen. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit konnten in der Studie keine erhöhte Expression von CD80 gesehen werden. Diese war nach Gabe von Alum reduziert. Des Weiteren war die Produktion der Th2 Zytokine IL-5 und IL-13 nach Stimulation mit Alum und Allergen vermindert<sup>(102)</sup>. In den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen konnte in Überständen der Kokultur von Alum-adsorbierten Allergen und Allergoid gepulsten DC mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls eine verminderte Produktion von IL-13 gemessen werden im Vergleich zu DC, die mit unadsorbierten Allergenextrakten und Allergoiden behandelt wurden. Neben IL-13 war auch die Sezernierung von IL-10 und IFN- $\gamma$  in geringem Maße verringert. Die verminderte Produktion würde auf eine verminderte Th2-Immunantwort hindeuten, jedoch war wie schon beschrieben die Produktion des Th2 Zytokins IL-4 keineswegs vermindert. Eine Reduzierung der IL-4 Produktion nach Stimulation CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Alum-adsorbierten verglichen mit unadsorbierten Allergenen und Allergoiden gepulsten DC ließ sich lediglich intrazellulär nachweisen. Dies galt auch für IL-10, IL-17, FoxP3 sowie in geringem Maße für IFN- $\gamma$ .

In den Experimenten, in denen die gleiche Menge Alum mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen an Phl Allergenextrakt und Allergoiden eingesetzt wurde, konnte nach Zugabe von Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden keine erhöhte Produktion von IL-4 im Vergleich zum unadsorbierten Phl Allergenextrakt gemessen werden. Hier war lediglich die Zytokinproduktion nach Stimulation mit dem Glutaraldehyd-Allergoid stets niedriger als mit allen anderen Präparationen. Des Weiteren wurden IL-10 und IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Allergen und Allergoiden vermindert sezerniert verglichen mit Phl Allergenextrakt. Ziel dieses Versuchsansatzes war es jedoch zu testen, ob gleiche Konzentrationen an Alum unabhängig von der Allergen- oder Allergoid-Konzentration ähnliche Immunantworten auslösen können. Dies war in diesem Ansatz nicht der Fall. T-Zellproliferation und auch Zytokinproduktion waren- wie schon zuvor

beobachtet- durch Alum-adsorbierte Glutaraldehyd-Allergoide stark, in Bezug auf die Proliferation sogar signifikant reduziert. Zudem konnte man sowohl bei dem Allergenextrakt als auch bei den Allergoiden eine Dosisabhängigkeit beobachten, da Proliferation und Zytokinproduktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe der höheren Konzentration verstärkt waren. Hierbei scheint bei dieser Präparation bzw. in dem Versuchsansatz die Beschaffenheit des eingesetzten Antigens eine wichtige Rolle zu spielen. Der Einsatz von Alum überkommt hier nicht die verminderte Kapazität von Glutaraldehyd-Allergoiden T-Zellen genauso effektiv zu stimulieren wie nativer Allergenextrakt oder das Formaldehyd-Allergoid. In einer neuen Studie konnte jedoch aufgezeigt werden, dass solch ein Ansatz auch Erfolg versprechen kann. Hier wurden zwei Impfstoffe mit unterschiedlichen Rezepturen bezüglich der Allergen- und Alum-Konzentration hinsichtlich der Allergenität und Immunogenität miteinander verglichen. *In vivo* konnte dabei in Mäusen beobachtet werden, dass hierbei durch Gabe geringerer Allergenkonzentrationen die Fähigkeit, IgG und T-Zellantworten zu induzieren, dank des Alums bestehen bleibt, die Allergenität jedoch reduziert ist. *In vitro* konnte auch hier kein adjuvanter Effekt von Alum auf die T-Zellreaktivität nachgewiesen werden, jedoch eine erhöhte Expression von CD83 auf unreifen DC nach Behandlung mit Alum<sup>(70)</sup>.

Da Alum in Zusammenhang mit einer erhöhten IL-1 $\beta$  Produktion stehen soll, wurden in dieser Arbeit die Produktion bzw. die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins in unreifen DC allergischer Spender untersucht. Zunächst sollte die Freisetzung von IL-1 $\beta$  durch unreife DC in die Kulturüberstände untersucht werden. Mittels ELISA war in den Überständen unreifer DC nach 48 stündiger Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergenen und Allergoiden kein IL-1 $\beta$  detektierbar. Auch zu früheren Zeitpunkten konnte das Zytokin nicht gemessen werden (nicht gezeigt). Da LPS die Freisetzung von IL-1 $\beta$  durch PBMC induziert<sup>(71)</sup>, wurden zunächst Monozyten allergischer Spender mit verschiedenen Konzentrationen an LPS mit oder ohne Alum bzw. Allergen inkubiert und der IL-1 $\beta$  Release nach 6h und 24h gemessen. LPS induzierte zu beiden Zeitpunkten eine Freisetzung des Zytokins in die Überstände. Eine weitere zusätzliche Stimulation durch Alum und Allergen konnte die Sezernierung von IL-1 $\beta$  nicht verstärken. Eine Zunahme der IL-1 $\beta$  Produktion nach Zugabe von LPS und Alum verglichen zu LPS oder Alum alleine zu Monozyten konnte in einer Studie von *Li et al.* beobachtet werden. Hier war die Freisetzung zudem abhängig vom eingesetzten Alum-Präparat. Des Weiteren konnte in dieser Studie die Produktion von IL-1 $\beta$  durch humane DC nach Stimulation mit LPS und Alum nachgewiesen werden<sup>(103)</sup>. In der Publikation war die IL-1 $\beta$  Freisetzung nach Zugabe von LPS und Alum stets signifikant erhöht im Gegensatz zu LPS alleine, was in den Experimenten dieser Arbeit nicht der Fall war. Dies mag daran liegen, dass die eingesetzte Konzentration an LPS von 3 ng/ml in der Studie von *Li et al.* verglichen mit

10 ng/ml als niedrigste Konzentration, die hier eingesetzt wurde, niedriger war. Möglicherweise war die Stimulation durch diesen TLR4 Agonisten bereits so effektiv, dass sich durch die zusätzliche Gabe von Alum keine signifikant vermehrte IL-1 $\beta$  Produktion induzieren ließ. Unterschiedliche Ergebnisse kommen hier durch unterschiedliche Alum-Präparate zustande. Lediglich Imject Alum von Pierce wurde in beiden Studien in ähnlichen Konzentrationen verwendet.

Als nächstes wurde die Expression von IL-1 $\beta$  in unreifen DC mittels quantitativer Real Time PCR analysiert. Hierbei wurden verschiedene Alum-Präparationen verwendet. Alle Alum-Präparationen konnten in unreifen DC eine leicht erhöhte Expression von IL-1 $\beta$  induzieren verglichen mit DC, die nicht mit Alum stimuliert wurden. Auch nach Zugabe von LPS erfolgte eine erhöhte Expression des Zytokins, die sich nach Zugabe von Alum leicht steigern ließ. Bereits unbehandelte DC (Medium) exprimieren nach zusätzlicher Behandlung mit Alum in geringem Maße vermehrt IL-1 $\beta$ . Somit lässt sich nur auf mRNA Ebene ein leichter Einfluss von Alum auf die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins erkennen.

Wie genau der adjuvante Effekt durch Alum zustande kommt ist bisher immer noch nicht eindeutig geklärt. Ob diese Wirkung erzielt wird, weil Alum über das NALP3 Inflammasom IL-1 $\beta$  induziert, wird stark diskutiert. Das NALP3 Inflammasom scheint *in vivo* eine Rolle bei der Induktion einer Th2 Immunantwort zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass in Mäusen, die defizient für das NALP3 Inflammasom sind, kein Asthma induziert werden kann <sup>(104)</sup>. Des Weiteren wird Alum eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Caspase 1 und der Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 zugeschrieben. Auch einen Effekt auf die direkte Aktivierung von DC soll durch Alum bewirkt werden und dadurch mit Hilfe des Adjuvants eine Immunantwort initiiert werden <sup>(100; 103)</sup>. Kürzlich wurde eine weitere mögliche Erklärung für die Adjuvanzwirkung von Alum vorgestellt. Dabei soll Alum die Produktion von PGE<sub>2</sub> in Makrophagen stimulieren. PGE<sub>2</sub> reguliert daraufhin die Th2 Immunantwort *in vivo*. Dies geschieht jedoch unabhängig vom NALP3 Inflammasom <sup>(105)</sup>. Zudem konnte jüngst in einer Studie gezeigt werden, dass das NALP3 Inflammasom zwar essentiell für die durch Alum induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  ist, jedoch nicht für den adjuvanten Effekt von Alum verantwortlich zu sein scheint, da auch in Abwesenheit des NALP3 Inflammasoms IgG Antikörper durch Alum *in vivo* induziert werden können <sup>(61)</sup>.

Die vorliegenden *in vitro* Daten befassen sich jedoch nicht direkt mit dem NALP3 Inflammasom. Es wurde vorerst versucht einen Effekt der untersuchten Alum-Präparationen in Bezug auf die IL-1 $\beta$  Produktion unreifer DC zu untersuchen. Eine leichte Induktion dieser durch Alum konnte lediglich auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Auf einen adjuvanten Effekt deutet auch die Beobachtung hin, dass Alum unreife DC aktivieren kann, gezeigt durch die vermehrte Expression des Reifungsmarkers CD83 und

des co-stimulatorische Moleküls CD80 nach Stimulation mit Alum. Auch die vermehrte Sezernierung des Th2 Zytokins IL-4 nach Stimulation mit Alum könnte mit einer Wirkverstärkung zusammenhängen. Dabei ist es allerdings nicht von Bedeutung, ob die eingesetzten DC mit unbehandelten Alum-adsorbierten Allergenextrakten oder den Alum-adsorbierten Allergoiden behandelt wurden. Auch Alum alleine, ohne zusätzliches Antigen, induziert die IL-4 Produktion. Um weitere Erkenntnisse über den Adjuvanteneffekt von Alum zu gewinnen, wäre es von Vorteil *in vivo* im Maussystem zu arbeiten. Eine sehr praktikable Möglichkeit, um weitere Effekte zu analysieren, wäre hier z.B. ein humanisiertes Maussystem, in dem Zellen allergischer Spender zum Einsatz kommen können<sup>(106)</sup>.

Unterschiedliche Erkenntnisse, die hier und in bereits veröffentlichten Studien gewonnen werden konnten, lassen sich möglicherweise auf Unterschiede in der Durchführung der Experimente zurückführen. Unterschiedliche Ergebnisse können zum einen durch den Einsatz verschiedener Zelltypen, wie DC, PBMC oder Makrophagen in den Arbeiten zustande kommen. Zudem wurden diese entweder im humanen System oder im Maussystem untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen an Alum bzw. an Allergenen verwendet, welche sich hinsichtlich des Herstellers unterschieden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit getesteten Allergen- und Allergoid-Präparationen nicht vollkommen den gewünschten Anforderungen neuer Antigene für die SIT entsprechen würden. Die nativen Gesamtallergenextrakte, die gewöhnlich bei der SIT eingesetzt werden, induzieren zwar vernünftige T-Zellantworten, besitzen allerdings keine verminderte Allergenität, gezeigt durch einen erhöhten Leukotrien Release durch Basophile, der jedoch - um Nebenwirkungen zu vermeiden - niedrig sein sollte. Die Glutaraldehyd-Allergoide zeigen wiederum auf der einen Seite eine verminderte Freisetzung des Allergiemediators, entstanden durch den Verlust von B-Zell-Epitopen. Auf der anderen Seite deutet eine verminderte T-Zellreaktivität auf den möglichen zusätzlichen Verlust von T-Zell-Epitopen hin, was diese Allergoide wiederum für die SIT weniger geeignet erscheinen lässt. Die untersuchten Einzelallergene zeichnen sich, verglichen mit den Gesamtallergenextrakten, ebenfalls durch eine verminderte T-Zellreaktivität aus. Hier wären weitere Modifikationen, wie sie bereits erforscht werden, nötig. Zu bedenken ist hier zudem, dass alle Experimente *in vitro* durchgeführt wurden. Weitere bzw. andere Erkenntnisse würden sich evtl. *in vivo* im Maussystem gewinnen lassen, da es im humanen System lediglich zum Zusammenspiel von DC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen kommt und andere Zelltypen, die einen Einfluss auf die Immunantwort nehmen könnten, in der Zellkultur nicht vorhanden sind. Damit würden sich auch unterschiedliche

Ergebnisse erklären lassen, die beispielsweise bei der *in vivo* im Vergleich zur *in vitro* Untersuchung des Adjuvanteffekts von Alum zustande kommen.

Anzumerken ist letztendlich auch, dass die immunologischen Effekte, die hier beobachtet wurden, nicht unbedingt mit der klinischen Verträglichkeit und Wirksamkeit korrelieren müssen. Deshalb ist die Untersuchung der Unterschiede von Allergenen und Allergoiden sowie den Adjuvanzen in klinischen Studien erforderlich, um ihren jeweiligen Stellenwert bezüglich der Immuntherapie zu ermitteln.

## 5. Zusammenfassung

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten, insbesondere in den Industriestaaten, stetig angestiegen und schreitet weiterhin fort. Die einzige kausale Therapie, die eine Langzeitwirkung verspricht und der Entwicklung neuer Allergien bzw. dem Fortschreiten der Allergie vorbeugen kann, ist die spezifische Immuntherapie (SIT). Da bei der SIT mit natürlichen Allergenextrakten Nebenwirkungen auftreten können, ist es wichtig Alternativen für diese zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden native Allergene mit modifizierten Allergenen hinsichtlich ihrer Allergenität und Immunogenität verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Glutaraldehyd-modifizierte Allergoide im Vergleich zu nativen Allergenextrakten und Formaldehyd-Allergoiden eine verminderte Allergenität besitzen, was sich z.B. durch den verminderten Release der Allergiemediatoren, den Leukotrienen, durch Basophile allergischer Spender zeigte. Gleichzeitig war allerdings die Fähigkeit Glutaraldehyd-Allergoid-behandelter dendritischer Zellen (DC) autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren stark reduziert. Verglichen mit den nativen Allergenextrakten und den Formaldehyd-Allergoiden waren die Zytokinproduktion und die T-Zellproliferation, für letztere signifikant, vermindert. Damit übereinstimmend war die Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Glutaraldehyd-Allergoiden in unreife DC reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass die Modifizierung mit Glutaraldehyd, jedoch nicht mit Formaldehyd, zumindest bei den hier verwendeten Allergenpräparaten, B-Zell-Epitope zerstört und somit die Allergenität herabgesetzt wurde. Allerdings war dabei gleichzeitig die Immunogenität vermindert. Das verminderte Vorkommen der B-Zell-Epitope wäre beim Einsatz der Allergoide von Vorteil, da damit eine verminderte IgE-Bindekapazität einhergeht und unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden können. Jedoch sollte im günstigsten Fall bei der Allergoidisierung die T-Zell-Stimulationsfähigkeit intakt bleiben, was bei den hier verwendeten Glutaraldehyd-modifizierten Allergoiden nicht der Fall war.

Mit Einzelallergenen aus Birken- und Gräserpollen konnten keine vergleichbaren T-Zellantworten erzielt werden wie mit den Gesamtallergenextrakten. Auch hier waren Proliferation und Zytokinproduktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Einzelallergen-gepulsten DC bei Verwendung von Glutaraldehyd-modifizierten Allergoiden vermindert.

Eine adjuvante Wirkung von Aluminiumhydroxid (Alum) *in vitro* konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig gezeigt werden. Zunächst konnte beobachtet werden, dass die eingesetzten Alum-adsorbierten Allergene und Allergoide eine toxische Wirkung auf DC hatten. Die Proliferation CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte durch DC, die mit Alum-adsorbierten Allergenen behandelt wurden, nicht verstärkt werden, verglichen mit DC, die mit unadsorbiertem Allergen gepulst wurden. Es konnte lediglich eine erhöhte Produktion des

Th2 Zytokins IL-4 durch Alum induziert werden. Einen Adjuvanteneffekt, der in Zusammenhang mit der Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  stehen soll, konnte mittels ELISA in den Überständen unreifer DC nicht nachgewiesen werden. Lediglich in Monozyten, die zusätzlich mit dem TLR-Ligand LPS stimuliert wurden, war IL-1 $\beta$  in den Überständen detektierbar. Auf mRNA-Ebene konnte man einen leichten Effekt durch Alum hinsichtlich der IL-1 $\beta$  Expression erkennen. Nach zusätzlicher Gabe verschiedener Alum-Präparationen zu unreifen DC, die mit Allergen oder LPS stimuliert wurden, exprimierten diese leicht verstärkt IL-1 $\beta$  verglichen mit DC, die kein Alum erhielten.



## 6. Literaturverzeichnis

1. **Murphy K., Travers P., Walport M.** *Janeway Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
2. **Linehan, SA.** The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs. *BMC Immunology*. 2005, 6:4.
3. **Saloga, Klimek, Buhl, Mann, Knop, Grabbe.** *Allergologie Handbuch*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH, 2012.
4. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18:767–811.
5. **Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML.** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today*. 1999, 20:561–67.
6. **Banchereau J., Steinman RM.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998, 392:245-252.
7. **Mellman I, Steinman RM.** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001, 106:255-258.
8. **Pulendran B, Tang H, Manicassamy S.** Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology*. 2010, 11:647-655.
9. **Pirquet, Clemens von.** Allergie. *Münch. Med. Wochenschr.* 1906, 53:1457–58.
10. **Strachan, DP.** Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J*. 1989, 299:1259-60.
11. **Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R.** Allergy, Parasites and the Hygiene Hypothesis. *Science*. 2002, 296:490-494.
12. **von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Böhm O, von Kries R.** Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin. Exp. Allergy*. 2000, 30:187-193.
13. **Platts-Mills TAE, Woodfolk JA.** Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunological Reviews*. 2011, 242:51-68.
14. **Hammad H, Lambrecht BN.** Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature Rev. Immunol.* 2008, 8:193-204.
15. **Jeong SK, et al.** Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *J. Invest. Dermatol.* 2008, 128:1930-39.
16. **McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M.** Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 2006, 1:497–536.
17. **Min B, Paul WE.** Basophils: in the spotlight at last. *Nature Immunol.* 2008, 9:223–225.
18. **Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R.** A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunol.* 2008, 9:310–318.
19. **Pomes, A.** Relevant B cell epitopes in allergic disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010, 152:1-11.
20. **Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM.** The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008, 454:445-454.
21. **Akkoc T, Akdis M, Akdis CA.** Update in the Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011, 3:11-20.

22. **Jr, MacGlashan D.** IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol.* 2008, 20:717-23.
23. **Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD.** IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125:73-80.
24. **de Blay F, et al.** Airborne dust mite allergens: comparison of group II allergens with group I mite allergen and cat-allergen Fel d I. *J Allergy Clin Immunol.* 1991, 88:919–926.
25. **Platts-Mills JA, et al.** Airborne endotoxin in homes with domestic animals: implications for cat-specific tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 116:384–389.
26. **Holgate ST, Polosa R.** Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature.* 2008, 8:218-230.
27. **Jacobsen L, et al.** Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy.* 2007, 62:943-8.
28. **Noon, L.** Prophylactic inoculation against hay fever. *The Lancet.* 1911, 177:1572-73.
29. **Jutel M, Akdis CA.** Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy.* 2011, 66:725–732.
30. **Larché M, Akdis CA, Valenta R.** Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2006, 6:761-771.
31. **Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J.** Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol.* 1997, 27:1131-9.
32. **Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA.** IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2003, 33:1205-1214.
33. **Bellinghausen I, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J.** Inhibition of human allergic T-helper type 2 immune responses by induced regulatory T cells requires the combination of interleukin-10-treated dendritic cells and transforming growth factor-beta for their induction. *Clin Exp Allergy.* 2006, 36:1546-1555.
34. **Marsh DG, Lichtenstein ML, Campbell DH.** Studies on 'allergoids' prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component. *Immunology.* 1970, 18:705-22.
35. **Norman PS, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Marsh DG.** Controlled evaluation of allergoid in the immunotherapy of ragweed hay fever. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1982, 70:248-60.
36. **Bousquet J, Hejjaoui A, Skassa-Brociek W, Guérin B, Maasch HJ, Dhivert H, Michel FB.** Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. *J Allergy Clin Immunol.* 1987, 80:591-8.
37. **Yang X, Gieni RS, Mosmann TR, HayGlass KT.** Chemically modified antigen preferentially elicits induction of Th1-like cytokine synthesis patterns in vivo. *J Exp Med.* 1993, 178:349-53.
38. **von Baehr V, Hermes A, von Baehr R, Scherf HP, Volk HD, Fischer von Weikersthal-Drachenberg KJ, Woroniecki S.** Allergoid-specific T-cell reaction as a measure of the immunological response to specific immunotherapy (SIT) with a Th1-adjuvanted allergy vaccine. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2005, 15:234-41.
39. **Ibarrola I, Sanz ML, Gamboa PM, Mir A, Benahmed D, Ferrer A, Arilla MC, A, Asturias JA.** Biological characterization of glutaraldehyde-modified *Parietaria judaica* pollen extracts. *Clin Exp Allergy.* 2004, 34:303-9.

40. **Casanovas M, Fernandez-Caldas E, Alamar R, Basomba A.** Comparative study of tolerance between unmodified and high doses of chemically modified allergen vaccines of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005, 137:211-8.
41. **Dormann D, Ebner C, Jarman ER, Montermann E, Kraft D, Reske-Kunz AB.** Responses of human birch pollen allergen-reactive T cells to chemically modified allergens (allergoids). *Clin Exp Allergy.* 1998, 28:1374-83.
42. **Kalinski P, Lebre MC, Kramer D, de Jong EC, Van Schijndel JW, Kapsenberg ML.** Analysis of the CD4+ T cell responses to house dust mite allergoid. *Allergy.* 2003, 58:648-56.
43. **Lund L, Henmar H, Würtzen PA, Lund G, Hjortskov N, Larsen JN.** Comparison of allergenicity and immunogenicity of an intact allergen vaccine and commercially available allergoid products for birch pollen immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2007, 37:564-71.
44. **Würtzen PA, Lund L, Lund G, Holm J, Millner A, Henmar H.** Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007, 144:287-95.
45. **Kahlert H, Grage-Griebenow E, Stuwe HT, Cromwell O, Fiebig H.** T cell reactivity with allergoids: influence of the type of APC. *J Immunol.* 2000, 165:1807-15.
46. **Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, Canonica GW.** Randomized controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet.* 1998, 351:629-632.
47. **Mistrello G, Brenna O, Roncarolo D, Zanoni D, Gentili M, Falagiani P.** Monomeric chemically modified allergens: immunologic and physicochemical characterization. *Allergy.* 1996, 51: 8-15.
48. **Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F.** A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy.* 2001, 56:498-505.
49. **Puggioni F, Durham SR, Francis JN.** Monophosphoryl lipid A (MPL(R)) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses. *Allergy.* 2005, 60:678-84.
50. **Kussebi F, Karamloo F, Rhyner C, Schmid-Grendelmeier P, Salagianni M, Mannhart C, Akdis M, Soldatova L, Markovic-Housley Z, Von Beust BR, Kundig T, Kemeny DM, Blaser K, Cramer R, Akdis CA.** A major allergen gene-fusion protein for potential usage in allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 115:323-9.
51. **Müller U, Akdis CA, 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. *J Allergy Clin Immunol.* 1998, 101:747-54.
52. **Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, Li H, Coffman R, Seyfert V, Eiden JJ, Broide D.** Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 2006, 355:1445-55.
53. **Strunk RC, Bloomberg GR.** Omalizumab for Asthma. *N Engl J Med.* 2006, 354:2689-95.
54. **Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U.** Immunological notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol.* 1926, 29:31-4.
55. **H, HogenEsch.** Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine.* 2002, 20:34-39.

56. **Glenny AT, Buttle AH, Stevens MF.** Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol Bacteriol* . 1931, 34:267–75.
57. **WT, Harrison.** Some observations on the use of alum-precipitated diphtheria toxoid. *Am J Public Health* . 1935, 25:298–300.
58. **Holt, LB.** Developments in diphtheria prophylaxis. *London: Heinemann.* 1950, 67–99.
59. **Gupta RK, Chang A-C, Griffin P, Rivera R, Siber GR.** In vivo distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing <sup>14</sup>C-labeled tetanus toxoid. *Vaccine.* 1996, 14:1412–6.
60. **Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA.** Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 2008, 453:1122–1126.
61. **Franchi L, Nunez G.** The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 $\beta$  secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol.* 2008, 38:2085–2089.
62. **Marrack P, McKee AS, Munks MW.** Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology.* 2009, 9:287-293.
63. **Schnare M, et al.** Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunol.* . 2001, 2:947–950.
64. **Gavin AL, et al.** Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* . 2006, 314:1936–1938.
65. **Lambrecht BN, Kool M, Willart MAM, Hammad H.** Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2009, 21:23-9.
66. **Kool M, et al.** Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* . 2008, 205:869–882.
67. **PH, Grun JL. Maurer.** Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell. Immunol.* 1989, 121:134–145.
68. **Jordan MB, Mills DM, Kappler J, Marrack P, Cambier JC.** Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science* . 2004, 304:1808-1810.
69. **Wang HB, Weller PF.** Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol.* 2008, 83:817-821.
70. **Rask C, Lund L, Lund G, Heydenreich B, Wurtzen P, Bellinghausen I, Saloga J, Lund K.** An alternative allergen:adjuvant formulation potentiates the immunogenicity and reduces allergenicity of a novel subcutaneous immunotherapy product for treatment of grass pollen allergy. *Clin Exp Allergy.* 2012, akzeptiert.
71. **Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM.** IL-10 Inhibits Transcription of Cytokine Genes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology.* 1994, 153:811-816.
72. **Bellinghausen I, Brand U, Knop J, Saloga J.** Comparison of allergen-stimulated dendritic cells from atopic and nonatopic donors dissecting their effect on autologous naive and memory T helper cells of such donors. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 , 105:988-96.
73. **Kahlert H, Stuwe H, Cromwell O, Fiebig H.** Reactivity of T cells with grass pollen allergen extract and allergoid. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999, 120:146-57.
74. **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 [see comments]. *J Exp Med* . 1995, 182:389–400.

75. **Maurer D, Ebner C, Reininger B, Fiebiger E, Kraft D, Kinet JP, Stingl G.** The high affinity IgE receptor (FcεRI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol* . 1995, 154:6285–90.
76. **Noirey N, Rougier N, Andre C, Schmitt D, Vincent C.** Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2000, 105:1194–201.
77. **Maurer D, Fiebiger S, Ebner C et al.** Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma- chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* . 1996, 157:607–16.
78. **Henmar H, Lund G, Lund L, Petersen A, Wurtzen PA.** Allergenicity, immunogenicity and dose-relationship of three intact allergen vaccines and four allergoid vaccines for subcutaneous grass pollen immunotherapy. *Clin Exp Immunol* . 2008, 153:316-23.
79. **Bellinghausen I, Häringer B, Lafargue B, Strand D, König B, Decker H, Saloga J.** Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3. *Clin Exp Allergy*. 2008, 38:539–48.
80. **Caffarelli C, Sensi LG, Marcucci F, Cavagni G.** Preseasonal local allergoid immunotherapy to grass pollen in children: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Allergy*. 2000, 55:1142-7.
81. **Corrigan CJ, Kettner J, Doemer C, Cromwell O, Narkus A.** Efficacy and safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six-grass pollen allergoid. *Allergy* . 2005, 60:801-7.
82. **Ceuppens JL, Bullens D, Kleinjans H, van der WJ.** Immunotherapy with a modified birch pollen extract in allergic rhinoconjunctivitis: clinical and immunological effects . *Clin Exp Allergy* . 2009, 39:1903-9.
83. **Rosewich M, Schulze J, Eickmeier O, Telles T, Rose MA, Schubert R, Zielen S.** Tolerance induction after specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A in children. *Clin Exp Immunol* . 2010, 160:403-10.
84. **Riechelmann H, Schmutzhard J, van der Werf JF, Distler A, Kleinjans HA.** Efficacy and safety of a glutaraldehyde-modified house dust mite extract in allergic rhinitis . *Am J Rhinol Allergy*. 2010, 24:e104-e109.
85. **Zielen S, Kardos P, Madonini E.** Steroid-sparing effects with allergen-specific immunotherapy in children with asthma: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* . 2010, 126:942-9.
86. **Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R et al.** Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma- and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy*. 2006, 36:261-72.
87. **Burastero SE, Mistrello G, Falagiani P et al.** Effect of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid on allergen-specific T-cell proliferation and interleukin 10 production. *Ann Allergy Asthma Immunol* . 2008, 100:343-50.
88. **James LK, Durham SR.** Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2008, 38:1074-88.
89. **Valenta R, Linhart B, Swoboda I, Niederberger V.** Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy* . 2011, 66:775–783.
90. **Valenta R, Niederberger V.** Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007, 119:826-30.

91. **Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, Purohit A, Arvidsson M, Kavina A, Schroeder JW, Mothes N, Spitzauer S, Montagut A, Galvain S, Melac M, André C, Poulsen LK, Malling HJ.** Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008, 122:951-60.
92. **Jutel M, Jäger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O.** Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 116:608–613.
93. **Cao W, Lee SH, Lu J.** CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J.* 2005, 385:85–93.
94. **Batard T, Didierlaurent A, Chabre H, Mothes N, Bussi eres L, Bohle B, Couret MN, Ball T, Lemoine P, Focks Tejkl M, Chenal A, Cl ement G, Dupont F, Valent P, Krauth MT, Andr e C, Valenta R, Moingeon P.** Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005, 136:239-49.
95. **Himly M, Nony E, Chabre H, Van Overtvelt L, Neubauer A, van Ree R, Buchheit KH, Vieths S, Moingeon P, Ferreira F.** Standardization of allergen products: 1. Detailed characterization of GMP-produced recombinant Bet v 1.0101 as biological reference preparation. *Allergy.* . 2009, 64:1038-45.
96. **Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth MT, Valent P, Reisinger J, Pelzmann M, Hayek B, Kronqvist M, Gafvelin G, Gronlund H, Purohit A, Suck R, Fiebig H, Cromwell O, Pauli G, van Hage-Hamsten M, Valenta R.** Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004, 101:14677-82.
97. **Vrtala S, Hirtenlehner K, Vangelista L, Pastore A, Eichler HG, Sperr WR, Valent P, Ebner C, Kraft D, Valenta R.** Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments: candidates for a novel form of specific immunotherapy. *J Clin Invest.* 1997, 99:1673–1681.
98. **Vrtala S, Hirtenlehner K, Susani M, Akdis M, Kussebi F, Akdis CA, Blaser K, Hufnagl P, Binder BR, Politou A, Pastore A, Vangelista L, Sperr WR, Semper H, Valent P, Ebner C, Kraft D, Valenta R.** Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen Bet v 1. *FASEB J.* 2001, 15:2045-7.
99. **Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, Sauzeat E, Fournier JG, Clayette P, Siegrist CA, Dormont D.** Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine.* 2004 , 22:3127-35.
100. **Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H.** Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine.* 2007 , 25:4575-85.
101. **Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA.** The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun.* . 2001, 69:1151-9.
102. **Wilcock LK, Francis JN, Durham SR.** Aluminium hydroxide down-regulates T helper 2 responses by allergen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Allergy.* 2004, 34:1373-8.
103. **Li H, Nookala S, Re F.** Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol.* 2007, 178:5271-6.
104. **Besnard AG, Guillou N, Tschopp J, Erard F, Couillin I, Iwakura Y, Quesniaux V, Ryffel B, Togbe D.** NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy.* 2011, 66:1047-57.
105. **Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y.** Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity.* 2011, 34:514-26.

106. **Weigmann B, Schughart N, Wiebe C, Sudowe S, Lehr HA, Jonuleit H, Vogel L, Becker C, Neurath MF, Grabbe S, Saloga J, Bellinghausen I.** Allergen-induced IgE-dependent gut inflammation in a human PBMC-engrafted murine model of allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 , 129:1126-35.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allergenquellen .....	6
Abbildung 2: Manifestierung einer allergischen Immunantwort.....	9
Abbildung 3: Toleranzinduktion nach erfolgreicher SIT.....	12
Abbildung 4: Modell für die Allergoidisierung nativer Allergene.....	14
Abbildung 5: Modell für die Funktion des NLRP3 Inflammasoms.....	16
Abbildung 6: Nachweis der Formaldehyd- und Glutaraldehyd-Modifizierung von Allergoiden mittels Westernblot.....	41
Abbildung 7: Leukotrien-Freisetzung Basophiler nach Stimulation mit Allergen und Allergoid.....	42
Abbildung 8: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Bet Allergen und Allergoiden.....	43
Abbildung 9: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Phl Allergen und Allergoiden.....	44
Abbildung 10: IL-6 und IL-12p40 Produktion reifer DC nach Stimulation mit intakten Allergenextrakten und Allergoiden.....	45
Abbildung 11: Expression der Oberflächenmarker unreifer DC nach Stimulation mit Bet Allergenextrakt und Allergoiden.....	46
Abbildung 12: Expression der Oberflächenmarker unreifer DC nach Stimulation mit Phl Allergenextrakt und Allergoiden.....	46
Abbildung 13: Expression der Oberflächenmarker nach Stimulation mit Phl Allergenextrakt und Allergoiden (Dotplot).....	47
Abbildung 14: Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit autologen Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	48
Abbildung 15: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet Allergen- bzw. Allergoid-gepulsten DC.....	49
Abbildung 16: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Phl Allergen- bzw. Allergoid-gepulsten DC.....	49
Abbildung 17: Intrazelluläre Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	50
Abbildung 18: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Phl Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	51
Abbildung 19: Fluoreszenzintensität von Alexa Fluor 488 <sup>®</sup> markiertem Allergen und Allergoid.....	52
Abbildung 20: Absorption von pHrodo <sup>™</sup> Red markiertem Allergen und Allergoid.....	52
Abbildung 21: Aufnahme von Alexa Fluor 488 <sup>®</sup> markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC.....	53
Abbildung 22: Aufnahme von pHrodo <sup>™</sup> Red markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC.....	54
Abbildung 23: Aufnahme von Alexa Fluor 488 <sup>®</sup> markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC.....	55
Abbildung 24: Aufnahme von pHrodo <sup>™</sup> Red markiertem Allergen und Allergoid in unreife DC.....	56
Abbildung 25: Blockierung der Allergen/Allergoid-Aufnahme in unreife DC durch Mannan und DMA.....	57
Abbildung 26: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Einzelallergenen.....	59
Abbildung 27: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Einzelallergenen.....	59
Abbildung 28: Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen DC nach Stimulation mit Bet v 1 Allergen und Allergoiden.....	60
Abbildung 29: Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen DC nach Stimulation mit Phl p 1 Allergen und Allergoiden.....	60
Abbildung 30: Verminderte Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet v 1 und Phl p 1 Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	61
Abbildung 31: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Bet v 1 Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	62
Abbildung 32: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Phl p 1 Allergen- und Allergoid-gepulsten DC.....	62
Abbildung 33: Apoptose unreifer DC nach Stimulation mit Aluminiumhydroxid.....	64
Abbildung 34: Apoptose reifer DC nach Stimulation mit Aluminiumhydroxid.....	64
Abbildung 35: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulierung mit Alum-adsorbierten Bet Allergenextrakt und Allergoiden.....	65
Abbildung 36: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulierung mit Alum-adsorbierten Phl Allergenextrakt und Allergoid.....	66
Abbildung 37: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Bet Allergenextrakt und Allergoiden.....	67
Abbildung 38: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Phl Allergenextrakt und Allergoiden.....	67
Abbildung 39: Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Bet Allergen und Allergoid behandelten DC.....	68
Abbildung 40: Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Phl Allergen und Allergoid behandelten DC.....	69
Abbildung 41: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Bet Allergen und Allergoid behandelten DC.....	70
Abbildung 42: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Phl Allergen und Allergoid behandelten DC.....	71
Abbildung 43: Intrazelluläre Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen und Allergoid behandelten DC.....	72
Abbildung 44: Zytokinproduktion unreifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Allergen und Allergoiden.....	73
Abbildung 45: Zytokinproduktion reifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbierten Allergen und Allergoiden.....	74
Abbildung 46: Oberflächenmarker unreifer DC nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Allergenextrakt und Allergoiden.....	75
Abbildung 47: Proliferation CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum- adsorbierten Phl Allergen- und Allergoid-behandelten DC.....	76
Abbildung 48: Zytokinproduktion CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit Alum-adsorbiertem Phl Allergen oder Allergoid behandelten DC.....	77
Abbildung 49: IL-1 $\beta$ Produktion durch Monozyten nach Zugabe von LPS, Allergen und Alum.....	78
Abbildung 50: IL-1 $\beta$ Expression unreifer DC nach Zugabe von Aluminiumhydroxid.....	79



**Lebenslauf**



