

Analyse der T-Zellkreuzreaktivität bei Birken- pollenallergikern mit assoziierter Nahrungsmittelallergie

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Claudia Hofmann

geboren am 31. Mai 1981
in Frankenthal (Pfalz)

Mainz, Juli 2014

Angefertigt an der
Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

18.09.2014

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mainz, den 11.07.2014

(Claudia Hofmann)

Danksagung

Abstracts und Vorträge

Hofmann C, Vieths S, Scheurer S, Steinbrink K, Adler HS. Birch-pollen allergy with associated oral allergy syndrome to hazelnut is characterized by T cell cross-reactivity between Bet v 1a and Cor a 1.0401 in a group of patients in contrast to healthy subjects. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie. 11.03.-12.03.2010, Mainz 2010 (Vortrag)

Hofmann C, Vieths S, Scheurer S, Steinbrink K, Adler HS. Patients with birch-pollen associated oral allergy syndrome to hazelnut, but not non-allergic controls, exhibit cross reactive T cell responses between Bet v 1 a and Cor a 1.0401. Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 18.02-20.02.2010, Lübeck 2010 (Poster)

Hofmann C, Scheurer S, Vieths S, Steinbrink K, Adler HS. Birch pollen allergic subjects with secondary food allergy to hazelnut and carrot display T cell cross-reactivity between Bet v 1.0101, Cor a 1.0401 and Dau c 1.0104 in contrast to healthy subjects. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 05.06-09.06.2010, London 2010 (Poster)

Hofmann C, Vieths S, Scheurer S, Steinbrink K, Adler HS. A novel method for flow cytometry-based analysis of T cell cross reactivity of birch pollen allergen Bet v 1 and homologous food allergens. Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung, 17.02.-19.02. 2011, Tübingen 2011 (Poster)

Hofmann C, Scheurer S, Vieths S, Adler HS, Steinbrink K. Analysis of T cell cross-reactivity of birch pollen allergic patients with associated food allergy to hazelnuts. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie. 8.09-11.09. 2011, Wiesbaden 2011 (Poster und Vortrag)

Publikationen

Hofmann C, Scheurer S, Rost K, Graulich E, Jamin A, Foetisch K, Saloga J, Vieths S, Steinbrink K, Adler HS. Cor a 1-reactive T cells and IgE are predominantly cross-reactive to Bet v 1 in patients with birch pollen-associated food allergy to hazelnut. J Allergy Clin Immunol 2013 May;131(5):1384-92

Bacher N, Raker V, **Hofmann C**, Graulich E, Schwenk M, Baumgrass R, Bopp T, Zechner U, Merten L, Becker C, Steinbrink K. Interferon- α suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. Cancer Res. 2013 Sep 15;73(18):5647-56

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Danksagung	II
Abstracts und Vorträge	III
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Die Allergie	1
1.2 Der Mechanismus der Typ I-Allergie	4
1.3 Die Nahrungsmittelallergie	9
1.4 Die Grundlagen der Kreuzallergie	10
1.5 Therapiemöglichkeiten	12
1.6 Ziel der Arbeit	15
2. Material	16
2.1 Laborgeräte	16
2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien	16
2.3 Allgemeine Reagenzien	17
2.4 Medien	18
2.5 Puffer und Lösungen	18
2.6 Antikörper für durchflusszytometrische Messungen	18
2.6.1 Primärantikörper, unkonjugiert	18

2.6.2	Sekundärantikörper	19
2.6.3	Isotyp-Kontrollantikörper, unkonjugiert	19
2.6.4	Primärantikörper, konjugiert	19
2.6.5	Isotyp-Kontrollantikörper, konjugiert	19
2.7	Proliferationsfarbstoffe	20
2.8	Reagenzien zur Zellkultivierung und –anreicherung.....	20
2.8.1	Zytokine und Prostaglandin	20
2.8.2	Rekombinante Allergene	20
2.8.3	MicroBeads	20
2.9	Proteinbestimmung.....	20
2.10	Zytokinbestimmung.....	21
3.	Methoden	22
3.1	Heterologe Expression und Aufreinigung der Allergene.....	22
3.2	Bestimmung des Endotoxingehaltes der Allergene	22
3.3	Analyse des Proteingehalts der Allergene.....	22
3.4	Pricktest.....	23
3.5	Bestimmung von allergenspezifischem IgE.....	23
3.6	Quantitative IgE-ELISA-Inhibition.....	24
3.7	Bedingungen für das Arbeiten mit Zellkultur.....	24
3.8	Messung der Lebendzellzahlen mittels Trypanblau-Färbung	25
3.9	Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut von Probanden	25
3.10	<i>In vitro</i> Generierung von unbeladenen und allergenbeladenen dendritischen Zellen.....	26
3.11	Aufreinigung von CD4 ⁺ T-Zellen	27
3.12	Durchflusszytometrische Standardanalysen	28
3.12.1	Fluoreszenzfärbung von dendritischen Zellen	29
3.12.2	Fluoreszenzfärbung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	29
3.13	Färbung von CD4 ⁺ T-Zellen mit Proliferationsfarbstoffen	30

3.13.1	CFSE-Färbung	30
3.13.2	CellTrace™ Violet-Färbung	30
3.14	Proliferationsmessung	31
3.14.1	Proliferationsmessung mittels ³ H-Thymidinassay	31
3.14.1.1	Messung der Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in der Primärkultur	32
3.14.1.2	Messung der Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in der Restimulation.....	32
3.14.2	Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie	33
3.14.2.1	Messung der Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in der Primärkultur	33
3.14.2.2	Messung der Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen nach Restimulation.....	34
3.15	Zytokinanalyse durch ELISA-Messung	34
3.16	Versuchsablauf.....	37
3.16.1	Analyse der T-Zellantwort von Allergikern und Nichtallergikern mittels ³ H-Thymidinassay	37
3.16.2	Analyse der T-Zellantwort von Allergikern mittels Durchflusszytometrie	38
3.17	Statistische Auswertung.....	40
4.	Ergebnisse	41
4.1	Probandencharakterisierung.....	41
4.2	Einfluss der Allergene auf dendritische Zellen	45
4.3	Analyse der IgE-Kreuzreaktivität.....	47
4.3.1	IgE-Korrelation	47
4.3.2	IgE-Inhibition	48
4.4	Analyse der T-Zellantwort mittels ³ H-Thymidinassay	50
4.4.1	T-Zellproliferation in der Primärkultur.....	51
4.4.2	Zytokine in der Primärkultur.....	53
4.4.3	T-Zellproliferation nach identischer und homologer Restimulation.....	56
4.5	Analyse der T-Zellantwort mittels Durchflusszytometrie	60
4.5.1	Einfluss der Proliferationsfarbstoffe auf die Eigenschaften von T-Zellen.....	61

4.5.2	T-Zellproliferation in der Primärkultur.....	63
4.5.3	T-Zellproliferation nach identischer und homologer Restimulation.....	65
4.5.3.1	Restimulation von primär Bet v 1-spezifischen T-Zellen	66
4.5.3.2	Restimulation von primär Cor a 1-spezifischen T-Zellen.....	69
5.	Diskussion	72
5.1	Allergeneinfluss auf dendritische Zellen.....	72
5.2	Zytokinanalyse.....	73
5.3	Kreuzreaktivitäten.....	76
5.3.1	IgE-Kreuzreaktivität	77
5.3.2	T-Zellkreuzreaktivität	79
6.	Zusammenfassung	85
7.	Literatur	87
	Lebenslauf	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1	Probandencharakterisierung.	43
-------------	----------------------------------	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Mechanismus der Typ I Allergie.	8
Abbildung 3.1	Versuchsablauf der T-Zellanalyse mittels ^3H -Thymidinassay.....	38
Abbildung 3.2	Versuchsablauf der T-Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie	39
Abbildung 4.1	Spezifisches IgE von Allergikern gegen Birkenpollen, Haselnüsse und Karotten.	43
Abbildung 4.2	Einfluss der Allergene auf reife dendritische Zellen.	46
Abbildung 4.3	IgE-Korrelation.	48
Abbildung 4.4	IgE-Inhibition.	50
Abbildung 4.5	T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach primärer Stimulation.	52
Abbildung 4.6	Individuelle T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach primärer Stimulation.	53
Abbildung 4.7	Zytokinseznierung nach primärer T-Zellstimulation.	55
Abbildung 4.8	Zytokinverhältnis IL-5/IFN- γ	56
Abbildung 4.9	T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach Restimulation.....	58
Abbildung 4.10	Individuelle T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach Restimulation. ...	60
Abbildung 4.11	Einfluss der CellTrace Violet/CFSE-Doppelfärbung auf T-Zellen.	63
Abbildung 4.12	T-Zellproliferation (Durchflusszytometrie) nach primärer Stimulation.	65
Abbildung 4.13	Proliferation (Durchflusszytometrie) von Bet v 1-spezifischen T-Zellen nach Restimulation.....	68
Abbildung 4.14	Restimulation (Durchflusszytometrie) von Cor a 1-spezifischen T-Zellen.....	71

Abkürzungsverzeichnis

A	Probandennummer eines Allergikers
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cell / Antigenpräsentierende Zelle
Api g 1	Hauptallergen des Sellerie (<i>Apium graveolens</i>)
Aqua dest.	Aqua destillata / destilliertes Wasser
Ara h 8	Hauptallergen der Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>)
B7.1	kostimulierendes Molekül der B7-Familie
B7.2	kostimulierendes Molekül der B7-Familie
BC	B-Zelle / B cell
BCA	Bicinchoninic Acid / Bicinchoninsäure
Bet v 1	Hauptallergen der Birkenpolle (<i>Betula verrucosa</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAP	Carrier-Polymer-System
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	Cluster of Differentiation / Nomenklatur für Oberflächenmoleküle
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CFSE	Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester
µCi	Mikrocurie
Cor a 1	Hauptallergen der Haselnuss (<i>Corylus avellana</i>)
CpA	Capture-Antikörper
cpm	Counts Per Minute / Radioaktiver Zerfall pro Minute
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4
cys-LT	Cysteinyl-Leukotriene
d	Day / Tag
DA	Detektionsantikörper
Dau c 1	Hauptallergen der Karotte (<i>Daucus carota</i>)
DC	Dendritic Cell / Dendritische Zelle
Der p 1	Hauptallergen der Hausstaubmilbe (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid / Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii / und andere
EU	Endotoxin Unit
FACS	Fluorescence-Activated Cell-Sorting / Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FOXP3	Forkhead-Box P3
FSC	Forward Scattered Light
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

Gly m 4	Hauptallergen des Soja (<i>Glycine max</i>)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HLA	Human Leukocyte Antigen / menschliches Leukozytenantigen
HRP	Horseradish Peroxidase / Meerrettichperoxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
K	Kontrollspender
kDa	Kilodalton
Ktr.	Kontrolle
kU _A /l	Maßeinheit für IgE
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotrien B ₄
m	männlich
MACS	Magnetic Cell Sorter / magnetische Zellsortierung
Mal d 1	Hauptallergen des Apfels (<i>Malus domestica</i>)
MHC	Major Histocompatibility Complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
n	Anzahl der Versuche
n.a.	not available / nicht verfügbar
n.d.	not detected / nicht detektiert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen
OAS	Orales Allergiesyndrom
OVA	Ovalbumin
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern / pathogenassoziierte molekulare Muster
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells / peripheren mononukleären Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	R-Phycoerythrin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	Potentia Hydrogenii/ negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PK	Primärkultur
PR-10	Pathogenesis-related Protein-Family-10

Pru ar 1	Hauptallergen der Aprikose (<i>Prunus armeniaca</i>)
Pru av 1	Hauptallergen der Kirsche (<i>Prunus avium</i>)
p-Wert	Statistik für Signifikanz / Nichtsignifikanz
Pyr a 1	Hauptallergen der Birne (<i>Pyrus communis</i>)
RS	Restimulation
SCIT	Subcutaneous Immunotherapy / subkutane Immuntherapie
SEM	Standard Error of the Mean / Standardfehler
SI	Simulationsindex
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	Sublingual Immunotherapy / sublinguale Immuntherapie
SSC	Side Scattered Light
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription/ Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription
Tab.	Tabelle
T-bet	T-box expressed in T cells/T-box exprimiert in T-Zellen
TCC	T Cell Clone / T-Zellklon
TCL	T Cell Line / T-Zelllinie
TCR	T-Cell Receptor / T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor / transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Th	T-Helferzelle
T _R 1-Zellen	Regulatorische T-Zelle vom Typ 1
Treg	Allgemeiner Begriff einer regulatorischen T-Zelle
U	Unit
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A/vaskulärer Endothelwachstumsfaktor A
vgl.	vergleiche
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
³ H-Thymidin	Tritium markiertes Thymidin
7-AAD	7-Aminoactinomycin

1. Einleitung

1.1 Die Allergie

Das Wort Allergie wurde 1906 zum ersten Mal von Baron von Pirquet verwendet^{1,2} und beschreibt eine Immunantwort, die durch ein ansonsten harmloses Antigen ausgelöst wird³.

Allergische Reaktionen, auch Hypersensibilitätsreaktionen genannt, sind nach Coombs und Gell in vier unterschiedliche Typen eingeteilt und unterscheiden sich bezüglich der beteiligten Komponenten, wie z.B. Antigene, Antikörperklassen und Effektormechanismen^{1,3}.

Die wohl prominenteste Form der Allergie ist die Typ I-Allergie, auch Soforttyp-Allergie genannt. Diese wird durch Immunglobulin (Ig) E vermittelt und T-Helferzellen (Th) 2 sind ebenso an dieser Immunantwort beteiligt. Dabei werden Mastzellen durch lösliche Antigene aktiviert. Dieser Allergietyp ist die Ursache für allergische Rhinoconjunctivitis, allergisches Asthma oder das atopische Ekzem^{1,3}. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit diesem Allergietyp, daher soll dieser noch im Detail beschrieben werden (siehe 1.2).

Ein anderer Antikörper, nämlich IgG, ist an der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ II beteiligt. Er bindet an zell- oder matrixassoziierte Antigene. Der so gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird entweder durch das Komplementsystem oder Fc-Rezeptor-positive phagozytotische Zellen erkannt und beseitigt. Ausgelöst wird diese Form der Allergie durch Medikamente, wie z.B. Penicillin^{1,3}.

Ebenfalls durch IgG vermittelt wird die Allergie vom Typ III, die durch unterschiedliche lösliche Antigene verursacht wird. Beispiele dafür sind zum einen die Arthus-Reaktion und zum anderen die Serumkrankheit. Letztere wird durch die Gabe von Fremdserum ausgelöst. Hierbei bilden Antigene mit IgG Immunkomplexe in Geweben oder Gefäßwänden, die dann u.a. an den Fc γ RIII-Rezeptor auf z.B. Mastzellen binden, die dadurch degranulieren. Ebenso findet eine Aktivierung des Komplementsystems statt. So kommt es zu einer Entzündungsreaktion und das Gewebe wird geschädigt. Auch die wiederholte respiratorische Exposition von Heustaub oder Pilzsporen führt zu dieser Form der Allergie. Die Typ III-Allergie tritt in der Regel verzögert erst nach sieben bis zehn Tagen auf³.

Von den drei bisher beschriebenen Allergietypen grenzt sich deutlich die Hypersensibilitätsreaktion vom Typ IV, auch Spättyp-Allergie genannt, deutlich ab. Diese

wird nicht durch Antikörper, sondern durch antigenspezifische Effektor-T-Zellen, wie Th1-, Th2- oder zytotoxische T-Zellen, vermittelt. Die wohl bekannteste Form der Typ IV-Allergie ist die allergische Kontaktdermatitis. Sie wird durch sehr kleine Moleküle, sogenannte Haptene, verursacht, die leicht in die Haut eindringen können. Dort bilden sie mit Proteinen der Haut Hapten-Protein-Komplexe, die zusammen mit dem von antigenpräsentierenden Zellen exprimierten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl. major histocompatibility complex)-Molekül Tc1-Zellen präsentiert werden. In der Effektorphase werden durch die hier aktivierten Tc1-Zellen Zytokine wie Interferon (IFN)- γ oder Tumornekrosefaktor (TNF)- α sezerniert, wodurch wiederum Makrophagen aktiviert werden und die Entzündungsreaktion verstärkt wird⁹.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat die Verbreitung von IgE-vermittelten Typ I-Allergien und Asthma in den westlichen Industrieländern stetig zugenommen. Dort sind bis zu 20 - 25 % der Bevölkerung betroffen. Mittlerweile ist sogar eine globale Tendenz zu erkennen⁴⁻⁸.

Die IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion stellt so ein großes Gesundheitsproblem dar und hat einen negativen Einfluss auf viele Bereiche des täglichen Lebens^{4,5}.

Die Gründe für die zunehmende Prävalenz und Ausprägung von allergischen Erkrankungen sind nicht gänzlich klar⁸. Jedoch gibt es unterschiedliche Hypothesen, die einen Erklärungsversuch wagen. Die wohl populärste Hypothese ist die Hygienehypothese. Sie versucht die Verbindung zwischen einem westlichen Lebensstil und der zunehmenden Verbreitung und Schwere von atopischen Erkrankungen zu erklären. Die immunologischen Mechanismen, die ihr zugrunde liegen, sind jedoch weiterhin umstritten⁹. Eine besondere Rolle scheint dabei der verringerte Kontakt zu Mikroorganismen in früher Kindheit zu spielen^{4,6,9}, verursacht durch eine verringerte Größe von Familien, einen höheren Standard der persönlichen Reinlichkeit, ein verbessertes Gesundheitssystem, sowie Impfprogramme und ein damit einhergehendes verringertes Infektionsrisiko^{6,8}. Ein Versuch den Mechanismus einer dadurch gesteigerten Th2-Antwort zu erklären, ist die nicht stattfindende Verschiebung der Immunantwort von einem Th2- zu einem Th1-Profil^{6,8,9}. In früher Kindheit besitzt das menschliche Immunsystem einen ausgeprägten Th2-Phänotyp^{6,10}. Innerhalb der ersten zwei Lebensjahre nimmt diese Tendenz graduell ab und eine Th1-/Th2-Balance stellt sich ein, was bei Atopikern jedoch vermutlich nicht geschieht. Ein ausgeprägtes Th2-Profil bleibt ihnen erhalten^{6,8}.

Einem ausgeglichenen Immunsystem liegt folgender Mechanismus zugrunde: Antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. dendritische Zellen (DC), exprimieren

mustererkennende Rezeptoren, z.B. die Toll-like Rezeptoren (TLR). Sie sind die Sensoren des angeborenen Immunsystems und interagieren mit Komponenten von Mikroorganismen, den sogenannten pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs, engl. pathogen-associated molecular patterns). Dies können z.B. Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien oder CpG-beinhaltende Oligodesoxynukleotide sein^{4,6,9,10}. Findet eine Stimulation der TLR durch PAMPs statt, so werden diverse Zytokine wie TNF- α , IFN- α und γ , Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10 und IL-12 produziert. Die Produktion von IL-12 führt zu einer Polarisierung der naiven T-Zellen zu Th1-Effektorzellen. Dabei interagiert IL-12 mit dem IL-12-Rezeptor, was zu einer Aktivierung von STAT-4 (engl. signal transducer and activator of transcription) führt. Darauf folgt wiederum die Aktivierung eines anderen Transkriptionsfaktors, nämlich T-bet (engl. T-box expressed in T cells). Dieser bindet an den Promotor des IFN- γ Gens und induziert die Produktion dieses Zytokins⁹. Findet nun aber ein verringerter Kontakt zu Mikroorganismen und somit zu PAMPs statt, die eine Th1-Immunantwort auslösen, so stellt sich kein Th1-/Th2-Gleichgewicht ein, sondern der Th2-Phänotyp bleibt bestehen und somit auch die Begünstigung von allergischen Erkrankungen^{4,6,8,9}.

Ein alternativer Versuch den immunologischen Mechanismus der Hygienehypothese zu erklären, ist die verringerte Aktivität von regulatorischen T-Zellen (Treg) und einer damit verbundenen reduzierten Immunsuppression^{6,9}. Treg exprimieren selektiv diverse TLRs und können durch die Produktion von Zytokinen wie IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor- β (engl. transforming growth factor- β , TGF- β) sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Antwort supprimieren. Es gibt Hinweise darauf, dass die Interaktion mit LPS die suppressive Kapazität von Treg erhöht. Ist der Kontakt zu Mikroorganismen reduziert, so ist es auch die Immunsuppression. Dennoch ist der genaue Zusammenhang zwischen mikrobieller Stimulation von TLRs und Treg, sowie deren Funktion bei der Regulation einer allergenspezifischen Th2-Antwort nicht genau geklärt und kontrovers⁶.

Nicht nur die Beteiligung von Mikroorganismen, sondern auch die genetische Prädisposition eines Individuums spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Typ I-Allergien und Asthma. Leiden beide Elternteile an Asthma, so ist auch das Kind zu 70 % von der atopischen Erkrankung betroffen. Verschiedene Studien fanden heraus, dass mehr als ein Dutzend Regionen im Genom im Zusammenhang mit Asthma oder einem erhöhten IgE-Spiegel stehen, z.B. der Locus für die Th2-Zytokine auf Chromosom 5q31⁴.

Genpolymorphismen sind auch bei der Entwicklung des allergischen Asthmas involviert, insbesondere der Polymorphismus des Zelloberflächenmoleküls CD (engl. cluster of differentiation) 14. Dieses ist maßgeblich an der Erkennung von LPS in Verbindung mit

TLR-4 beteiligt. Kommt es zu einer Veränderung des Gens, resultieren funktionelle Veränderungen in seiner Expression^{4,11}.

Neben dem Kontakt zu Mikroorganismen und der genetischen Prädisposition stehen möglicherweise auch Veränderungen in der Ernährung im Zusammenhang mit der zunehmenden Prävalenz allergischer Erkrankungen⁵. Somit ist die Entstehung von Typ I-Allergien und Asthma multifaktoriell bedingt.

1.2 Der Mechanismus der Typ I-Allergie

Die Typ I-Allergie ist durch eine IgE-vermittelte Immunantwort unter der Beteiligung von Th2-Zellen, die allergenspezifische Antigene erkennen, charakterisiert^{7,12}. Symptome treten bereits innerhalb von Sekunden oder Minuten^{3,7} nach Allergenkontakt auf und zeigen sich z.B. in Form einer Rhinoconjunctivitis oder Sinusitis, eines allergischen Asthmas oder im schlimmsten Fall als systemische Anaphylaxie^{7,12,13}. Die Soforttyp-Allergie wird durch ansonsten harmlose Substanzen aus der Umwelt ausgelöst^{7,12}, wobei z.B. Gräser- und Baumpollen, Tierhaare, Partikel von Hausstaubmilbenkot, diverse Nahrungsmittel, manche Medikamente und Insektengift als Allergenquelle dienen⁷.

Des Weiteren lassen sich bei ihr unterschiedliche Phasen des Allergieverlaufes erkennen: Die Sensibilisierungsphase, die Sofortreaktion, gefolgt von der allergischen Spätreaktion^{7,13,14}.

In der Sensibilisierungsphase (Abb. 1.1) findet der allererste Kontakt mit dem betreffenden Allergen statt¹⁴. Dabei kann es von unreifen DC im Atemwegslumen oder im Gewebe aufgenommen werden. In das Gewebe gelangt das Allergen entweder durch zerstörte Epithelzellen, oder es besitzt selbst eine Proteaseaktivität (z.B. Der p 1, Hausstaubmilbenallergen), und kann so die Barrierefunktion des Epithels reduzieren^{7,13}. Nach Allergenkontakt reifen die nun aktivierten DC aus und migrieren zu den regionalen Lymphknoten oder zu Stellen in der umliegenden lokalen Mukosa. Dort präsentieren sie Peptide des prozessierten Antigens über den MHC II-Komplex naiven T-Zellen^{7,13}. In Gegenwart von „frühem IL-4“, das potenziell von diversen Zellen wie Basophilen, Mastzellen, Eosinophilen oder T-Zellen sezerniert werden kann, differenzieren die naiven T-Zellen zu Th2-Zellen. Dieser Prozess wird durch die Interaktion der Transmembranmoleküle Notch und Jagged unterstützt. Die Bindung des Liganden Jagged, der sich auf der Oberfläche von DC befindet, bindet an den Rezeptor Notch auf T-Zellen und trägt zur Th2-Differenzierung bei^{7,13,15,16}. Durch die Sezernierung von IL-4 und IL-13 durch diese Th2-Zellen, sowie die Bindung von kostimulatorischen Molekülen

der T-Zellen mit deren Liganden auf den B-Zellen (CD40 und CD40 Ligand; CD80 oder CD86 mit CD28) wird in den B-Zellen der Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu IgE und damit die allergenspezifische IgE-Produktion induziert^{7,12,13}. Neben den Th2-Zellen tragen auch Basophile und Mastzellen durch die Sezernierung von IL-4 und/oder IL-13 und mittels CD40 vermittelter Signale zu diesem Prozess bei^{7,17}. Das lokal freigesetzte IgE geht erst in die lymphatischen Gefäße über und verteilt sich dann letztendlich systemisch durch das Blut. Trifft es im Gewebe auf Mastzellen, so bindet es dort an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI. Diese Mastzellen sind nun für einen erneuten Kontakt mit dem betreffenden Allergen sensibilisiert⁷. Auch Basophile exprimieren den FcεRI-Rezeptor auf ihrer Oberflächen und können dort IgE binden^{13,17}. Während der Sensibilisierungsphase treten keinerlei klinische Symptome auf^{7,14}. Sie kann ca. acht bis 15 Tage andauern¹⁴.

Kommt es nach der Sensibilisierung zum erneuten Kontakt mit dem jeweiligen Allergen, so wird nach nur wenigen Sekunden oder Minuten eine Sofortreaktion (Abb. 1.1) ausgelöst^{7,12-14}. Dabei kreuzvernetzt ein bi- oder multivalentes Allergen die miteinander benachbarten IgE-Moleküle, die an dem hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf den Mastzellen gebunden sind^{7,12,13}. So kommt es zur Aggregation von zwei oder mehreren FcεRI-Molekülen und ein komplexer Signalweg, der für die Degranulation der Mastzellen verantwortlich ist, wird ausgelöst^{7,13,17}. Bei der Degranulation der Mastzellen werden drei unterschiedliche Arten von biologisch aktiven Produkten freigesetzt^{7,13,17}. Das sind zum einen Mediatoren, die bereits vorgefertigt in den Granula vorliegen. Dazu gehören Histamin, Serotonin, Proteasen wie Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase und Proteoglycane wie Heparin und Chondroitinsulfat. Außerdem kommt es bei der Degranulation zur Ausschüttung von neu geformten Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene (v.a. Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Leukotrien B₄ (LTB₄)). Auch die Cysteinyl-Leukotriene (cys-LTs) LTC₄, LTD₄ und LTE₄ sind vertreten. Als letzte Gruppe werden neu synthetisierte Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und auch andere Produkte freigesetzt, z.B. TNF-α, IL-8, CCL2 (CC-Chemokin-Ligand 2), VEGFA (engl. vascular endothelial growth factor A, vaskulärer Endothelwachstumsfaktor A) und der Plättchenaktivierende Faktor (PAF)^{7,13,14,17}.

Die Ausschüttung des Granulainhaltes verursacht die Symptome, die innerhalb kürzester Zeit nach erneutem Allergenkontakt auftreten⁷. Es kommt zur Vasodilatation (verursacht durch Histamine, PGD₂, cys-LTs und PAF), welcher z.B. die Rötung der Haut oder der Augen zuzuschreiben ist. Auch wird die vaskuläre Permeabilität erhöht (verursacht durch Histamine, cys-LTs und VEGFA), die zu Schwellungen, aber auch zur Tränenbildung

führt. Hinzu kommt die Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchien (verursacht durch Tryptase, PGD_2 , cys-LTs, und $\text{TNF-}\alpha$), die eine Verschlechterung und Einschränkung der Atmung zur Folge hat. Zusätzlich wird die Atmung durch eine gesteigerte Mukusproduktion in den Atemwegen (verursacht durch IL-13, Histamin, $\text{TNF-}\alpha$, Tryptase) erschwert und die Nase beginnt zu laufen. Die freigesetzten Mediatoren sind auch in der Lage, die Nozizeptoren von sensorischen Nerven zu stimulieren. Geschieht dies in der Nase, der Haut oder den Atemwegen, werden unangenehme Symptome wie Niesen, Juckreiz und Husten ausgelöst. Werden die Mediatoren nicht nur lokal sondern systemisch ausgeschüttet, so führt dies zur Anaphylaxie, die im schlimmsten Falle tödlich endet^{7,13,18}.

Zwei bis sechs Stunden nach Allergenkontakt erfolgt die allergische Spätreaktion (Abb. 1.1), die durch die Beteiligung von Zellen sowohl des angeborenen (Neutrophile, Eosinophile, Basophile), als auch des adaptiven Immunsystems geprägt ist. Sie werden entweder aus der Peripherie rekrutiert oder die Immunreaktion erfolgt durch Zellen, die bereits im umliegenden Gewebe residieren. Bei der Einleitung der Spätreaktion spielen außerdem im Gewebe residierende Mastzellen eine wichtige Rolle, die an der Sofortreaktion beteiligt sind. Durch die Ausschüttung von $\text{TNF-}\alpha$, LTB_4 , IL-8 und CCL-2 werden die oben genannten Immunzellen zum Ort des Allergenkontakts rekrutiert. Auch zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems tragen diese Mastzellen bei. Dies geschieht durch die Freisetzung von diversen Zytokinen (z.B. IL-3, IL-8, $\text{TNF-}\alpha$)^{7,13}. Eine andere Quelle von Entzündungsmediatoren sind Th2-T-Zellen, die entweder im betroffenen Gewebe residieren, oder ebenfalls durch die Mastzellen rekrutiert werden. Sie sind an der Induktion der Spätreaktion durch die Sezernierung von Zytokinen wie IL-3, IL5, IL-9 und IL-13 maßgeblich beteiligt⁷. Sechs bis neun Stunden nach Allergenkontakt erreicht die Spätreaktion ihren Höhepunkt. Dabei treten Ödeme, Schmerzen und Rötungen auf, wenn die Haut betroffen ist. Bei einer Spätreaktion in der Lunge kommt es zu erneuter Atemwegsverengung und einer stark gesteigerten Mukusproduktion. Nach ein bis zwei Tagen sind diese Symptome wieder vollständig abgeklungen⁷.

Kommt es zu häufig wiederholtem oder gar dauerhaftem Allergenkontakt, dann bleibt die Entzündungsreaktion bestehen und wird chronisch. Eine Vielzahl von Zellen ist daran beteiligt, die im betroffenen Gewebe residieren (Granulozyten, Th2-Zellen, B-Zellen). Hinzu kommt, dass zu der Stelle des Allergenkontakts noch mehr Mastzellen rekrutiert werden, die große Mengen IgE an den $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Molekülen binden können. Außerdem werden von Th2-Zellen vermehrt Zytokine produziert (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), die zu einer persistierenden Inflammation beitragen^{7,13}. Eine chronische allergische

Entzündungsreaktion wie z.B. chronisches Asthma geht oft mit Veränderungen im Gewebe und somit auch der Funktion der betroffenen Organe einher^{7,13}.

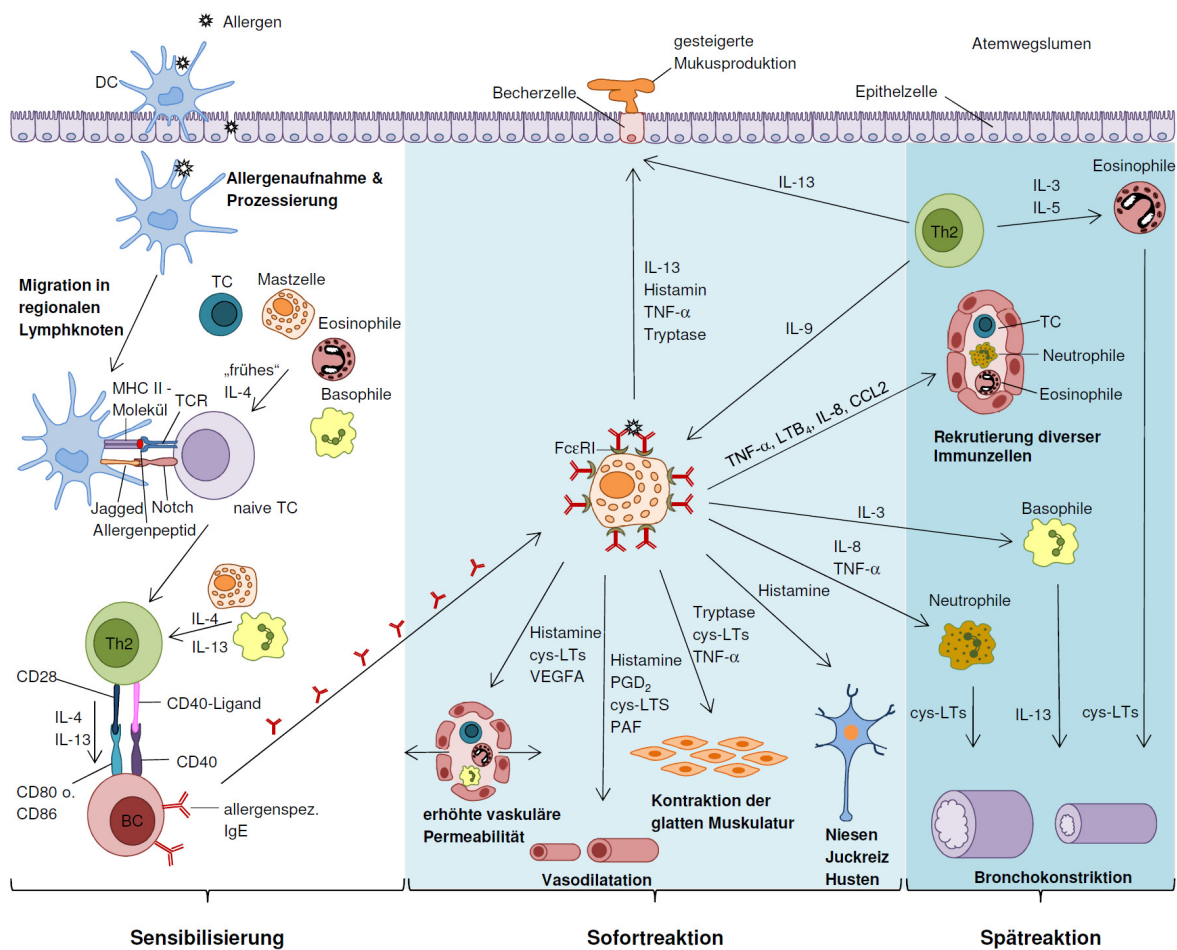


Abbildung 1.1 Mechanismus der Typ I Allergie.

In der **Sensibilisierungsphase** (weißblauer Hintergrund) wird das Allergen von unreifen DC im Atemwegslumen oder im Gewebe aufgenommen und prozessiert. Die aktivierten DC reifen und migrieren zu den regionalen Lymphknoten, wo sie das prozessierte Allergenpeptid mittels MHC II-Molekül naiven TC präsentieren. In Anwesenheit von „frühem“ IL-4, das von TC, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen sezerniert werden kann, differenzieren die naive TC zu Th2-Zellen. Durch die Interaktion des Notch-Rezeptors (auf TC) und des Jagged-Liganden (auf DC) wird dieser Prozess unterstützt. Durch die Sezernierung von IL-4 und IL-13 der Th2-Zellen, sowie der Interaktion von kostimulatorischen Molekülen (CD40 mit CD40-Ligand; CD80 o. CD86 mit CD28) durchläuft die BC einen Immunglobulinklassenwechsel zu IgE. Basophile und Mastzellen sind an dem Prozess durch die Sezernierung von IL-4 und/oder IL-13 beteiligt. Trifft das IgE im Gewebe auf Mastzellen, bindet es an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI und sensibilisiert so die Mastzelle. Bei erneutem Allergenkontakt wird durch die Aggregation der einzelnen IgE-Moleküle eine allergische **Sofortreaktion** (hellblauer Hintergrund) ausgelöst. Vorgefertigte Mediatoren (Histamine, Tryptase), neu geformte Lipidmediatoren (PGD₂, LTB₄, cysLTs) und neu synthetisierte Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (TNF-α, IL-8, CCL2, VEGFA, PFA) werden bei der Degranulation der Mastzellen ausgeschüttet und verursachen eine erhöhte Mukusproduktion, eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität, Vasodilatation, Kontraktion der glatten Muskulatur und eine Stimulation der Nozizeptoren von sensorischen Nerven. Im Übergang zur **Spätreaktion** (dunkelblauer Hintergrund) fördern die Mastzellen durch die Ausschüttung von diversen Mediatoren (TNF-α, LTB₄, IL-8, CCL2) die Rekrutierung von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Die Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems erfolgt daraufhin durch Zytokine (IL-3, IL-5, IL-8, TNF-α), die durch Mastzellen bzw. Th2-Zellen sezerniert werden. Neutrophile, Eosinophile und Basophile setzen Entzündungsmediatoren (cysLTs, IL-13) frei, die im weiteren Verlauf z.B. zu einer Kontraktion der Bronchien führen. Maßgeblich sind auch Th2-Zellen an der Spätreaktion beteiligt. Durch die Sezernierung von IL-13 führen sie zu einer gesteigerten Mukusproduktion. BC = B-Zelle; TC = T-Zelle; Th2 = T Helferzelle 2; (Abbildung modifiziert nach Galli⁷ und Bischoff¹⁸.)

1.3 Die Nahrungsmittelallergie

Eine Nahrungsmittelallergie gehört zu der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I. Eine allergische Reaktion tritt kurz nach Verzehr des allergieauslösenden Nahrungsmittels auf¹⁹. Betroffen sind Menschen aller Altersgruppen²⁰, davon gehören ca. 1-4 % der erwachsenen Bevölkerung an und ca. 1-8 % sind Kinder^{21,22}.

Die bis heute einzige sichere Methode eine allergische Reaktion gegen Nahrungsmittelallergene zu verhindern, ist die Vermeidung des jeweiligen Nahrungsmittels²⁰. Dies kann allerdings die Lebensqualität des betroffenen Allergikers stark negativ beeinflussen, da die Vermeidung mit der strikten Einhaltung einer bestimmten Diät verbunden sein kann²⁰. Problematisch ist hierbei auch die klare Kennzeichnung der Inhaltsstoffe von Lebensmitteln^{20,23}. Erschwerend kommt hinzu, dass durch den Herstellungsprozess Lebensmittel mit Allergenen kontaminiert werden können, die normalerweise nicht darin vorkommen sollten^{20,23}.

Grundsätzlich können zwei Formen der IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergie unterschieden werden, einmal die primäre, oder auch „wahre“ Nahrungsmittelallergie und die sekundäre Nahrungsmittelallergie^{19,20,24}.

Die primäre Nahrungsmittelallergie betrifft hauptsächlich Kleinkinder¹⁹ und entsteht durch die direkte Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Nahrungsmittel²⁰. Hauptsächlich sind hier Proteine von Nahrungsmitteln wie Kuhmilch, Hühnereiweiß, Erdnüsse, Soja, Fisch und Getreide Verursacher von allergischen Reaktionen^{19,21,25}. Allerdings kann sich diese Allergie während des Heranwachsens abschwächen, oder sogar ganz abklingen^{19,21,25}.

Von der sekundären Nahrungsmittelallergie sind zumeist Jugendliche und Erwachsene betroffen. Sie ist die häufigste Form der Nahrungsmittelallergie in Europa^{24,26}. Die sekundäre Nahrungsmittelallergie entsteht durch die primäre Sensibilisierung gegen ein respiratorisches Allergen (Pollenallergen)^{19,20,24,27}, z.B. gegen Birke, Gräser, Beifuß oder Ambrosia^{19,26,28}, und wird deshalb auch pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie genannt. Dabei enthält das Nahrungsmittel Proteinstrukturen, die homolog zu dem Pollenallergen sind und dadurch mit spezifischem IgE kreuzreagieren, das bei der Sensibilisierung gegen das Pollenallergen entstanden ist^{19,26,28} (siehe 1.4). Sehr häufig entstehen dabei Kreuzallergien zu Nahrungsmitteln wie Früchten aus der Familie der Rosaceengewächse (z.B. Äpfel, Kirschen), unterschiedlichen Gemüsesorten (z.B. Karotten, Sellerie) und Nüssen (z.B. Haselnüsse)^{26,28}.

Die Allergiker, die von einer Nahrungsmittelallergie betroffen sind, leiden kurz nach Kontakt mit dem entsprechenden Nahrungsmittel an Symptomen, die sich hauptsächlich

auf den Bereich des Mundes beschränken, und daher auch unter dem Begriff „orales Allergiesyndrom“ (OAS) zusammengefasst werden^{19,24,26,28-30}. Die Symptome reichen von mildem Juckreiz, Rötung und Anschwellen der Lippen, des Mundes und des Rachens, bis hin zu schweren Angioödemem der pharyngealen Mukosa. Je nach Schwere der Hypersensibilität können auch systemische Reaktionen wie Urticaria oder ein anaphylaktischer Schock auftreten, letzterer kann lebensbedrohlich werden^{26,28,30}. Auch kann der Verzehr von betroffenen Nahrungsmitteln zu Erbrechen oder Durchfall führen. Dies tritt jedoch nur in seltenen Fällen auf, da die Nahrungsmittelallergene oft hitzelabil sind und schon beim Kochen zerstört werden oder im Gastrointestinaltrakt schnell degradiert werden²⁶.

Bei einer Nahrungsmittelallergie sind Symptome nicht auf eine bestimmte Jahreszeit begrenzt wie bei einer Pollenallergie. Jedoch können die Symptome einer pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie während der Pollensaison sehr viel ausgeprägter sein als außerhalb der Saison²⁸.

1.4 Die Grundlagen der Kreuzallergie

Wie bereits in 1.3 beschrieben, können Pollenallergiker zusätzlich eine Nahrungsmittelallergie entwickeln^{24,27,31-36}. Dieses Phänomen wurde zum ersten Mal im Jahre 1942 von Tuft und Blumenstein beschrieben^{37,38}. Die Ursache solch einer pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie ist in der Kreuzreaktivität zwischen einem Pollen- und einem Nahrungsmittelallergen begründet^{24,28,33,39}. Dabei tritt eine Kreuzreaktivität, die sowohl auf B-Zell- also auch auf T-Zellebene existiert^{24,27,34,38} dann auf, wenn ein einzelner Antikörper, bzw. T-Zellrezeptor (TCR, engl. T cell receptor) gegen ein bestimmtes Allergen existiert, der jedoch zusätzlich auf ein ähnliches, strukturell verwandtes Allergen reagiert^{28,38,40}.

Die B-Zellkreuzreaktivität ist IgE-vermittelt und basiert auf der Tertiärstruktur und somit auf der Konformation eines Proteins. So ist die Ähnlichkeit der dreidimensionalen Struktur eines Epitops für den IgE-Antikörper von entscheidender Bedeutung^{24,29,41}. Die T-Zellkreuzreaktivität beruht hingegen auf der Ähnlichkeit von wenigen Aminosäuren langen linearen T-Zellepitopen und findet unabhängig von IgE-vermittelten Mechanismen statt^{24,27,34}. Diese Epitope sind im Gegensatz zu Konformationsepitopen in der Lage, eine gastrointestinale Degradation oder das Erhitzen bei der Zubereitung von Mahlzeiten unbeschadet zu überstehen²⁷.

Generell sind strukturelle Gemeinsamkeiten, so genannte Homologien, zwischen Pollenallergenen und Nahrungsmittelallergenen für die Kreuzreaktivität verantwortlich^{35,38,40}. Diese treten z.B. dann auf, wenn die jeweiligen Allergene derselben Proteinfamilie angehören³⁸. Allerdings können auch phylogenetisch entferntere oder nicht verwandte Allergenquellen konservierte homologe Proteine enthalten und zu einer Kreuzallergie führen^{29,35}.

In Mittel- und Zentraleuropa ist das Birkenpollenallergen von Frühling bis hin zum frühen Sommer der Hauptverursacher von allergischer Rhinitis^{31,32,34}. Dabei reagieren mehr als 90% der Birkenpollenallergiker auf Bet v 1, das Hauptallergen der Birke^{24,32,34,41}. Bet v 2, das Birkenprofilin, wirkt hingegen nur bei 10-20% allergieauslösend^{35,39}.

70% der Birkenpollenallergiker entwickeln Hypersensibilitätsreaktionen gegen gewisse Nahrungsmittel, wobei Bet v 1 das relevante sensibilisierende Aeroallergen ist^{24,32,35,37,41}. Insbesondere sind Früchte aus der Familie der Rosacea wie z.B. Äpfel (Mal d 1), Kirschen (Pru av 1), Aprikosen (Pru ar 1), Birnen (Pyr c 1), sowie Gemüsesorten aus der Familie der Apiacea, z.B. Karotten (Dau c 1) und Sellerie (Api g 1) involviert. Des Weiteren sind Haselnüsse (Cor a 1), Soja (Gly m 4) und Erdnüsse (Ara h 8) kreuzreaktiv zum Hauptallergen der Birke^{24,27,29,31,32,34,35,39,42,43}. Zusammenfassen kann man dieses Phänomen unter dem Begriff „birch-fruit-vegetable syndrome“ oder allgemeiner auch unter „pollen-food syndrome“^{24,27,37,38}. Die Kreuzreaktivität und damit verbundene Homologien sind hier durch die Zugehörigkeit der Allergene zu derselben Proteinfamilie begründet, nämlich der „pathogenesis-related protein family-10“ (PR-10)^{24,27-29,32,33,43}. Ursprünglich sind die Proteine der PR-Familie für die Verteidigung der Pflanze verantwortlich und werden durch Stress wie Pathogene, Verletzungen oder Umwelteinflüsse aktiviert^{28,37,43}.

Die Mitglieder der PR-10-Familie teilen einen hohen Anteil ähnlicher und sogar identischer Aminosäuresequenzen^{27,33,38}. Beispiele hierfür sind das Haselnussallergen (Cor a 1), welches 67% identische und 79% ähnliche Aminosäuren zu Bet v 1 aufweist³⁴ und das Karottenallergen (Dau c 1), das weniger als 40% Identität⁴⁴ und 57% Ähnlichkeit³⁴ der Aminosäuresequenz mit Bet v 1 teilt.

Neben dem „birch-fruit-vegetable syndrome“ sind noch weitere Syndrome bekannt, bei denen der Nahrungsmittelallergie eine primäre Sensibilisierung mit einem Pollenallergen vorausgeht. Hierzu gehören beispielsweise das „Beifuß-Sellerie-Gewürz Syndrom“^{29,39}, oder das „Ambrosia-Banane-Melone Syndrom“³⁹.

1.5 Therapiemöglichkeiten

Seit nun mehr als 100 Jahren^{19,45} wird bei allergischen Erkrankungen die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) als Hyposensibilisierungstherapie angewandt und repräsentiert eine potentiell heilende und spezifische Behandlungsmethode^{19,45}. Zwei etablierte Verfahren sind in diesem Rahmen die subkutane (SCIT, engl. subcutaneous immunotherapy) und die sublinguale (SLIT, engl. sublingual immunotherapy) Immuntherapie^{45,46}. Während der Behandlung wird dem Patienten das Allergen, gegen welches er sensibilisiert ist, nach einem standardisierten Protokoll über einen gewissen Zeitraum hinweg in schrittweise steigender Dosierung subkutan bzw. sublingual appliziert^{19,46}. Zu Beginn der Therapie erfolgt die Verabreichung wöchentlich (Aufbauphase), danach nur noch monatlich (Aufrechterhaltungphase)^{12,47}. Es kommt zu frühen Hyposensibilisierungseffekten, sowie zur Modulation der T- und B-Zellantwort. Bei diesen Ereignissen spielt die Generierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und die damit verbundene Etablierung und Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz gegen das betreffende Allergen, die Verschiebung der Th2- zu einer Th1-Antwort und ein Subklassenwechsel zu IgG₄ Schlüsselrollen^{12,45,46,48-50}.

Bei der SCIT, die u.a. bei einer Allergie gegen Bienengift und Graspollen angewandt wird⁴⁵, lassen sich bereits nach der ersten Injektion sehr frühe Desensibilisierungseffekte beobachten^{45,49}. Dazu gehört die Abnahme der Mastzell- und Basophilenaktivität^{45,49}. Der Mechanismus, der hierbei in den ersten Stunden der Behandlung einsetzt, ist nicht vollständig bekannt^{45,49}. Jedoch gibt es Hinweise die darauf schließen lassen, dass Anaphylaxiemediatoren wie Histamine und Leukotriene schrittweise freigesetzt werden, ohne dabei eine systemische Reaktion auszulösen. Somit wird der Inhalt der Granula reduziert und gleichzeitig die Aktivierungsschwelle beider Zelltypen heraufgesetzt^{45,49}.

Auf die sehr frühen Hyposensibilisierungseffekte folgt innerhalb der ersten 70 Tage nach Therapiebeginn die Generierung von allergenspezifischen Treg^{45,46}. Es sind zwei Treg-Subtypen beteiligt: Zum Einen sind es die im Thymus selektierten natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen (nTreg)^{12,45,48,50}. Sie supprimieren die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von u.a. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, sowie B-Zellen und dendritischen Zellen. Dies geschieht u.a. durch zellkontaktabhängige Suppression mit Hilfe von CTLA-4 (engl. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), oder durch die Sezernierung von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF-β^{51,52}. Auf der anderen Seite spielen die aus konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in der Peripherie induzierten T_R1-Zellen (Typ 1 Treg) eine wichtige Rolle^{45,48,50-52}. Sie agieren zellkontaktunabhängig⁵¹ und beeinflussen die Funktionen von

Effektorzellen in der Allergie u.a. über die Freisetzung von supprimierenden Zytokinen. Dabei sezernieren sie im großen Maße IL-10 und in kleinen Mengen TGF- β ^{48,50-52}.

Hinweise für eine früh einsetzende B-Zelltoleranz gibt es hingegen nicht. Zu Beginn der Therapie steigt der Spiegel des serumspezifischen IgE zunächst sogar an und erst relativ spät, nach einem Behandlungszeitraum von ca. sechs Monaten, nimmt er dann graduell über Monate oder Jahre hinweg ab^{45,48,49}. Dieser Prozess korreliert somit nicht mit der Verminderung klinischer Symptome und kann einen frühen Erfolg der Immuntherapie nicht erklären^{45,49}. Jedoch gibt es Hinweise, dass innerhalb der ersten vier Wochen der Hyposensibilisierung ein IgG-dominanter Phänotyp entsteht^{45,49,50}. Insbesondere ist die Subklasse IgG4, aber auch IgG1 beteiligt, welche beide direkt mit dem IgE-Antikörper kompetitieren, da sie dieselben Epitope erkennen^{12,19,45,49}. Man nimmt an, dass der IgG4-Antikörper an das Allergen binden kann und es so abfängt, bevor es das an Effektorzellen gebundene IgE erreichen kann. IgG4 hat somit einen blockierenden Effekt und verhindert auf diese Weise die Aktivierung von Mastzellen und Basophilen^{45,49}. Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass eine erfolgreiche SCIT mit einem 10- bis 100-fachen Anstieg des IgG4-Spiegels bei Patienten einhergeht^{45,49}. Dabei spielt IL-10, das von den generierten Treg sezerniert wird, eine wichtige Rolle. Es ist zum einen ein potenter Suppressor des allergenspezifischen IgE und fördert zugleich die Produktion von IgG4^{45,48-50}. Bisher ist man jedoch nicht in der Lage, den großen zeitlichen Abstand zwischen der Etablierung einer T-Zelltoleranz und der Modulation der B-Zellantwort zu erklären⁴⁵.

Erst durch eine Langzeit-SIT, also nach Monaten der Immuntherapie, werden auch die Symptome, die erst in der späten Phase einer allergischen Reaktion auftreten, reduziert^{45,48,49}.

Ein weiterer Mechanismus, der im Laufe einer erfolgreichen SIT zum Tragen kommt, ist die Verschiebung des allergischen Th2-Phänotyps zu einer Th1-Immunantwort. Dabei kann nach einem längeren Behandlungszeitraum (ca. 12 Monate) eine reduzierte IL-4-Produktion und gleichzeitig eine erhöhte Sezernierung des Th1-Zytokins IFN- γ beobachtet werden^{46,53}.

Auch wenn die SCIT eine effektive Form der Therapie ist, so birgt sie doch ein nicht zu vernachlässigendes Risiko. Durch die Injektion eines Allergens kann es zu unerwünschten anaphylaktischen Nebenwirkungen kommen, die IgE-vermittelt sind^{12,19,49}. Diese treten in unterschiedlich starker Form bei 0,1 bis 5 % der Patienten auf¹². Hauptsächlich sind dabei Allergene, die starke IgE-vermittelte Symptome hervorrufen, involviert (z.B. das Erdnussallergen)¹⁹.

Aus diesem Grund wird neben der SCIT auch die SLIT angewandt, eine Methode, die mehr Sicherheit und weniger schwere Nebenwirkungen mit sich bringt^{45,46,48,49}. Allerdings muss bei dieser Behandlungsform eine höhere Menge des Allergens verabreicht werden¹². Die SLIT wird erfolgreich, z.B. bei einer Gräser-, Birkenpollen- oder Hausstaubmilbenallergie angewandt¹².

Der Mechanismus der SLIT ist weitestgehend identisch mit dem der SCIT, dennoch muss er weiterhin analysiert werden^{46,48,49}. Im Gegensatz zur SCIT scheint TGF- β hier keine Rolle bei der Induktion der T-Zelltoleranz zu spielen, es konnte nur IL-10 als wichtiger supprimierender Faktor detektiert werden^{46,48}.

Die SIT im Allgemeinen konnte bisher gute Erfolge bei der Behandlung von z.B. Pollenallergien aufweisen¹⁹. Da eine pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie durch die Kreuzreaktivität zu einem Pollenallergen verursacht wird (siehe 1.4) liegt die Vermutung nahe, dass eine erfolgreiche Hyposensibilisierung gegen z.B. das Birkenpollenallergen gleichzeitig eine Toleranz gegen das betreffende kreuzreaktive Nahrungsmittelallergen induziert. In einer Studie von Asero et al.⁵⁴ wird nach einer erfolgreichen Hyposensibilisierung gegen das Birkenpollenallergen von einer gleichzeitigen Verminderung der allergischen Symptome nach Apfelkonsum berichtet. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Studien von Bucher et al.⁵⁵ und Bolhaar et al.⁵⁶. Trotzdem sind diese Erfolge kontrovers zu betrachten. Im Gegensatz dazu konnte nämlich in anderen Studien nach einer erfolgreichen Birkenpollen-SIT keine signifikante Verbesserung der Symptome einer Allergie gegen Äpfel festgestellt werden^{46,57,58}. In einer Studie konnte sogar eine Verschlechterung beobachtet werden⁵⁷.

Um die Sicherheit und die Effizienz einer Hyposensibilisierung zu erhöhen, wird ständig nach neuen Therapiemöglichkeiten gesucht¹⁹. Eine Methode das Risiko einer anaphylaktischen Reaktion bei der Injektion des Allergens zu verringern, ist die Herstellung von „hypoallergenen“ Varianten des Allergens mit Hilfe von gentechnologischen Methoden^{12,19}. Die dabei generierten rekombinanten Proteine enthalten nur T-Zellepitope und keine, oder nur wenige IgE-bindende Epitope¹⁹. Ein weiterer Ansatz ist das Herstellen so genannter Allergoide, also chemisch modifizierte Allergene, oder das Verpacken von Allergenen in Nanopartikel¹². Auch das Anhängen von CpG-Oligonukleotidmotiven an ein Allergen kann das Risiko von schweren anaphylaktischen Nebenwirkungen reduzieren und zusätzlich die Effektivität einer SCIT erhöhen¹².

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine umfassende Analyse der T-Zellantwort von Allergikern, die an einer Birkenpollenallergie mit assoziierter Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten leiden. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Pollenallergen Bet v 1.0101 (Hauptallergen der Birke) und den Nahrungsmittelallergenen Cor a 1.0401 (Hauptallergen der Haselnuss) und Dau c 1.0104 (Hauptallergen der Karotte). Untersucht wird eine gut charakterisierte Kohorte von Patienten, von welcher durch intensive Befragung eine umfassende Anamnese erstellt wird. Zur weiteren Charakterisierung werden bei den Probanden Pricktests und die Bestimmung des allergenspezifischen IgE durchgeführt.

Im Mittelpunkt der Arbeit steht die detaillierte Analyse die T-Zellkreuzreaktivität der Spenderkohorte in Bezug auf die ausgewählten Allergene unter der Verwendung von primären T-Zellen mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Analysemethoden.

2. Material

2.1 Laborgeräte

Autoklav	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank	Typ HERAcell 240, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland LSR II, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Software	CellQuest 3.3, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland Diva 6.0, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
ELISA Mikrotiterplatten-Reader	Model 450, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Photometer	Bio-Photometer, Eppendorf, Deutschland
Lichtmikroskop	Dialux, Leitz, Wetzlar, Deutschland
Semiautomatic cell harvester	SKATRONAS, SKATRON, Lier, Norwegen
Sterilbank	HeraSafe, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
β-Szintillationscounter	LKB, Bromma, Schweden
Wasserbad	Julabo TW 12, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Merck, Wiesbaden, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3L-R, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Adapter	Adapter für Luer-Konus mit Membrane, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Feindosierungsspritze	1 ml, BRAUN, Melsungen, Deutschland
Filterpapier	A 102 x 258 mm, Wallac, Turau, Finnland
Glaspipette	10 ml, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kanülen	Einmal-Kanülen, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten	F96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Probeneinschweißfolie	102 x 258 mm, Wallac, Turau, Finnland
Pipettenspitzen	10 µl/200 µl/1000 µl, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Spritzen	20 ml Spritzen, BD Discardit II, Fraga (Huesca), Spanien
Sterilfilter	0,2 µm, Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
Zellkulturplatte	6-well-Zellkulturplatte, Costar, Bodenheim, Deutschland
Zellkulturplatte	12-well-Zellkulturplatte, Costar, Bodenheim, Deutschland
Zellkulturplatte	24-well-Zellkulturplatte, Costar, Bodenheim, Deutschland
Zellkulturplatte	96-well-Zellkulturplatte, Costar, Bodenheim, Deutschland
Zellkulturplatte	96-well-Zellkulturplatte (unsteril), Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 ml/50 ml, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland

2.3 Allgemeine Reagenzien

Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
EDTA	Serva Heidelberg, Deutschland
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll	Lymphozytenseparationsmedium, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HSA 20%	Humanes Serum Albumin, Pharmacia, Erlangen, Deutschland
KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Liquemin N 25000	Hoffmann-LaRoche AG, Grenznach-Whylen, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Szintillationscocktail	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
³ H-Thymidin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland

2.4 Medien

IMDM mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Tasching, Deutschland
RPMI 1640	Lonza, Verviers, Belgien
X-VIVO 20	Lonza, Verviers, Belgien

2.5 Puffer und Lösungen

Antikörper-Verdünnungslösung	1 x PBS-Puffer 0,5 % HSA
1 x PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua dest., pH-Wert 7,2
MACS-Puffer	1 x PBS-Puffer 0,5 % HSA 3 mM EDTA
FACS-Puffer	1 x PBS-Puffer 0,5 % HSA 3 mM EDTA
Trypanblau-Lösung	1 x PBS-Puffer 0,4 % Trypanblau

2.6 Antikörper für durchflusszytometrische Messungen

2.6.1 Primärantikörper, unkonjugiert

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung
anti-CD2	1:50	Maus-anti-Human-IgG1, Klon 6F10.3, Beckman Coulter, Krefold, Deutschland
anti-CD14	1:50	Maus-anti-Human-IgG2a, Klon RMO52, Beckman Coulter, Krefold, Germany
anti-CD19	1:50	Maus-anti-Human-IgG1, Klon J4.119, Beckman Coulter, Krefold, Deutschland
anti-CD80	1:50	Maus-anti-Human-IgG1, Klon MAB104, Beckman Coulter, Krefold, Dutschland
anti-CD83	1:50	Maus-anti-Human-IgG2b, Klon HB15a, Beckman Coulter, Krefold, Deutschland

anti-CD86	1:50	Maus-anti-Human-IgG1, Klon BU63, AbD Serotec, Oxford, UK
anti-HLA-DR	1:10	Ratte-anti-Human-IgG2a, Klon YD1/63.4.10, AbD Serotec, Oxford, UK

2.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung
FITC	1:80	Ziege-anti-Ratte-IgG, BioLegend, San Diego, CA
PE	1:100	Esel-anti-Maus-IgG, Jackson Immunosearch, Bar Harbor; ME

2.6.3 Isotyp-Kontrollantikörper, unkonjugiert

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung
IgG1	1:50	Maus, Klon MOPC-31c, BD Pharmingen, San Diego, CA
IgG2a	1:50	Maus, Klon MOPC-173 BD Pharmingen, San Diego, CA
IgG2b	1:250	Maus, Klon 27-35, BD Pharmingen, San Diego, CA
IgG2a	1:50	Ratte, Klon R35-95, BD Pharmingen, San Diego, CA

2.6.4 Primärantikörper, konjugiert

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung
anti-CD4 FITC	1:30	Maus-anti-Human-IgG1, Klon 13B8.2, Beckman Coulter, Krefold, Deutschland
anti-CD8 FITC	1:30	Maus-anti-Human-IgG1, Klon B9.11, Beckman Coulter, Krefold, Deutschland

2.6.5 Isotyp-Kontrollantikörper, konjugiert

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung
IgG1 FITC	1:30	Maus, Klon 679.1Mc7, Beckman Coulter, Krefold, Deutschland

2.7 Proliferationsfarbstoffe

CellTrace Violet Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.8 Reagenzien zur Zellkultivierung und –anreicherung

2.8.1 Zytokine und Prostaglandin

GM-CSF	Berlex, Seattle, USA
IL-1 β	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-4	Immunttools, Friesoythe, Deutschland
IL-6	Strathmann, Hamburg, Deutschland
TNF- α	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
PGE ₂	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

2.8.2 Rekombinante Allergene

Bet v 1.0101	Konz. 359 $\mu\text{g/ml}$, Endotoxingehalt $\leq 0,0005 \text{ EU}/\mu\text{g}$, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland
Cor a 1.0401	Konz. 430 $\mu\text{g/ml}$, Endotoxingehalt $\leq 0,09 \text{ EU}/\mu\text{g}$, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland
Cor a 1.0401	Konz. 2000 $\mu\text{g/ml}$, Endotoxingehalt $< 0,0001 \text{ EU}/\mu\text{g}$, Blirt, Danzig, Polen
Dau c 1.0104	Konz. 341 $\mu\text{g/ml}$, Endotoxingehalt $\leq 0,06 \text{ EU}/\mu\text{g}$, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland
EndoGrade Ovalbumin	Konz. 1000 $\mu\text{g/ml}$, Endotoxingehalt $< 0,001 \text{ EU}/\mu\text{g}$, Hyglos, Bernried, Deutschland

2.8.3 MicroBeads

CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Glattbach, Deutschland
----------------	--

2.9 Proteinbestimmung

BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology # 23227, Rockford, USA
-----------------------	---

2.10 Zytokinbestimmung

IL-2 ELISA	BD Bioscience, Hiedelberg, Deutschland
IL-4 ELISA	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
IL-5 ELISA	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
IL-9 ELISA	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
IL-10 ELISA	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL-13 ELISA	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
IL-17 ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Straptavidin Poly-HRP	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

3. Methoden

3.1 Heterologe Expression und Aufreinigung der Allergene

Bet v 1.0101 (Gen Bank Acc. No. X15877), Cor a 1.0401 (Gen Bank Acc. No. AF136945) und Dau c 1.0104 (Gen Bank Acc. No. Z81362) werden mit Hilfe der Plasmide pET15b-Betv1, pET15b-Cora1 und pET16b-Dauc1 in *E. coli* überexprimiert. Die Histidin-markierten Proteine werden entweder aus Zelllysaten (Cor a 1, Dau c 1) oder aus Einschlusskörpern (Bet v 1) durch Metallchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt⁵⁹. Die positiven Fraktionen werden mittels SDS-Page und Coomassiefärbung überprüft und anschließend für die Bestimmung des Proteingehaltes (siehe 3.3) zusammengeführt. Enthaltenes Endotoxin wird durch Affinitätschromatographie und der Verwendung von EndoTrapTM Säulen (Hyglos, Regensburg) abgereichert und dessen verbleibender Gehalt mit Hilfe des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL-Tests) (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) (siehe 3.2) bestimmt. Danach werden die Allergene mit einem pyrogenfreien Filter (0,20 µm) sterilfiltriert.

3.2 Bestimmung des Endotoxingehaltes der Allergene

Der Endotoxingehalt der Allergene wird mit Hilfe des sehr sensitiven Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL-Test) bestimmt. Hierbei macht man sich die Koagulation des Lysats aus Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemes* zunutze, die durch Endotoxin ausgelöst wird.

Die Bestimmung des Endotoxingehaltes der Allergene wird durch das Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) mit Hilfe des chromogenen Endosafe®-PTSTM-Systems (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sensitivität des Tests beträgt 0,005 EU/ml.

3.3 Analyse des Proteingehalts der Allergene

Der Proteingehalt der jeweiligen Allergenlösung wird mittels BCA-Proteinbestimmung (BCA = Bicinquinonic Acid; dt. Bicinchoninsäure) ermittelt. Dieses hoch sensitive kolorimetrische Verfahren basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium. Die an dem Protein gebundenen reduzierten Cu^{1+} -Ionen bilden jeweils einen Komplex mit zwei Molekülen Bicinchinonsäure, der von hellblauer bis

violetter Farbe ist. Die Farbintensität ist proportional zur Anzahl der Peptidbindungen, die an der Reaktion teilnehmen. Die Extinktion der Proben wird bei 562 nm mit Hilfe eines Fotometers bestimmt.

Für die Durchführung der Messung benötigt man eine Proteinstandardreihe (0 µg/ml; 5 µg/ml; 25 µg/ml; 50 µg/ml; 125 µg/ml; 250 µg/ml; 500 µg/ml; 750 µg/ml; 1000 µg/ml), die das Protein BSA (Bovines Serum Albumin) enthält. Von jedem Standard werden 50 µl in ein Röhrchen pipettiert, anschließend wird pro Röhrchen 1 ml Gebrauchslösung (= 50 Teile Reagenz A und ein Teil Reagenz B) hinzugegeben. Das Allergen, dessen Proteingehalt jeweils durch eine Doppelbestimmung gemessen wird, wird 1:2 in Tris verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 50 µl in ein Röhrchen vorgelegt und auch hier wird 1 ml Gebrauchslösung hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C werden die Standardreihe und die Allergenproben mit einem Fotometer bei einer Extinktion von 562 nm gemessen und dann ausgewertet.

3.4 Pricktest

Der Pricktest (prick = engl. Stich) wird in der Allergologie standardmäßig zum Nachweis einer Typ I-Allergie verwendet. Dabei wird ein definierter Allergenextrakt, sowie eine Positiv- (Histamin) und Negativkontrolle (Kochsalzlösung) auf die Innenseite des Unterarms aufgetropft. Anschließend wird durch die Tropfen hindurch mit einer Lanzette die Haut oberflächlich angestochen. So kann die jeweilige Substanz in die Haut eindringen. Nach 15 bis 30 Minuten wird die Reaktion auf die aufgetragenen Substanzen anhand der Hautrötung und der Größe der gebildeten Quaddeln beurteilt. Dabei kann die allergische Reaktion mäßig (+), mittel (++), stark (+++) oder sehr stark (++++) ausfallen. Neben der Testung von Allergenextrakten können Nahrungsmittel in ihrer nativen Form getestet werden. Hierzu wird mit einer Lanzette zuerst in das jeweilige Nahrungsmittel und dann in die Haut des Unterarms des zu testenden Allergikers gestochen. Diese Form des Pricktests wird Prick-to-Pricktest genannt.

3.5 Bestimmung von allergenspezifischem IgE

Um die Sensibilisierung gegen die Extrakte, das sind Gemische sämtlicher relevanter Allergenstrukturen, von Birke, Haselnuss und Karotte sowie gegen die rekombinanten Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 nachzuweisen, wird bei dem jeweiligen Atopiker die Konzentration von spezifischem IgE im Blutserum nachgewiesen. Für die Extrakte,

sowie Bet v 1 und Cor a 1 wird das kommerzielle ImmunoCAP™ System (Phadia, Uppsala, Schweden) verwendet. Das spezifische IgE gegen Dau c 1 wird mit Hilfe eines experimentellen ImmunoCAP™ Systems (Phadia) ermittelt. Alle Messungen werden mit einem ImmunoCAP 250 Gerät (Phadia) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die nachgewiesenen IgE-Konzentrationen werden in kU_A/L angegeben und sind in sechs CAP-Klassen unterteilt: $< 0,35 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 0 (negativ); $0,35 - \leq 0,7 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 1; $> 0,7 - \leq 3,5 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 2; $> 3,5 - \leq 17,5 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 3; $> 17,5 - \leq 50 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 4; $> 50 - \leq 100 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 5; $> 100 \text{ kU}_A/\text{L}$ = Klasse 6.

Die Bestimmung des allergenspezifischen IgE wurde im Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

3.6 Quantitative IgE-ELISA-Inhibition

Die IgE-Kreuzreaktivität zwischen den rekombinanten Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 wird durch einen ELISA-Kreuzinhibitionstest bestimmt. Hierfür werden 96-well-Maxisorp Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit dem jeweiligen aufgereinigten Allergen ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet. Es erfolgt die gleichzeitige Inkubation von Probandenserum und dem jeweiligem Inhibitor (1:2 verdünnt). Als Inhibitor fungiert entweder Bet v 1 oder Cor a 1, jeweils in einer Konzentration von $0,0032 \mu\text{g}/\text{ml}$ bis $50 \mu\text{g}/\text{ml}$. Die Auswertung erfolgt mit einem Fotometer bei 450 nm .

Diese Versuchsreihe wurde im Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

3.7 Bedingungen für das Arbeiten mit Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Tätigkeiten mit potentiell infektiösen Materialien wie Blut, Serum oder Zellkulturen erfolgen in einer Sterilbank (HeraSafe, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Für das sterile Arbeiten werden alle Glaswaren vor Gebrauch 4 Stunden bei $180 \text{ }^\circ\text{C}$ sterilisiert und alle Lösungen bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ und $1,2 \text{ bar}$ autoklaviert oder sterilfiltriert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in sterilen Platten (Costar, Bodenheim, Deutschland) im Brutschrank (Typ HERAcell 240, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% iger CO_2 -Begasung und mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

3.8 Messung der Lebendzellzahlen mittels Trypanblau-Färbung

Mittels Trypanblau-Färbung lässt sich sowohl die Zellzahl als auch die Viabilität von Zellen schnell und einfach bestimmen. Durch die Membrandurchlässigkeit toter Zellen wird der saure Farbstoff Trypanblau in das Zellinnere aufgenommen. Mikroskopisch betrachtet sind tote Zellen dunkelblau eingefärbt. Die viablen Zellen hingegen erscheinen vor dem Hintergrund weiß.

PBMC, CD4⁺ T-Zellen und dendritische Zellen (DC) werden mit einer adäquaten Verdünnung gefärbt und gezählt. Hierzu werden 20 µl Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau-Lösung (bzw. 10 µl:40 µl oder 20 µl:20 µl) in einer 96-well-Platte vermischt und 10 µl in die Zählkammer gefüllt. Die Verdünnung muss bei der späteren Berechnung der Gesamtzellzahl beachtet werden. Die Formel für die Bestimmung der Gesamtzellzahl lautet folgendermaßen:

$$\text{Gesamtzellzahl} = X * Y * Z * 10^4$$

X = Lebendzellzahl in einem Quadranten

Y = Verdünnung

Z = Volumen der Zellsuspension

3.9 Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut von Probanden

Im Abstand von 8 Tagen wird den Probanden steril jeweils 100 ml venöses Vollblut mit 20 ml-Spritzen (50 µl Heparin/Spritze) abgenommen. Das Blut wird in vier 50 ml Zentrifugationsröhrchen auf 15 ml Lymphozytenseparationsmedium überschichtet und zentrifugiert (25 °C, 25 min, 350 g, ohne Bremse). Durch diese Dichtegradientenzentrifugation entsteht ein Gradient, der aus vier Phasen besteht. Die oberste Phase bildet das Blutplasma. Darunter befindet sich die weiße ringförmige Interphase, die die Lymphozyten und weitere mononukleäre Zellen enthält. Darauf folgt eine Schicht bestehend aus dem Lymphozytenseparationsmedium. Die letzte und unterste Phase wird von Erythrozyten und Granulozyten (z.B.: Eosinophile, Neutrophile) gebildet, die durch ihre hohe Dichte zu Boden sedimentiert sind. Zuerst wird die oberste Schicht, das Plasma, mit der Pipette abgenommen und zentrifugiert (4 °C, 5 min, 3500 g, mit Bremse). Ein kleiner Teil davon (5 ml) wird für die Bestimmung des spezifischen IgE, sowie für die Durchführung von IgE-Inhibitionsversuchen bei -20 °C weggefroren. Das restliche Plasma wird für 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die so gefällten

Proteine werden anschließend durch zwei Zentrifugationsschritte (4 °C, 5 min, 3500 g, mit Bremse) abgetrennt. Der gewonnene Überstand wird bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und als autologes Serum der Zellkultur zugegeben. Auch die Interphase, die die peripheren mononukleären Zellen (PBMC; engl. peripheral blood mononuclear cells) enthält, wird mit der Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Dieses wird mit 1 x PBS (4 °C) aufgefüllt, zentrifugiert (10 min, 350 g, 4 °C, mit Bremse) und dekantiert wird. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt bis der Überstand klar ist und somit die Thrombozyten entfernt sind. Aus den so gewonnen PBMC können nun dendritische Zellen (DC) generiert werden oder für die Isolation von CD4⁺ T-Zellen verwendet werden. Die untersten beiden Phasen des Gradienten werden nicht benötigt und können somit verworfen werden.

3.10 *In vitro* Generierung von unbeladenen und allergenbeladenen dendritischen Zellen

Nach der Gewinnung der PBMC wie in 3.10 beschrieben, oder aus dem Durchlauf der CD4⁺-Aufreinigung (siehe 3.11), wird anschließend die Zellzahl und ihre Viabilität mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung ermittelt. Dann werden die Zellen, die in dem Medium RPMI mit 0,5 % autologem Serum aufgenommen werden, auf $1,5 \times 10^7$ Zellen/3 ml eingestellt und in einer 6-well-Platte ausplattiert (3 ml/Well). Nach 45-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C sind die Monozyten adhärent. Durch vorsichtiges Spülen mit der Glaspipette und Absaugen des Mediums werden T- und B-Zellen entfernt. Dieser Vorgang wird dreimal mit 37 °C warmem 1x PBS mit 0,5 % autologem Serum wiederholt. Während des Waschvorgangs wird die Reinheit und Adhärenz der Monozyten im Mikroskop überprüft. Anschließend werden die Zellen über Nacht in 2 ml IMDM/Well mit 5 % autologem Serum im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag (Tag 1) erfolgt ein Mediumwechsel, bei welchem die 2 ml Kulturmedium/Well abgesaugt werden und durch 3 ml IMDM/Well mit 5 % autologem Serum und zusätzlich 150 IE/ml IL-4 und 400 U/ml GM-CSF ersetzt werden. An Tag 3 werden die Zellen gefüttert. Hierzu entnimmt man 1 ml des Kulturmediums pro Well und gibt jeweils 1 ml frisches IMDM mit 5 % autologem Serum sowie 150 IE/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF hinzu.

An Tag 6 werden die noch unreifen DC umgesetzt. Dazu werden sie gewonnen und ihre Gesamtzellzahl bzw. Viabilität mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Danach werden die Zellen auf 1×10^6 /3ml (bzw. je nach Zellzahl auf $0,6 \times 10^6$ /2ml, $0,5 \times 10^6$ /1,5 ml oder $0,3 \times 10^6$ /ml) in dem Medium IMDM mit 5 % autologem Serum und 150 IE/ml IL-4 sowie 400

U/ml eingestellt und auf eine 6-Well-Platte (bzw. je nach Zellzahl auf eine 12-Well-Platten) verteilt. Es sollen je nach Versuchsansatz verschiedene Populationen reifer DC generiert werden: Zum einen unbeladene DC, die als Kontrolle dienen, sowie allergenspezifische DC, die mit 20 µg/ml Bet v 1.0101, 20 µg/ml Cor a 1.0401, 20 µg/ml Dau c 1.0104 oder mit 5 µg/ml Ovalbumin beladen werden. Zusätzlich wird zu jeder DC-Population ein Reifungscocktail bestehend aus IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (100 IU/ml), PGE₂ (1 µg/ml) und TNF- α (10 ng/ml) hinzugegeben.

Anschließend werden die noch unreifen DC für zwei Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit erfolgt ihre optimale Ausreifung und sie können an Tag 8 als reife DC aus der Kulturplatte gewonnen, zweimal gewaschen (in 1x PBS, 4 °C, 350 g, mit Bremse) und weiterverwendet werden. Auch die Gesamtzellzahl der DC wird zur Durchführung der folgenden Experimente bestimmt.

3.11 Aufreinigung von CD4⁺ T-Zellen

Bestimmte Zellpopulationen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenproteine markiert und mit Hilfe der MACS-Technologie (MACS = magnetic cell sorting) voneinander getrennt werden. Die Markierung einer bestimmten Zellpopulation erfolgt mit Hilfe der sogenannten MACS MicroBeads. Dies sind superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm, die an hochspezifische monoklonale Antikörper gekoppelt sind, die wiederum spezifisch an bestimmte Oberflächenmoleküle auf der Zielzelle binden. Diese MACS MicroBeads werden zu der Zellsuspension hinzugegeben, die anschließend auf eine MACS Säule gegeben wird. Die Säule ist mit einer Matrix ausgestattet, die ferromagnetische Kügelchen enthält, und wird in einem Magnethalter befestigt. Durch das Zusammenspiel der ferromagnetischen Kügelchen und des Magneten wird ein sehr starkes magnetisches Feld erzeugt, in dem die mit MACS MicroBeads markierten Zellen in der Säule festgehalten werden. Die unmarkierten Zellen können ungehindert durch die Säule hindurchfließen (Negativfraktion). Wird die Säule aus dem Magneten entfernt, so können die markierten Zellen durch Druck mit einem sterilen Stempel aus der Säule eluiert werden (Positivfraktion).

Zur Isolation von CD4⁺ Zellen aus PBMC muss zuerst eine MACS Säule (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) vorbereitet werden. Hierzu wird sie in einem Magneten platziert und mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um sie zu äquilibrieren. Pro 1 x 10⁷ PBMC werden 16 µl MACS-Puffer und 4 µl CD4-MACS MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) zugegeben, gut resuspendiert und anschließend für 15 Minuten auf Eis und dem Taumler

inkubiert. Danach wird die Zellsuspension mit MACS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt und zentrifugiert (4 °C, 10 min, 300 g). Das Pellet der nun markierten Zellen wird in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die Säule gegeben. Nach einmaligem Durchlauf der PBMC wird die Säule 3x mit 5 ml MACS-Puffer gespült. Die Negativfraktion wird in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen, um daraus im Anschluss erneut DC für die Restimulation der CD4⁺ T-Zellen zu generieren (siehe 3.10). Die Säule wird aus dem Magneten entfernt und 2x mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Sowohl die Positiv- also auch die Negativfraktion werden zentrifugiert (4 °C, 10 min, 350 g) und anschließend noch einmal in 1x PBS gewaschen (4 °C, 10 min, 350 g). Danach wird von beiden Fraktionen die Gesamtzellzahl bestimmt. Nun kann mit den angereicherten CD4⁺ T-Zellen eine Primärkultur oder ein Proliferationsassay angesetzt werden. Die Reinheit der T-Zellen wird im Durchflusszytometer nach entsprechender Färbung bestimmt.

3.12 Durchflusszytometrische Standardanalysen

Durch die Durchflusszytometrie (FACS; engl. Fluorescence Activated Cell Sorting) ist man in der Lage, verschiedene Zelltypen (z.B. Monozyten, T- und B-Zellen) anhand ihrer Oberflächenmoleküle zu identifizieren. Hierzu werden Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert (hier: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (PE)) und mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Aber auch Kenntnisse über andere Parameter, wie Größe und Granularität, der Zellen kann man durch diese Methode erlangen.

Die markierten Zellen werden einzeln in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare geleitet und passieren dabei einzeln eine Lichtquelle. Diese Lichtquelle ist je nach Gerät eine unterschiedliche Anzahl Laser, die jeweils Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Das vom Laser emittierte Licht trifft auf die Zelle und wird gestreut. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC = engl. Forward Scattered Light) ein Maß für die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = engl. Side Scattered Light) wird von den Zellen in einem Winkel von 90 ° abgestrahlt, wodurch man Informationen über die Granularität der Zellen erhält. Werden durch die Laser auf den Zellen gekoppelte Fluorochrome angeregt, so ist die Anzahl der gemessenen Fluoreszenzsignale proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle auf der Zelloberfläche. Durch Photomultiplier wird sowohl die Lichtstreuung als auch die Fluoreszenzintensität der Zellen detektiert. Ein elektronisches System erhält die Lichtimpulse von der optischen Einheit und übermittelt sie zur Datenauswertung an den Computer. Die digitalen Signale können durch die Software

CellQuest 3.3 oder Diva 6.0 (beide Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet werden.

Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen werden mit einer Zellzahl von 1×10^6 /ml in FACS-Puffer aufgenommen. Von dieser Zellsuspension werden jeweils 100 μ l pro Well in einer unsterilen 96-Well-Platte verteilt. Die Platte wird zentrifugiert (4 °C, 2 min, 350 g) und der Überstand wird verworfen. Darauf folgt die eigentliche Färbung der Zellen mit dem jeweiligen Antikörper. Es werden 20 μ l/well des Primärantikörpers hinzu pipettiert, bei einer Doppelfärbung (z.B. HLA-DR) wird der zweite Antikörper zur selben Zeit appliziert. Es wird für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen zweimal mit 150 μ l FACS-Puffer gewaschen (4 °C, 2 min, 350 g). Danach wird bei nicht direkt markierten Antikörpern der Sekundärantikörper (20 μ l/Well) hinzu gegeben und bei 4 °C für 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgen final 2 Waschschrte mit 150 μ l FACS-Puffer/Well (4 °C, 2 min, 350 g), um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Zellen können nun in 150 μ l FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt werden und sind bereit zur Analyse im Durchflusszytometer.

3.12.1 Fluoreszenzfärbung von dendritischen Zellen

Die generierten reifen DC werden zu Kontrollzwecken mit Antikörpern gegen CD2, CD14, CD19, CD80, CD86 und HLA-DR markiert. Die Durchführung der Fluoreszenzfärbung erfolgt wie oben beschrieben.

3.12.2 Fluoreszenzfärbung von CD4⁺ T-Zellen

Die isolierten CD4⁺ T-Zellen werden mit direkt markierten Antikörpern auf ihre Reinheit hin überprüft. Gefärbt wird mit Antikörpern gegen CD4 sowie CD8. Die Fluoreszenzfärbung wird wie oben beschrieben durchgeführt.

3.13 Färbung von CD4⁺ T-Zellen mit Proliferationsfarbstoffen

3.13.1 CFSE-Färbung

Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) wird dazu verwendet, um die Proliferation von Zellen durchflusszytometrisch analysieren zu können. CFDA-SE dringt durch Diffusion durch die Membran in die Zelle ein. Dort werden die zwei Acetatgruppen des noch farblosen und nicht fluoreszenten Farbstoffs von intrazellulären Esterasen gespalten. Dabei entsteht der hochfluoreszente Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester (CFSE), der an freie Amine von zytoplasmatischen Proteinen bindet und so die Zelle nicht mehr verlassen kann. Bei Zellteilung werden von dem Farbstoff 50 % gleichmäßig an die Tochterzelle weitergegeben. Somit reduziert sich die Fluoreszenzintensität um die Hälfte, was mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen werden kann. CFSE wird mit dem blauen Laser (488 nm) angeregt und emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 517 nm.

Durchführung der CFSE-Färbung

Nach der 3-tägigen Ruhephase der Primärkultur (siehe Abb. 3.2) werden sowohl die allergenspezifischen als auch die Kontroll-T-Zellen gewonnen, gezählt und zentrifugiert (RT (Raumtemperatur), 10 min, 350 g). Von einer 10 mM CFSE-Stammlösung wird eine 1:100 Verdünnung mit 37 °C warmem PBS hergestellt. 1 bis 2 x 10⁷ Zellen werden in 1 ml vorgewärmtem PBS (37 °C) in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen aufgenommen und resuspendiert. Pro 1 ml PBS werden 10 µl der CFSE-Verdünnung hinzugegeben, womit man eine CFSE-Endkonzentration von 1 µM erhält. Die mit CFSE versehene Zellsuspension wird anschließend für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Färbung wird das jeweilige Zentrifugationsröhrchen mit X-VIVO 20 + 2 % HSA 20 % aufgefüllt und bei RT zentrifugiert (10 min, 350 g). Danach wird der Überstand verworfen und die T-Zellen können in Kulturmedium (IMDM + 5 % autologes Serum) auf die entsprechende Zellzahl (5 x 10⁶/ml) eingestellt werden.

3.13.2 CellTrace™ Violet-Färbung

CellTrace Violet ist ein phenolischer Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die Proliferation von Zellen im Durchflusszytometer gemessen werden kann und dessen Funktion auf dem Prinzip von CFSE (siehe 3.14.1) basiert. CellTrace Violet diffundiert durch die Zellmembran in das Zytoplasma einer Zelle hinein und wird dort von freien Esterasen

aktiviert. Durch die Bindung an intrazelluläre Amine ist der Farbstoff nicht länger membrangängig und verbleibt so in der Zelle. Bei Zellteilung wird der Farbstoff zur Hälfte an die Tochterzelle weitergegeben. So kommt es bei jeder neu entstehenden Tochtergeneration zu einem Verlust der Fluoreszenzintensität von 50 %, was durch eine durchflusszytometrische Messung detektiert werden kann. Angeregt wird CellTrace Violet mit dem violetten Laser (405 nm) und emittiert blaues Licht mit einer Wellenlänge von 455 nm.

Durchführung der CellTrace Violet-Färbung

Die nach der CD4-Aufreinigung gewonnenen T-Zellen werden mit dem Proliferationsfarbstoff CellTrace™ Violet gefärbt, bevor sie mit unbeladenen und allergenbeladenen DC in einer Primärkultur kokultiviert werden. Von dem Farbstoff wird eine 5 mM Stocklösung hergestellt, indem der Inhalt eines Röhrchens lyophilisierten CellTrace™ Violet in 20 µl DMSO aufgenommen wird. Die CD4⁺ T-Zellen werden auf eine optimale Konzentration von 1×10^6 /ml in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen eingestellt und mit einer Endkonzentration von 0,5 µM gefärbt. Hierzu wird pro 10 ml Zellsuspension 1 µl der CellTrace™ Violet Stocklösung hinzupipettiert und für 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen pelletiert (RT, 10 min, 350 g), wonach der Überstand verworfen wird. Die Färbung wird abgestoppt, indem die Zellen in 10 ml IMDM mit 5 % autologem Serum aufgenommen und erneut zentrifugiert werden (RT, 10 min, 350 g). Nach Wiederholung dieses Vorgangs können die T-Zellen in Medium (IMDM + 5 % autologes Serum) aufgenommen und auf die entsprechende Zellzahl (5×10^6 /ml) eingestellt werden.

3.14 Proliferationsmessung

3.14.1 Proliferationsmessung mittels ³H-Thymidinassay

Die durch antigenpräsentierende Zellen induzierte T-Zell-Proliferation wird mit Hilfe eines ³H-Thymidin-Proliferationsassays quantifiziert. Durch die Zugabe von ³H-Thymidin (Methyl ³H-Thymidin) wird dieses während der Proliferation in neu synthetisierte DNA eingebaut. Nach einer definierten Inkubationszeit kann das eingebaute radioaktive Thymidin mit einem β-Szintillationscounter als „counts per minute“ (cpm) gemessen werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, werden die cpm für jedes Allergen bei jedem Spender zu einem Stimulationsindex (SI) umgerechnet.

3.14.1.1 Messung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in der Primärkultur

In diesem Proliferationsassay werden aus Probandenblut isolierte CD4⁺ T-Zellen primär mit reifen autologen DC stimuliert. Diese DC verbleiben entweder als Kontrolle unbeladen, oder sind mit den Allergenen Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1 beladen.

Alle Zellpopulationen werden für diesen Assay in dem Medium IMDM mit 5 % autologem Serum aufgenommen. Jeder Test wird mit 200 µl/Well und als Triplikate in einer 96-Well-Zellkulturplatte angesetzt. Es werden 100 µl der DC pro Well in der entsprechenden Zellzahl ($0,25 \times 10^4$ /Well) vorgelegt, anschließend werden 100 µl der eingestellten CD4⁺ T-Zellen ($0,5 \times 10^5$ /Well) hinzupipettiert. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:20.

Der Proliferationsassay wird für drei Tage im Brutschrank inkubiert und danach wird mit ³H-Thymidin gepulst. Das ³H-Thymidin wird mit dem Medium RPMI 1:10 verdünnt und mit einer 1 ml-Einmal-Feindosierungsspritze mit 1 Tropfen/Well (= 1 µCi/Well) zugegeben. Es folgt eine Inkubationszeit von weiteren 16 Stunden, wonach der Assay mit einem Zellerntegerät dann an Tag 4 abgesaugt und so die Zellsuspension auf ein Filterpapier aufgebracht wird. Nach dem Trocknen in einem Trockenschrank für 30 Minuten bei 100 °C wird das Filterpapier in einem Folienbeutel mit 10 ml der Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Nun kann die in die DNA eingebaute Radioaktivität und damit die Proliferationsrate der CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe eines β-Szintillationscounters gemessen werden.

Für den Stimulationsindex (SI) bei der Primärkulturproliferation werden alle Werte auf die unspezifische Hintergrundproliferation der T-Zellen in Anwesenheit von unbeladenen DC normalisiert. Diese unspezifische Proliferation hat per Definition den Wert 1. Die Berechnung der Stimulationsindices für die einzelnen Allergene bei den jeweiligen Spendern ergibt sich aus der Division des Mittelwerts der Triplikate der counts per minute (cpm) bei Stimulation der T-Zellen mit allergenbeladenen DC durch den Mittelwert der Triplikate der cpm bei Stimulation von T-Zellen mit unbeladenen DC.

3.14.1.2 Messung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in der Restimulation

Die in der Primärkultur bereits stimulierten und nun allergenspezifischen bzw. Kontroll-T-Zellen werden gewonnen und erneut mit autologen, aus dem Durchlauf der CD4-Isolation (siehe 3.12) generierten DC, restimuliert. Diese DC_{Restimulation} sind ebenso wie die DC_{Primärkultur} allergenbeladen (Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1) oder verbleiben als Kontrolle unbeladen. Auch für diesen Assay wird IMDM als Kulturmedium verwendet, welchem 5 %

autologes Serum zugegeben wird. Jeder Testansatz wird in einer 96-Well-Zellkulturplatte als Triplikat angelegt. Das Gesamtvolumen pro Well beträgt 200 μ l.

DC ($0,25 \times 10^4$ /Well) und T-Zellen ($0,5 \times 10^5$ /Well) werden in einem Verhältnis von 1:20 für zwei Tage im Brutschrank kokultiviert. Danach wird für weitere 16 Stunden mit 3 H-Thymidin gepulst. Für das weitere Verfahren siehe 3.13.1.1.

Für den SI bei der Restimulation werden alle Daten auf die unspezifische Hintergrundproliferation normalisiert, die in diesem Falle entsteht, wenn $CD4^+$ T-Zellen sowohl primär als auch sekundär mit unbeladenen DC stimuliert werden. Der SI für diese unspezifische Proliferation wird als $SI = 1$ definiert. Die Stimulationsindices für die Restimulation mit den einzelnen Allergenen errechnen sich aus der Division des Mittelwertes der cpm von primär bzw. sekundär allergenspezifisch stimulierten T-Zellen und dem Mittelwert der cpm von primär bzw. sekundär unspezifisch stimulierten T-Zellen.

3.14.2 Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie

Neben dem 3 H-Thymidinassay kann die Proliferationsrate von $CD4^+$ T-Zellen, die hier durch die Stimulation mit DC hervorgerufen wird, durch ein durchflusszytometrisches Verfahren ermittelt werden. Hierzu werden die jeweiligen T-Zellpopulationen mit fluoreszierenden Proliferationsfarbstoffen (CellTrace Violet bzw. CFSE) gefärbt (siehe 3.14).

3.14.2.1 Messung der Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen in der Primärkultur

Die frisch aus 100 ml Vollblut von allergischen Spendern isolierten $CD4^+$ T-Zellen werden mit einer Endkonzentration von $0,5 \mu$ M des Proliferationsfarbstoff CellTrace Violet gefärbt (siehe 3.14.2). Ein kleiner Teil von ihnen verbleibt zu Kontrollzwecken ungefärbt. Als weitere Kontrolle für die spätere FACS-Messung wird eine CellTrace Violet-Einzelfärbung von PBMC angefertigt. Nachdem die T-Zellen in dem Medium IMDM mit 5 % autologem Serum aufgenommen wurden, werden die CellTrace Violet-positiven T-Zellen zum einen mit den allergenbeladenen DC (Bet v 1 bzw. Cor a 1) und zum anderen mit Kontroll-DC (unbeladen, OVA) kokultiviert. Die ungefärbten T-Zellen werden mit allergenspezifischen DC (Bet v 1 bzw. Cor a 1) primär stimuliert. Die Primärkulturen werden in einer 12-Well-Zellkulturplatte in einem Volumen von 1,5 ml angesetzt (Primärkultur (PK) d0). Pro Well werden $2,5 \times 10^5$ DC und $2,5 \times 10^6$ T-Zellen ausplattiert, was einem Verhältnis von 1:10 entspricht. Am darauffolgenden Tag (PK d1), sowie an Tag 4 der Primärkultur (PK d4)

wird von den jeweils unterschiedlichen Zellpopulationen ein kleines Aliquot ($60 \mu\text{l} \triangleq 1 \times 10^5$ T-Zellen) entnommen, in eine FACS-Platte überführt und auf $150 \mu\text{l}$ mit FACS-Puffer aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt (2 min, 350 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) werden die einzelnen Proben jeweils in $150 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die durchflusszytometrische Messung wird mit dem LSR II durchgeführt, anschließend erfolgt die Auswertung mit der Software Diva 6.0.

3.14.2.2 Messung der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Restimulation

Die unterschiedlich primär stimulierten T-Zellpopulationen werden am achten Tag der Primärkultur (PK d8 = Restimulation (RS) d0) nach einer dreitägigen Ruhephase wieder aus der Zellkulturplatte gewonnen und erneut mit autologen allergenbeladenen DC (Bet v 1, Cor a 1) und Kontroll-DC (unbeladen, OVA) stimuliert. Im Gegensatz dazu werden die CellTrace Violet-negativen T-Zellen ausschließlich mit dem identischen Allergen der primären Stimulation restimuliert. Vor der sekundären Stimulation werden die bereits CellTrace Violet-positiven Zellen zusätzlich mit $1 \mu\text{M}$ CFSE gefärbt (siehe 3.14.1). Die bisher ungefärbte T-Zellpopulation verbleibt zu Kontrollzwecken CFSE-negativ. Als zusätzliche Kontrolle für die FACS-Messung wird eine CFSE-Einzelfärbung mit PBMC durchgeführt. Nach der Färbung werden die unterschiedlichen T-Zellpopulationen in dem Medium IMDM mit 5 % autologem Serum aufgenommen. Die Restimulation wird in einer 96-Well-Zellkulturplatte angesetzt, wobei von jeder Probe für jeden Tag, an dem gemessen wird, ein Well ausplattiert wird. Pro Well werden in einem Volumen von $150 \mu\text{l}$ $0,25 \times 10^5$ DC und $0,25 \times 10^6$ T-Zellen ausgesät (1:10). Die erste Messung erfolgt an Tag 0/1 nach der CFSE-Färbung (RS d0/d1), die zweite Messung an Tag 3/4 (RS d3/4). Dafür wird jeweils ein Well der entsprechenden Proben gewonnen, in eine FACS-Platte überführt, herunterzentrifugiert (2 min, 350 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), anschließend in $150 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgt mit dem LSR II, die Auswertung mit der Software Diva 6.0.

3.15 Zytokinanalyse durch ELISA-Messung

Möchte man biologisch aktive Substanzen, wie z.B. Zytokine, in Zellkulturüberständen quantitativ nachweisen, so wird ein Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) durchgeführt.

Hierbei wird ein spezifischer Antikörper (capture-Antikörper (CpA)) gegen das jeweilige zu detektierende Antigen auf einen speziellen Träger (96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden die noch freien Proteinbindungsstellen durch einen blockierenden Puffer abgesättigt. Der immobilisierte Antikörper bindet das nachzuweisende Antigen in der Probe in Abhängigkeit seiner Konzentration. Ein weiterer Antikörper, der Detektions-Antikörper (DA), der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase) markiert ist, bindet an ein anderes Epitop des Antigens. Der so entstandene Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, mit dem Antigen zwischen den beiden Antikörpern, erinnert an ein „Sandwich“, weshalb dieses Verfahren auch Sandwich-ELISA genannt wird. Anschließend wird eine farblose Substratlösung zugegeben, die katalysiert durch das HRP-Enzym, in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Für die genaue Quantifizierung des Antigens wird eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen benötigt, womit eine Kalibrierungskurve ermittelt werden kann. Anhand deren kann die Stärke des gemessenen Farbsignals errechnet werden. Die Messung erfolgt fotometrisch mit Hilfe eines ELISA-Mikrotiterplatten-Readers.

Für die folgenden ELISA-Messungen werden Zellkulturüberstände aus der Primärkultur analysiert, die am dritten Tag (PK d3) gewonnen werden.

Durchführung der ELISA-Messungen

Es werden folgende Zytokine mit käuflichen ELISA-Kits analysiert: IL-2 und IL-5 (beide BD Biosciene, Heidelberg, Deutschland), sowie IL-4, IL-10, IL-13 und IFN- γ (alle Immunotools, Friesoythe, Deutschland), IL-9 (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) und IL-17 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die Durchführung der Messungen erfolgt nach den jeweiligen Protokollen der Hersteller.

Die Sensitivität des IL-2-, IL-5- und IFN- γ -ELISA liegt zwischen 15,6 pg/ml und 500 pg/ml, die des IL-4-ELISA zwischen 14,1 pg/ml und 450 pg/ml, die des IL-10-ELISA zwischen 9,4 pg/ml und 300 pg/ml, IL-9 kann zwischen 3,1 pg/ml und 100 pg/ml detektiert werden und IL-17 zwischen 31,3 pg/ml und 1000 pg/ml.

Generell wird von den Proben und den Standards eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als erstes werden in den ELISA-Protokollen die 96-Well-Mikrotiter-Platten mit 100 μ l des CpA beschichtet. Dabei werden die IL-2, IL-5 und IL-9 CpA 1:250 in Carbonatpuffer, der IL-4, IL-10, IL-13 und IFN- γ CpA 1:100 in Carbonatpuffer und der IL-17 CpA 1:180 in PBS

verdünnt. Die Inkubation der CpA erfolgt immer über Nacht bei 4 °C. Der IL-17 CpA stellt eine Ausnahme dar und wird bei Raumtemperatur inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wird der CpA entfernt. Dazu werden die Platten mit Waschpuffer gewaschen (PBS + 0,01 % – 0,05 % Tween20) und zum Trocknen ausgeklopft. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden im Anschluss die noch freien Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit jeweils 200 µl/Well eines Blockierungspuffers blockiert. Als Blockierungspuffer wird entweder der Verdünnungspuffer (IL-2, IL-5, IL-9) oder PBS + 1 % BSA (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ) verwendet. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Proben und die Standardreihe vorbereitet. Von den Proben wird eine adäquate Verdünnung und von den Standards eine 1:2 Verdünnungsreihe hergestellt. Von beidem werden jeweils 100 µl/Well auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Inkubation von Proben und Standards erfolgt für 1 Stunde (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ) bzw. für 2 Stunden (IL-2, IL-5, IL-9, IL-17) bei Raumtemperatur. Danach werden die Platten abermals gewaschen. Als nächstes wird der DA in die Platten pipettiert (100 µl/Well), wobei hier die verschiedenen Protokolle variieren. Bei IL-5 und IL-2 wird der DA 1:250 in Verdünnungspuffer aufgenommen und gleichzeitig das Streptavidin-HRP-Konjugat darin 1:250 verdünnt. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei Raumtemperatur. Bei den übrigen ELISAs wird zuerst der biotinylierte DA in Verdünnungspuffer verdünnt (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ : 1:100; IL-9: 1:250; IL-17: 1:180) und für eine Stunde (IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IFN- γ) bzw. für zwei Stunden (IL-17) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt ein Waschschrift und dann kann auch hier das Streptavidin-HRP-Konjugat aufgetragen werden (100 µl/Well). Es wird in Verdünnungspuffer aufgenommen (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ 1:10000; IL-9 1:250; IL-17 1:200) und für 30 Minuten (IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IFN- γ) bzw. 20 Minuten (IL-17) inkubiert. Danach werden die Platten ein letztes Mal gewaschen. Im nächsten Schritt wird die farblose Substratlösung aufgetragen (100 µl/Well). Die Mikrotiterplatten werden nun so lange im Dunkeln inkubiert, bis bei dem niedrigsten Standard eine leichte Verfärbung zu erkennen ist. Abgestoppt wird die Reaktion anschließend mit 2 N H₂SO₄ (50 µl/Well). Innerhalb der nächsten 30 Minuten kann die Extinktion mit einem Fotometer bei 450 nm gemessen werden. Die Auswertung der Daten wird mit der Software KCJunior durchgeführt.

3.16 Versuchsablauf

3.16.1 Analyse der T-Zellantwort von Allergikern und Nichtallergikern mittels ^3H -Thymidinassay

An Tag 0 werden aus Vollblut der Probanden PBMC isoliert (siehe 3.9), um daraus DC (= $\text{DC}_{\text{Primärkultur}}$) zu generieren, die entweder mit Allergenen beladen werden oder als Kontrolle unbeladen verbleiben (siehe 3.10). Ab Tag 1 werden diese Zellen in dem Medium IMDM mit 5 % autologem Serum, IL-4 und GM-CSF kultiviert (Abb. 3.1, Differenzierung $\text{DC}_{\text{Primärkultur}}$). Während der DC-Generierung werden an Tag 6 die Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 den zu beladenden Zellen appliziert (Abb. 3.1, Allergenbeladung). Die Überprüfung von Reinheit und Reife der DC erfolgt an Tag 6 mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.12.1). Am selben Tag werden dem gleichen Spender erneut 100 ml Vollblut entnommen, um daraus wiederum PBMC zu isolieren (siehe 3.9). Aus diesen werden CD4^+ T-Zellen angereichert (siehe 3.11), deren Reinheit durch eine durchflusszytometrische Messung kontrolliert wird (siehe 3.12.2). Die PBMC, die nach der T-Zellisolation die Negativfraktion bilden, werden anschließend zu reifen DC ausdifferenziert (= $\text{DC}_{\text{Restimulation}}$) und später zur Restimulation der T-Zellen verwendet. Die $\text{DC}_{\text{Restimulation}}$ werden ebenfalls an Tag 6 mit den jeweiligen Allergenen beladen, bzw. verbleiben zum Teil als Kontrolle unbeladen (Abb. 3.1, Differenzierung $\text{DC}_{\text{Restimulation}}$).

An Tag 8 werden nun aus den $\text{DC}_{\text{Primärkultur}}$ und den CD4^+ T-Zellen eine Primärkultur (Abb. 3.1, Primärkultur) und ein Proliferationsassay angesetzt. Am dritten Tag der Primärkultur werden Zellkulturüberstände gewonnen um eine Analyse der Zytokine durchzuführen. Zwei Tage später wird die Primärkultur für 3 Tage in Ruhe gebracht (Abb. 3.1, Ruhe).

Die in der Primärkultur mit $\text{DC}_{\text{Primärkultur}}$ kokultivierten und nun primär stimulierten CD4^+ T-Zellen werden nach acht Tagen geerntet und mit den ausgereiften $\text{DC}_{\text{Restimulation}}$ erneut stimuliert (Abb. 3.1, Restimulation). Auch hier wird ein Proliferationsassay angesetzt.

Sowohl die Proliferation der Primärkultur als auch die der Restimulation werden hier mit Hilfe des radioaktiven ^3H -Thymidins an Tag 4 (=d4), bzw. Tag 3 (= d3) gemessen (siehe 3.14.1.1 und 3.14.1.2).

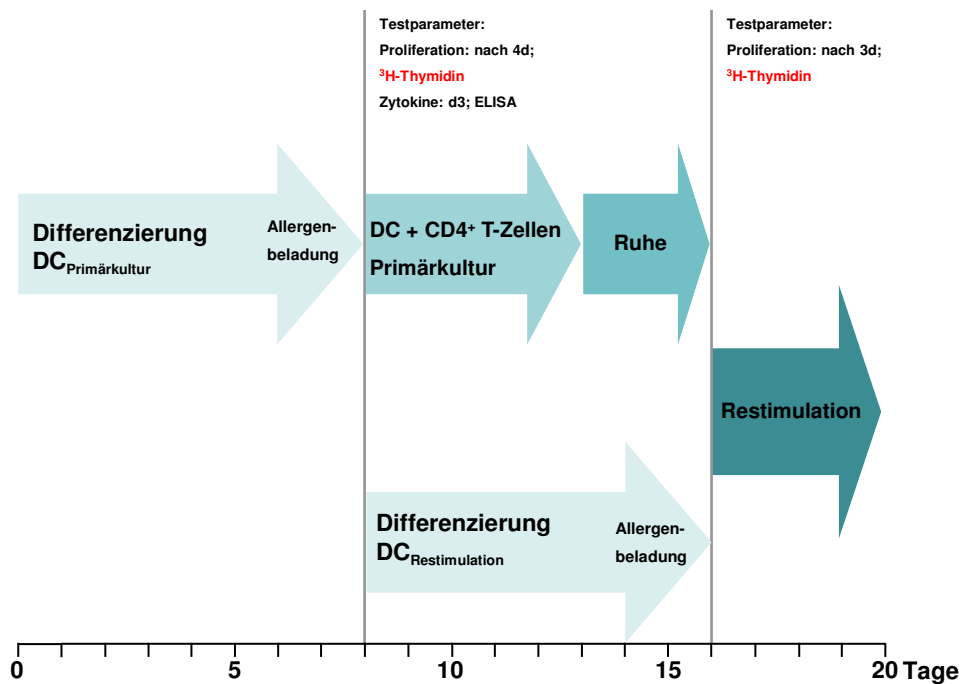


Abbildung 3.1 Versuchsablauf der T-Zellanalyse mittels ³H-Thymidinassay.

Dargestellt ist der Versuchsablauf der Analyse der T-Zellreaktivität von Allergikern und Nichtallergikern mittels ³H-Thymidin auf die Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1. Die ersten DC (DC_{Primärkultur}) werden an Tag 0 isoliert und innerhalb von acht Tagen ausgereift. Anschließend werden sie mit angereicherten CD4⁺ T-Zellen zur primären Stimulation kokultiviert (Primärkultur). An Tag 3 der Primärkultur werden Überstände gewonnen und mittels ELISA hinsichtlich der Zytokine analysiert. Erneut werden DC an Tag 8 angesetzt (DC_{Restimulation}), die für die sekundäre Stimulation der bereits voraktivierten T-Zellen eingesetzt werden (Restimulation). Die Messung der Proliferation erfolgt mit Hilfe eines ³H-Thymidinassays.

3.16.2 Analyse der T-Zellantwort von Allergikern mittels Durchflusszytometrie

Aus Vollblut des Probanden werden an Tag 0 PBMC isoliert (siehe 3.9) und allergenbeladene bzw. unbeladene reife DC generiert (Abb. 3.2, DC_{Primärkultur}). Ab Tag 1 werden diese Zellen in dem Medium IMDM mit 5 % autologem Serum, IL-4 und GM-CSF kultiviert (Abb. 3.2; Differenzierung DC_{Primärkultur}). Am sechsten Tag erfolgt die Beladung der noch unreifen DC mit Allergen (siehe 3.10), entweder mit Bet v 1, Cor a 1 oder mit dem irrelevanten Allergen Ovalbumin (OVA) (Abb 3.2, Allergenbeladung). An Tag 8 werden die DC gewonnen und deren Reife wird durch eine durchflusszytometrische Analyse überprüft (siehe 3.12.1). Zusätzlich erfolgt die zweite Vollblutspende des Probanden. Daraus werden erneut PBMC gewonnen, um daraus CD4⁺ T-Zellen zu isolieren (siehe 3.11), deren Reinheit im Durchflusszytometer überprüft wird (siehe 3.12.2). Zur Bestimmung der Proliferation in der Primärkultur werden die CD4⁺ T-Zellen anschließend mit dem Proliferationsfarbstoff CellTrace™ Violet (siehe 3.13.2) gefärbt. Aus

den restlichen CD4-negativen PBMC werden erneut reife DC generiert, welche zur Restimulation der CD4⁺ T-Zellen verwendet werden (= DC_{Restimulation}). Die zu beladenden DC werden an Tag 6 mit den Allergenen Bet v 1, Cor a 1 oder OVA beladen und werden zur Ausreife gebracht (Abb. 3.2; Differenzierung DC_{Restimulation}). An Tag 8 wird aus den DC_{Primärkultur} und den CellTrace Violet⁺ bzw. CellTrace Violet⁻ T-Zellen eine Primärkultur angesetzt (Abb. 3.2; DC + CD4⁺ T-Zellen Primärkultur). Nach fünf Tagen wird die Primärkultur für 3 Tage in Ruhe gebracht. Die nun primär stimulierten CD4⁺ T-Zellen werden nach acht Tagen geerntet und mit einem zweiten Proliferationsfarbstoff (CFSE) gefärbt (siehe 3.13.1), um die Proliferation der Zellen in der Restimulation analysieren zu können. Anschließend werden sie mit den DC_{Restimulation}, deren Reife auch mittels Durchflusszytometrie überprüft wird (siehe 3.12.1), restimuliert (Abb. 3.2, Restimulation). Die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen wird in der Primärkultur an Tag 1 und Tag 4 nach CellTrace Violet-Färbung gemesse, in der Restimulation an Tag 0 bzw Tag 1 und Tag 3 bzw. Tag 4 nach der CFSE-Färbung gemessen (siehe 3.14.2.1 und 3.14.2.2)

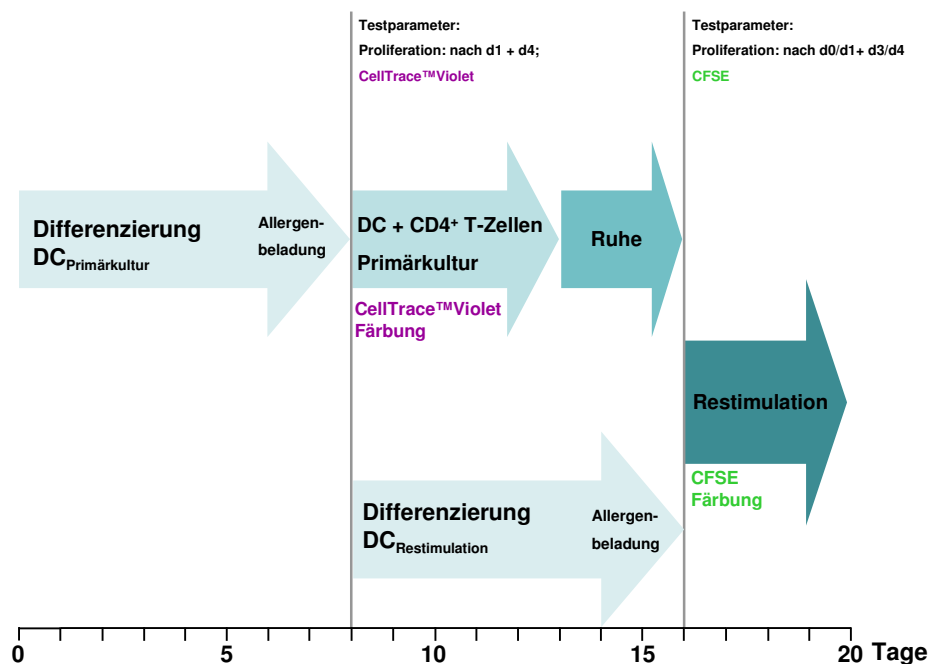


Abbildung 3.2 Versuchsablauf der T-Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

Dargestellt ist der Versuchsablauf der Analyse der T-Zellreaktivität von Allergikern mittels Durchflusszytometrie auf die Allergene Bet v 1.0101, Cor a 1.0401 und Ovalbumin. Die DC zur Primärstimulation der T-Zellen (DC_{Primärkultur}) werden an Tag 0 generiert und innerhalb von acht Tagen ausgereift. Danach werden sie mit isolierten CellTrace Violet gefärbten CD4⁺ T-Zellen kokultiviert (Primärkultur). Abermals werden DC an Tag 8 angesetzt (DC_{Restimulation}), die für die Restimulation der bereits primärstimulierten T-Zellen eingesetzt werden (Restimulation). Vor ihrer sekundären Stimulation werden die T-Zellen zusätzlich mit CFSE gefärbt. Die Messung der Proliferation erfolgt mit Hilfe der Proliferationsfarbstoffe durchflusszytometrisch.

3.17 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen werden mit Hilfe der Programme GraphPad Prism für Windows Version 5.02 und StatView für Windows Version 5.0 durchgeführt. Es werden Mittelwert, Median, Standardabweichung (SD, engl. Standard Deviation), Standardfehler (SEM, engl. Standard Error of the Mean), Minimum, Maximum und Quartilen berechnet. Die statistische Signifikanz der Proliferationsdaten wird mit dem Student's-t-Test für paarige Stichproben analysiert.

Die ImmunoCAP Werte, die mit Allergenextrakt oder mit dem rekombinanten Allergen erhoben wurden, werden durch den Wilcoxon signed rank test miteinander verglichen. Hierzu wird das Programm SAS 9.2 verwendet.

Die IgE-Korrelation wird mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelationstests ermittelt. Die Korrelation wird als Korrelationskoeffizient r angegeben. Je näher r sich an den Wert 1 annähert, umso höher ist die Korrelation der zu analysierenden Werte.

Die Werte in der vorliegenden Arbeit werden dann als signifikant angesehen, wenn $p \leq 0,05$ ist (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4. Ergebnisse

4.1 Probandencharakterisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wird die T-Zellantwort von 20 Allergikern und 12 gesunden Spendern analysiert, die durch die rekombinanten Hauptallergene von Birke (Bet v 1.0101), Haselnuss (Cor a 1.0401) und Karotte (Dau c 1.0104) induziert wird.

Grundsätzliches Kriterium für die Auswahl der Allergiker ist das Vorhandensein einer Typ I-Allergie gegen Birkenpollen mit einer assoziierten Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten.

Die Gruppe der analysierten Allergiker besteht aus 13 weiblichen und sieben männlichen Personen. Die Altersverteilung liegt zwischen 28 und 59 Jahren. Das Durchschnittsalter beträgt 42 Jahre (Tab. 4.1). Neben Anamnese und Pricktest wird die Konzentration des jeweiligen allergenspezifischen IgE gegen Birkenpollen-, Haselnuss- und Karottenextrakt (Tab.4.1 und Abb. 4.1) sowie gegen die rekombinanten Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 (Abb. 4.1) mit Hilfe des ImmunoCAP™-Systems (siehe 3.5) bestimmt.

Bei allen Teilnehmern der Studie mit Allergie liegt sowohl eine positive Anamnese als auch ein positiver Pricktest gegen Birkenpollen vor. Nur bei A004 wurde aus medizinischen Gründen kein Pricktest durchgeführt. Zusätzlich weisen die Atopiker eine hohe Konzentration von Birkenpollenextrakt-spezifischem IgE im Blutserum auf (\geq CAP-Klasse 3) (Tab. 4.1) sowie von Bet v 1-spezifischem IgE (\geq CAP-Klasse 2) (Abb. 4.1).

Bei allen 20 Allergikern kann allergenspezifisches IgE gegen Haselnussextrakt und rekombinantes Cor a 1.0401 (Tab. 4.1 und Abb. 4.1) im Blutserum nachgewiesen werden (CAP-Klasse \geq 2) und somit eine Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse bestätigt werden. Bei 18 dieser 20 Spender wurde zusätzlich ein Pricktest durchgeführt, der jeweils deutlich positiv ausfällt. Bei zwei Spendern (A004, A043) wurde von der Durchführung eines Pricktests aus medizinischen Gründen abgesehen. Als Besonderheit ist anzumerken, dass trotz nachgewiesener Haselnussallergie und einer damit einhergehenden teils hohen CAP-Klasse, bei vier Spendern (A018, A075, A077, A126) nach dem Verzehr von rohen Haselnüssen keinerlei Symptome, wie zum Beispiel ein allergisches Allergiesyndrom (OAS), auftreten (Tab. 4.1).

Sehr heterogen ist das Bild bei den Allergikern im Hinblick auf die Nahrungsmittelallergie gegen Karotten. Nur 13 der 20 Atopiker berichten von einer positiven Anamnese gegen Karotten. Bestätigt wird dies bei 12 von ihnen durch einen positiven Pricktest. Es fällt allerdings auf, dass bei dreien dieser 13 Probanden (A076, A094, A099) die CAP-Klasse

0 gegen Karottenextrakt, aber trotzdem in zwei Fällen (A076, A099) ein positiver Pricktests vorliegt. Unterstützt werden die Ergebnisse des Pricktests bei A076 und A099 durch die positive IgE-Reaktivität gegen das rekombinante Allergen Dau c 1 (Abb. 4.1). Bei drei von sieben Allergikern (A004, A037, A043) mit negativer Anamnese für Karotte lässt sich trotzdem allergenspezifisches IgE gegen sowohl das Extrakt als auch gegen das rekombinante Allergen der Karotte nachweisen (CAP-Klasse 1-2) (Tab. 4.1 und Abb. 4.1). Ein Spender mit negativer Anamnese für Karotte (A064) reagierte positiv im Pricktest, was jedoch nicht mit dem CAP-Test gegen das Allergenextrakt bestätigt werden kann (CAP-Klasse = 0) (Tab. 4.1), sich aber im CAP-Test gegen das rekombinante Dau c 1 widerspiegelt (CAP-Klasse = 2) (Abb. 4.1).

Insgesamt leiden alle Allergiker nachweislich an einer Birkenpollenallergie, die mit einer Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten assoziiert ist und erfüllen somit das Kriterium zur Teilnahme an dieser Studie.

Das Panel der gesunden Spender besteht aus 12 Personen im Alter von 23 bis 53 Jahren (33 Jahre im Durchschnitt). Acht von ihnen sind weiblich, vier sind männlichen Geschlechts. Alle gesunden Probanden weisen eine negative Anamnese in Bezug auf Birkenpollen, Haselnüsse und Karotten auf. Bei keinem Spender dieser Gruppe kann allergenspezifisches IgE gegen die Extrakte von Birke, Haselnuss oder Karotte nachgewiesen werden, auch kann keine IgE-Reaktivität gegen die rekombinanten Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 ermittelt werden. So können diese Spender als gesunde Kontrollgruppe dienen (Tab. 4.1).

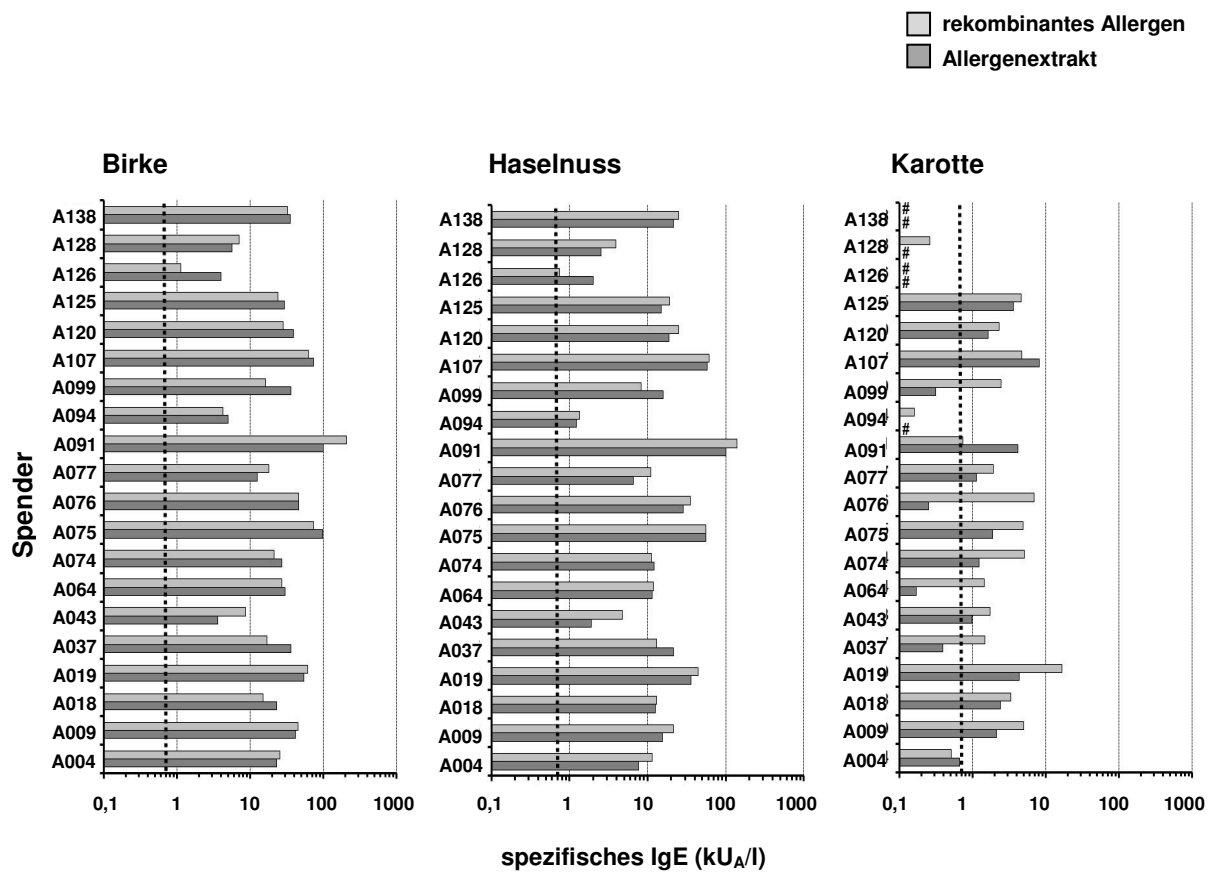


Abbildung 4.1 Spezifisches IgE von Allergikern gegen Birkenpollen, Haselnüsse und Karotten.

Getestet wurde die IgE-Konzentration in den Seren von 20 Allergikern (A = Allergiker) gegen die rekombinanten Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 (hellgraue Balken), sowie gegen die Allergenextrakte von Birke, Haselnuss und Karotte (dunkelgraue Balken). Die Ergebnisse des ImmunoCAP-Tests werden als Konzentration des spezifischen IgE [kUA/L] angegeben. Die schwarz gepunktete Linie markiert die Grenze zur CAP-Klasse 2. # IgE-Konzentration < 0,1 kUA/l. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.2 Einfluss der Allergene auf dendritische Zellen

Die ausgereiften allergenbeladenen und unbeladenen DC werden einer durchflusszytometrischen Messung unterzogen. Dabei soll überprüft werden, ob die Beladung mit den rekombinanten Allergenen einen Einfluss zum einen auf die Reife und zum anderen auf die Reinheit der dendritischen Zellen hat. Zur Analyse der Reife wird die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD83, CD86 und HLA-DR gemessen, da diese auf ausgereiften dendritischen Zellen heraufreguliert werden. Dabei sind CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) kostimulatorische Moleküle der B7-Familie, die beide jeweils an dem Rezeptor CD28 binden, der maßgeblich auf T-Zellen exprimiert wird, und somit das zweite Signal für die T-Zellaktivierung liefern⁶¹. Des Weiteren ist CD83 der prominenteste Marker für reife humane dendritische Zellen⁶² und HLA-DR, ein MHC II-Molekül, ist für die Antigenpräsentation und so für die Vermittlung des T-Zellsignals über den TCR verantwortlich⁶³.

Durch die Analyse der Oberflächenmarker CD2, CD14 und CD19 soll untersucht werden, ob durch eine Beladung mit rekombinantem Allergen eine Verunreinigung der DC durch T-Zellen (CD2)⁶⁴, Monozyten (CD14)⁶⁵ und B-Zellen (CD19)⁶⁶ begünstigt wird.

In Abb. 4.2 ist die durchflusszytometrische Analyse an Tag 8 von reifen dendritischen Zellen, die mit den rekombinanten Allergenen Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 beladen oder zur Kontrolle unbeladen belassen wurden, zu sehen. Es liegt eine Doppelfärbung des jeweiligen Markers (CD14, CD80, CD83, CD86) mit HLA-DR vor, eine Dreifachfärbung ist für die Oberflächenmarker CD2 und CD19 mit HLA-DR durchgeführt worden. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Spenders.

Die Oberflächenmoleküle CD80, CD83, CD86 und HLA-DR werden sowohl auf unbeladenen, als auch auf allen unbeladenen dendritischen Zellen im selben Maße exprimiert. Es sind keine Unterschiede und somit kein Einfluss auf den Reifezustand der Zellen ersichtlich (Abb. 4.2A)

Betrachtet man CD2/19 und CD14 bei unbeladenen und allergenbeladenen dendritischen Zellen, so ist die Expression dieser Oberflächenmoleküle bei allen Proben gleichermaßen sehr gering (< 2 %) (Abb. 4.2B). Es liegt also keine Verunreinigung mit T- und B-Zellen oder Monozyten vor, die durch die Beladung mit den Allergenen hervorgerufen bzw. verstärkt wird.

Betrachtet man den mittleren Fluoreszenzindex (MFI) aller zu analysierenden Marker, ein Maß für die Dichte des jeweiligen Markers auf der Zelloberfläche, so lässt sich auch hier

zwischen allergenbeladenen und unbeladenen DC kein Unterschied feststellen (Daten nicht gezeigt).

Eine zusätzliche Information erlangt man durch das Betrachten von FSC und SSC (Abb. 4.2A, links), die Auskunft über die Größe und Granularität, also die Morphologie der Zellen geben. Bei beiden Faktoren ist bei unterschiedlicher Allergenbeladung, bzw. ohne Allergen, kein Unterschied zu erkennen. Die rekombinanten Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 haben also keinen Einfluss auf die Morphologie von dendritischen Zellen.

Weder Reife, Reinheit noch Morphologie werden durch die Beladung mit den rekombinanten Allergenen von Birke, Haselnuss und Karotte beeinflusst.

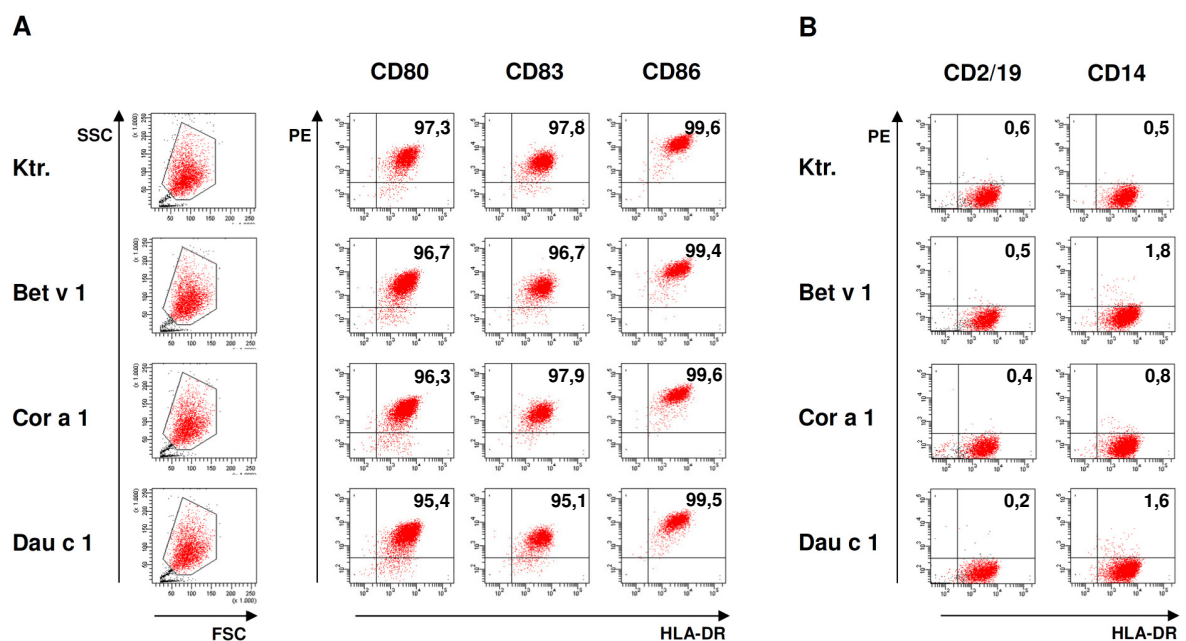


Abbildung 4.2 Einfluss der Allergene auf reife dendritische Zellen.

Gezeigt ist (A) der Vergleich der Granularität (FSC/SSC) (links) und der Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern für die Reife (CD80, CD83, CD86 und HLA-DR) (rechts) sowie (B) die Reinheit (CD2/19 und CD14) auf reifen unbeladenen bzw. allergenbeladenen (Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1) DC. Die primären Antikörper werden mit einem PE (Phycoerythrin)-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Der prozentuale Anteil der doppelt positiven Zellen ist im oberen rechten Quadranten angegeben.

4.3 Analyse der IgE-Kreuzreaktivität

4.3.1 IgE-Korrelation

Wie in 4.1 gezeigt werden konnte, leiden alle Atopiker der Kohorte nachweislich (Prick-Test, kommerzieller bzw. experimenteller ImmunoCAP-Test) an einer Birkenpollenallergie, die mit einer Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten assoziiert ist. Setzt man die IgE-Reaktivität gegen die einzelnen Allergene (Bet v 1, Cor a 1, Dau c 1) bzw. Allergenextrakte (Birkenpollen-, Haselnuss-, Karottenextrakt) in Korrelation zueinander, so spiegelt sich dieser Tatbestand wider.

Bei 20 Allergikern kann mit hoher Signifikanz eine starke Korrelation zwischen den IgE-Reaktivitäten von Birkenpollen- und Haselnusseextrakt bzw. Bet v 1 und Cor a 1 (Spearman $r = 0,96$; $p < 0,0001$ bzw. Spearman $r = 0,94$; $p < 0,0001$) festgestellt werden (Abb. 4.3A). Denn je mehr sich der Korrelationskoeffizient Spearman r dem Wert 1 annähert um so höher ist die Korrelation. Ebenso kann bei 16 bzw. 20 Atopikern eine signifikante, wenn auch geringere Korrelation zwischen den IgE-Reaktivitäten von Haselnuss- und Karottenextrakt bzw. Cor a 1 und Dau c 1 (Spearman $r = 0,46$; $p = 0,0349$ bzw. Spearman $r = 0,51$; $p = 0,0115$) gezeigt werden (Abb. 4.3B). Anders verhält es sich mit der Korrelation der IgE-Reaktivitäten zwischen Birkenpollen- und Karottenextrakt ($n=16$). Hier kann keine signifikante Korrelation festgestellt werden (Spearman $r = 0,39$; $p = ns$) (Abb. 4.3C). Es kann lediglich eine signifikante Korrelation zwischen den IgE-Reaktivitäten der rekombinanten Allergene Bet v 1 und Dau c 1 errechnet werden ($n=20$) (Spearman $r = 0,49$; $p = 0,0136$) (Abb. 4.3). Die Darstellung der Korrelation zwischen den IgE-Reaktivitäten der einzelnen Allergenextrakte bzw. rekombinanten Allergenen ist eine gute Möglichkeit die Kreuzallergie der allergischen Spender zu visualisieren.

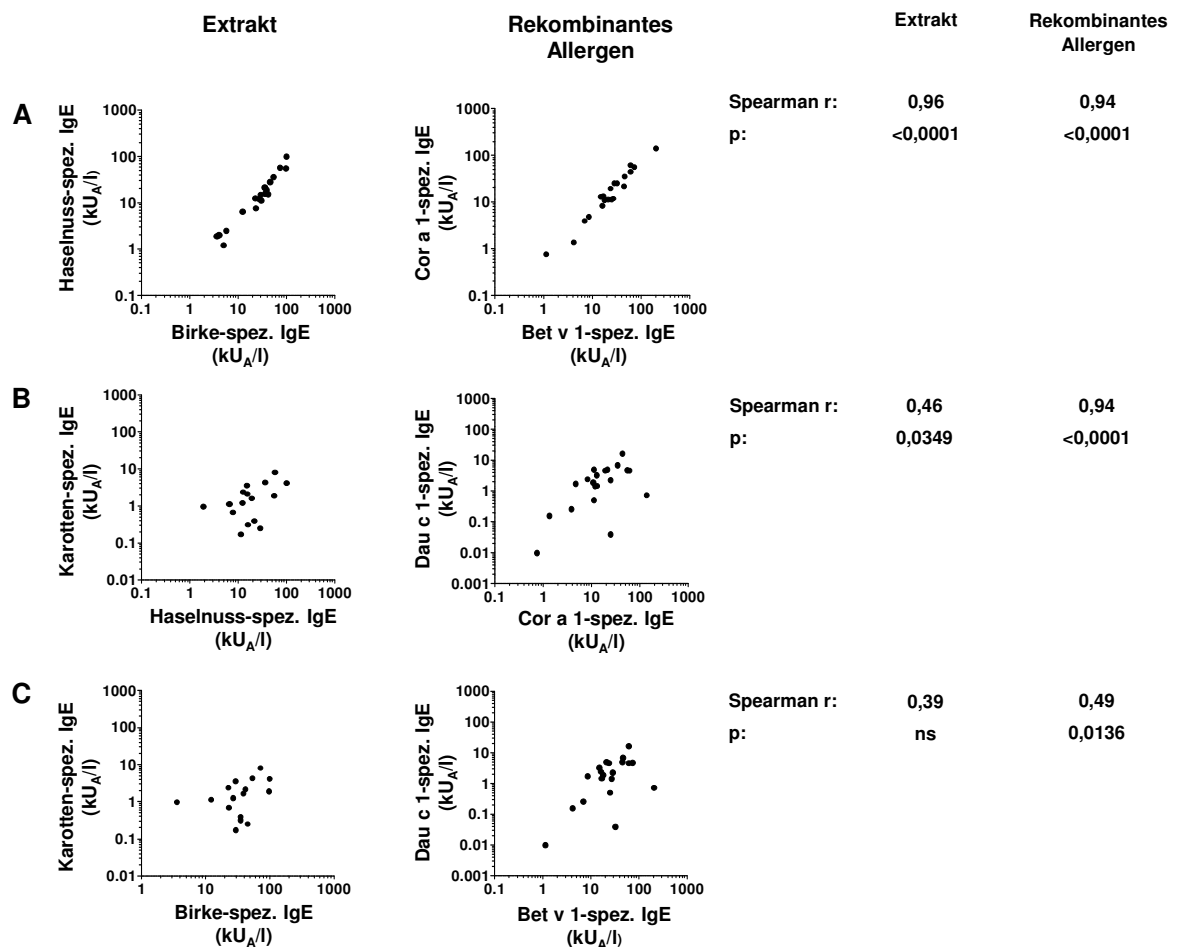


Abbildung 4.3 IgE-Korrelation.

Dargestellt sind die Ergebnisse der ImmunoCAP-Tests gegen Allergenextrakte (links) und rekombinante Allergene (rechts) von 20 Allergikern. Aufgetragen ist die IgE-Reaktivität gegen (A) Birkenextrakt versus Haselnussextrakt (links) und Bet v 1 versus Cor a 1 (rechts), gegen (B) Haselnussextrakt versus Karottenextrakt (links) und Cor a 1 versus Dau c 1 (rechts) sowie gegen (C) Birkenextrakt versus Karottenextrakt (links) und Bet v 1 versus Dau c 1 (rechts). Die Korrelationen (Spearman r) und Signifikanzen (p) sind gegeben; $p < 0,05$ = signifikant, ns = nicht signifikant; spez. = spezifisch. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.3.2 IgE-Inhibition

Aufgrund der hohen Korrelation der IgE-Reaktivität zwischen den rekombinanten Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 soll das Ausmaß der IgE-Kreuzreaktivität genauer analysiert werden. Dazu wurden dosisabhängige IgE-Inhibitions-ELISAs (siehe 3.6) im Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt. Analysiert werden die Seren von elf Allergikern (A004, A009, A018, A037, A074, A076, A091, A099, A107, A120, A138), die anhand ihrer hohen IgE-Reaktivität ausgewählt wurden.

Für die Versuche wird immobilisiertes Bet v 1 oder Cor a 1 eingesetzt. Zusätzlich werden die Seren der Spender mit löslichem Bet v 1, bzw. löslichem Cor a 1 in ansteigenden Konzentrationen präinkubiert. So soll die Bindung der im Serum vorhandenen allergenreaktiven IgE-Antikörper an das jeweils immobilisierte Allergen kompetitiert werden und dadurch die Bet v 1-reaktive bzw. Cor a 1-reaktive IgE-Spezies genauer charakterisiert und auf Kreuzreaktivität hin untersucht werden.

Die Bindung von Bet v 1-spezifischen IgE an immobilisiertes Bet v 1 wird durch eine Präinkubation mit löslichem Bet v 1 bei einer Konzentration von 10 bis 50 µg/ml maximal inhibiert (Abb. 4.4, oben; weiße Boxen). Erfolgt die Präinkubation des Serums hingegen mit löslichem Cor a 1, so wird auch hier die Bindung des IgE an Bet v 1 inhibiert, allerdings zu einem weitaus geringeren Prozentsatz. Die maximale Inhibition, hervorgerufen durch 50 µg/ml lösliches Cor a 1, liegt zwischen 23 % und 75 % (Median: 44,8 % Inhibition) (Abb. 4.4, oben; graue Boxen). Somit liegt eine Kreuzreaktivität von Bet v 1-spezifischem IgE zu Cor a 1-spezifischem IgE vor.

Die Bindung des IgE aus dem Serum von Allergikern an immobilisiertes Cor a 1 wird durch die Präinkubation mit löslichem Cor a 1 bei einer Konzentration von 0,4 µg/ml bis 10 µg/ml bereits maximal inhibiert (Abb. 4.4, unten; graue Boxen). Bei umgekehrter Präinkubation mit Bet v 1 verhält es sich mit der Bindung der Cor a 1-reaktiven IgE-Antikörper genauso. Auch hier wird dessen Bindung an das immobilisierte Cor a 1 bereits bei einer Konzentration von 0,4 bis 10 µg/ml vollständig kompetitiert (Abb. 4.4, unten; weiße Boxen).

Ermittelt man die relative Potenz (mittels Parallel Line Analysis, SoftMax® Pro 5 Software, Molecular Devices Corporation, Kalifornien; durchgeführt vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI)) von Cor a 1 und Bet v 1 als Inhibitor bei der Bindung an immobilisiertes Cor a 1, so stellt sich heraus, dass trotz identischer Inhibition (maximale Inhibition bei 0,4 – 10 µg/ml) der Cor a 1-spezifischen IgE-Bindung eine deutlich niedrigere relative Potenz für den Inhibitor Cor a 1 vorliegt. Daher besitzt Cor a 1-reaktives IgE dem Allergen Bet v 1 gegenüber eine höhere Avidität als gegenüber Cor a 1. Somit bindet Cor a 1-reaktives IgE dominant Bet v 1 (Abb. 4.4, unten, rechts), und wir konnten hiermit eine hohe Kreuzreaktivität von Cor a 1-spezifischem IgE zu Bet v 1 nachweisen.

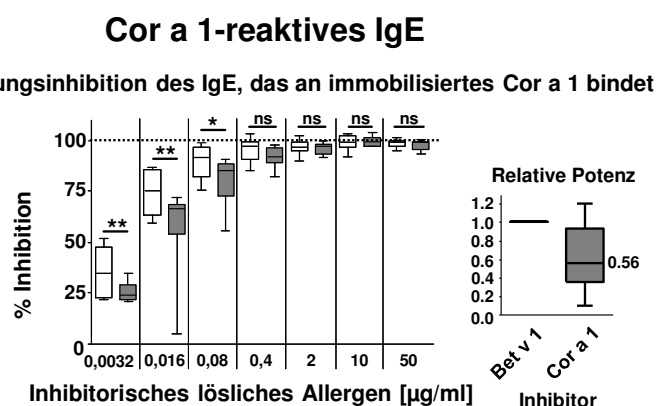
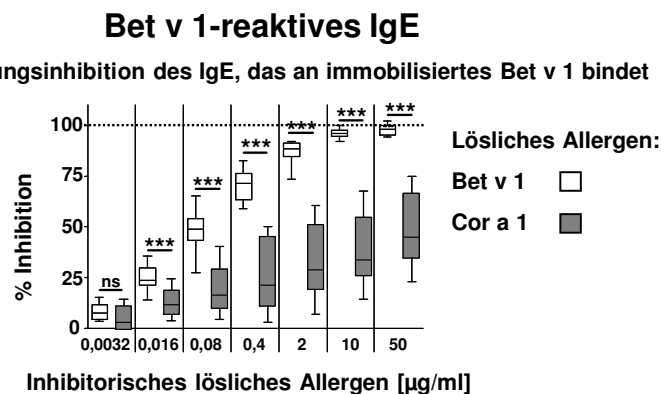


Abbildung 4.4 IgE-Inhibition.

Gezeigt sind die zusammengefassten Daten von 11 untersuchten Spenderseren im ELISA-Inhibitionsassays. Analysiert wird die IgE-Reaktivität gegen immobilisiertes Bet v 1 (oben) und immobilisiertes Cor a 1 (unten). Angegeben sind % Inhibition. Die relative Potenz (unten rechts) wird mit Hilfe von SoftMax Pro 5.2 errechnet. Dargestellt sind die Boxplots mit Median und Interquartilen, Minimum und Maximum. Weiße Boxplots: lösliches Bet v 1; graue Boxplots: lösliches Cor a 1 als Kompetitor. Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.4 Analyse der T-Zellantwort mittels ^3H -Thymidinassay

Die allergenspezifische Proliferation der CD4^+ T-Zellen von allergischen und nichtallergischen Spendern, die durch allergenbeladene autologe DC induziert wird, wird sowohl in der Primärkultur als auch in der Restimulation zunächst mit Hilfe des ^3H -Thymidin-Proliferationsassays gemessen.

Auf die Zugabe von exogenen Zytokinen, wie z.B. IL-2 oder eine wiederholte Stimulation der T-Zellen, wird in diesem System verzichtet. Dadurch soll ein unspezifischer Hintergrund möglichst gering gehalten werden.

4.4.1 T-Zellproliferation in der Primärkultur

Während der Primärkultur kommen die CD4⁺ T-Zellen von Allergikern und Kontrollspendern zum ersten Mal *in vitro* durch beladene DC mit dem jeweiligen Allergen, Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1, in Kontakt. Die so induzierte primäre Aktivierung der T-Zellen wird als Stimulationsindex (SI) dargestellt. Für den SI der Primärkulturproliferation werden alle Werte auf die unspezifische Hintergrundproliferation der T-Zellen in Anwesenheit von unbeladenen DC normalisiert. Diese unspezifische Proliferation hat per Definition den Wert 1. Die Berechnung der SI für die einzelnen Allergene bei den jeweiligen Spendern ergibt sich aus der Division des Mittelwertes der Triplikate der counts per minute (cpm) bei Stimulation der T-Zellen mit allergenbeladenen DC durch den Mittelwert der Triplikate der cpm bei Stimulation von T-Zellen mit unbeladenen DC.

Für die Analyse der T-Zellproliferation werden insgesamt 20 Allergiker und 12 gesunde Kontrollpersonen im ³H-Thymidinassay untersucht. Bei allen 20 Atopikern liegen Ergebnisse zu der primären Aktivierung mit Bet v 1 vor, bei 19 zu Cor a 1 und nur bei neun zu Dau c 1. Bei allen 12 Kontrollspendern liegen Daten zur Primärstimulation mit Bet v 1 und Cor a 1 vor, bei elf zu Dau c 1.

Wie in Abbildung 4.5 zu erkennen ist, findet nach primärer Aktivierung mit Bet v 1 bei den Allergikern im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikante Induktion der T-Zellproliferation statt (Median SI = 2,1). Ebenso verhält es sich nach Stimulation der T-Zellen von Allergikern mit Cor a 1 (Median SI = 1,5). Auch hier ist der Unterschied der allergenspezifischen Proliferation zwischen Atopikern und Nichtallergikern signifikant. Anders verhält es sich bei der primären Aktivierung mit Dau c 1. Hier kann im Vergleich zu der nichtallergischen Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 4.5).

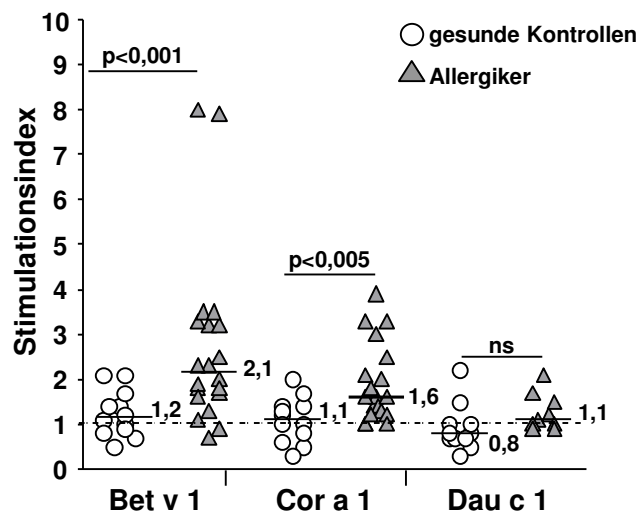


Abbildung 4.5 T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach primärer Stimulation.

Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von Allergikern ($n=20$) und Nichtallergikern ($n=12$) nach primärer Stimulation der CD4^+ T-Zellen durch reife Bet v 1-, Cor a 1- oder Dau c 1-spezifische DC. Für jede Gruppe ist der Median angegeben. Der Stimationsindex der allergenspezifischen Proliferation errechnet sich aus der Normalisierung auf die Proliferation, die durch unbeladene DC induziert wird. $\text{SI}=1$ ist die unspezifische Hintergrundproliferation der T-Zellen in Anwesenheit von unbeladenen DC bei allen Spendern. Signifikant: $p < 0,05$; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

Betrachtet man die Spender im Einzelnen, so fällt zunächst auf, dass es eine große Varianz im Hinblick auf den SI existiert (Allergiker: $\text{SI} = 0,7 - 8,0$; Nichtallergiker: $\text{SI} = 0,3 - 2,2$) (Abb. 4.6). Des Weiteren ist festzustellen, dass 16 von 20 Allergikern eine signifikante Bet v 1-induzierte T-Zellproliferation aufweisen, die über dem Niveau der Hintergrundproliferation liegt ($\text{SI} > 1$). Auch zehn von 19 Atopikern zeigen eine signifikante Cor a 1-spezifische Induktion der T-Zellproliferation. Dagegen kann nur bei drei von neun allergischen Spendern eine signifikante Proliferation der T-Zellen gezeigt werden, die durch Dau c 1-beladene DC stimuliert werden. Dabei liegt diese Proliferation bei einem Spender lediglich auf Höhe der Hintergrundproliferation (Abb. 4.6).

Bei den gesunden Kontrollspendern weisen nur drei von 12 Probanden eine signifikante durch Bet v 1 hervorgerufene allergenspezifische Proliferation auf. Bei den Cor a 1-stimulierten T-Zellen kann lediglich bei einem Spender eine signifikante Proliferation nachgewiesen werden und bei einer Stimulation der T-Zellen mit Dau c 1-beladenen DC liegt die Proliferation nur bei zwei nichtallergischen Spendern bei einem $\text{SI} > 1$. Allerdings sind diese Werte nicht signifikant (Abb. 4.6).

Es kann also gezeigt werden, dass bei den Allergikern im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe eine signifikante allergenspezifische T-Zellantwort durch die Allergene Bet v 1 und Cor a 1 induziert werden kann.

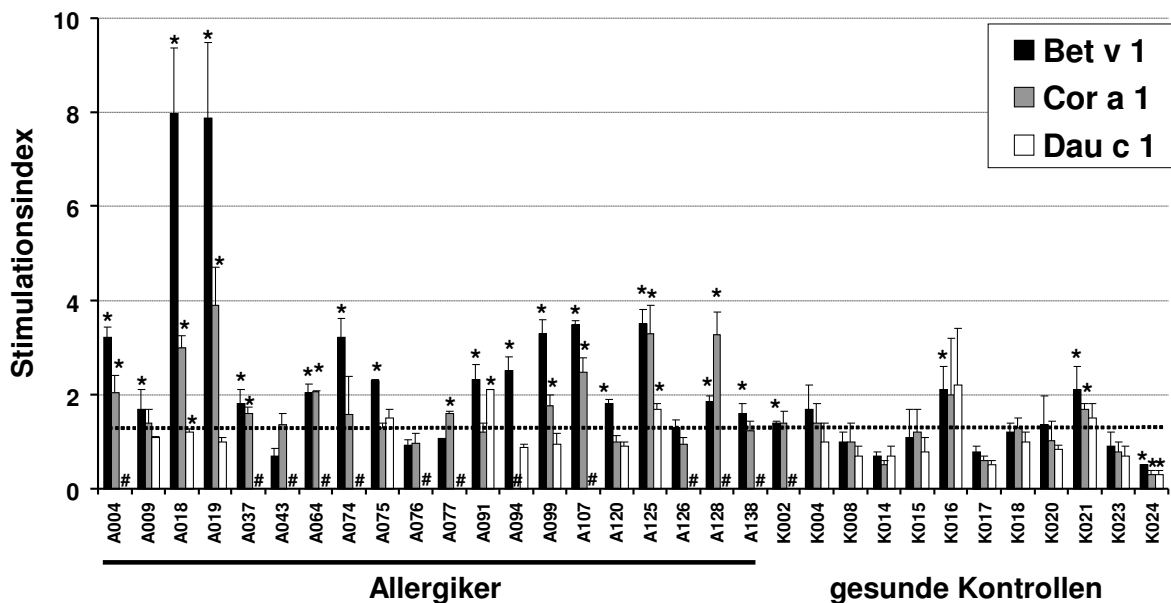


Abbildung 4.6 Individuelle T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach primärer Stimulation.

Dargestellt sind die individuellen Daten von Allergikern ($n=20$) und Nichtallergikern ($n=12$) der primären Stimulation von CD4^+ T-Zellen mit reifen Bet v 1-, Cor a 1- oder Dau c 1-spezifischen DC. Der Stimmulationsindex (SI) der allergenspezifischen Proliferation errechnet sich aus der Normalisierung auf die Proliferation, die durch unbeladene DC induziert wird ($\text{SI}=1$) und bei jedem einzelnen Spender aus Triplikaten gemittelt wird. Angegeben ist die Standardabweichung (SD). Die Signifikanzen beziehen sich auf die durch unbeladene Kontroll-DC induzierte Proliferation ($\text{SI}=1$). Schwarz gepunktete Linie: $\text{SI}=1$. * $p < 0,05$; # nicht durchgeführt. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.4.2 Zytokine in der Primärkultur

Zur besseren Charakterisierung der T-Zellantwort auf die Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 werden an Tag drei der primären Stimulation der CD4^+ T-Zellen Kulturüberstände gewonnen und deren Zytokingehalt mit Hilfe von ELISA-Messungen analysiert. Bei Allergikern und gesunden Spendern werden insbesondere die Th2-Zytokine IL-5 und IL-13, IL-9, das sowohl von Th2- als auch von Th9-T-Zellen produziert wird, das Th1-Zytokin $\text{IFN-}\gamma$ sowie das regulatorische Zytokin IL-10 genauer betrachtet.

Dabei zeigt sich, dass die T-Zellantwort bei der Allergikergruppe stark von dem Th2-Zytokin IL-5 dominiert ist und von einer signifikant erhöhten Produktion von IL-9 und IL-13 begleitet wird.

Werden CD4^+ T-Zellen von Atopikern primär mit Bet v 1- oder Cor a 1-spezifischen DC stimuliert, so ist die IL-5-Produktion in beiden Fällen im Gegensatz zur Stimulation mit unbeladenen DC signifikant erhöht (unbeladen, Median: 140 pg/ml; Range: 15 – 770 pg/ml; Bet v 1, Median: 560 pg/ml; Range: 111 – 3760 pg/ml bzw. Cor a 1, Median: 269;

Range: 15 – 1452 pg/ml). Bei der Primärstimulation mit Dau c 1 ist die IL-5-Produktion nicht signifikant gesteigert, jedoch ist hier eine Tendenz zur erhöhten Sekretion des Zytokins im Vergleich zur unspezifisch stimulierten Kontrolle erkennbar (Dau c 1, Median: 257 pg/ml; Range: 65 – 1004 pg/ml) (Abb. 4.7A).

Auch eine signifikante Zunahme der IL-9-Sekretion kann bei den Allergikern als Reaktion auf sowohl Bet v 1 (Median: 147 pg/ml; Range 3 – 2594 pg/ml), Cor a 1 (Median: 76 pg/ml; Range: 3 – 958 pg/ml) als auch Dau c 1 (Median: 89 pg/ml; Range: 3 – 660 pg/ml) im Vergleich zur Aktivierung durch antigenunspezifische DC (Median: 33 pg/ml; Range: 3 – 305 pg/ml) gemessen werden (Abb. 4.7A).

Die ELISA-Messung von IL-13 zeigt ebenfalls eine signifikant erhöhte Sekretion des Th2-Zytokins als Antwort auf die Stimulation mit Bet v 1 (Median: 114 pg/ml; Range: 4 – 943 pg/ml) und Cor a 1 (Median: 70; Range: 4 – 634 pg/ml) im Vergleich zur unspezifischen Stimulation (Median: 47 pg/ml; Range: 4 – 516 pg/ml). Doch schon wie bei IL-5 lässt sich auch hier durch die Aktivierung mit Dau c 1-beladenen DC lediglich eine nicht signifikante Tendenz zur vermehrten IL-13-Produktion erkennen (Abb. 4.7A).

Betrachtet man die Zytokinproduktion von IL-5, IL-9 und IL-13 bei der gesunden Kontrollgruppe, so ist bei keinem der Zytokine eine signifikante Erhöhung der Sekretion als Antwort auf die Allergene Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1 nachweisbar (Abb. 4.7B).

Bei der Analyse des Th1-Zytokins IFN- γ fällt zunächst auf, dass nur eine Stimulation mit Bet v 1-spezifischen DC eine signifikante Steigerung der Zytokinproduktion bei Allergikern bewirken kann (unbeladen, Median: 96 pg/ml; Range: 19 – 200 pg/ml; Bet v 1, Median: 159; Range: 41 – 355 pg/ml). Durch die Allergene Cor a 1 und Dau c 1 wird keine signifikant erhöhte IFN- γ -Sekretion induziert (Cor a 1, Median: 138 pg/ml; Range: 26 – 253 pg/ml; Dau c 1, Median: 69 pg/ml; Median: 15 – 441 pg/ml) (Abb. 4.7B). In der Kontrollgruppe kann keines der Allergene eine signifikante IFN- γ -Sekretion bewirken. Allerdings liegt die Produktion dieses Zytokins sowohl bei Allergikern als auch Nichtallergikern auf demselben Niveau (Abb. 4.7B).

In beiden Spendergruppen ist das regulatorische Zytokin IL-10 nicht nachweisbar (Abb. 4.7B).

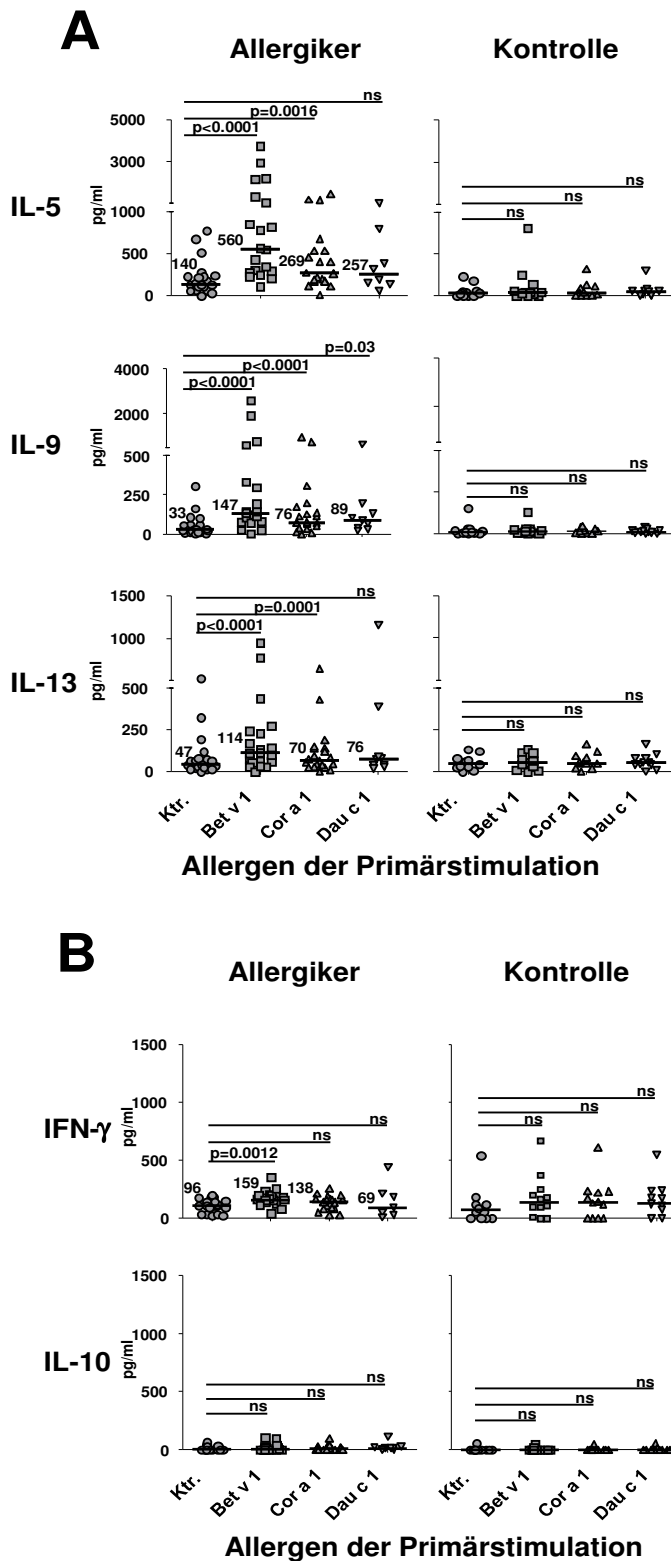


Abbildung 4.7 Zytokinsekretion nach primärer T-Zellstimulation.

Gezeigt ist das Zytokinprofil von Allergikern (n=20) und Nichtallergikern (n=12) nach primärer Stimulation (Tag 3) der CD4⁺ T-Zellen mit reifen unbeladenen Kontroll-DC (Ktr.) oder allergenspezifischen (Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1) DC. A: IL-5, IL-9 und IL-13; B: IFN- γ und IL-10. Signifikant: $p < 0,05$; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

Aufgrund der ähnlichen IFN- γ -Produktion bei Atopikern und der Kontrollgruppe ist es interessant, das Verhältnis von Th2-Zytokin IL-5 zu Th1-Zytokin IFN- γ einer genaueren Analyse zu unterziehen (Abb. 4.8). Dabei werden die einzelnen Mediane von IL-5 und IFN- γ des jeweiligen Allergens zueinander ins Verhältnis gesetzt. Es ist zu erkennen, dass das Verhältnis bei den Allergikern im Gegensatz zu den Nichtallergikern bei allen Allergenen (Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1) signifikant höher ist. Dies deutet darauf hin, dass die T-Zellantwort gegen die Allergene in der Atopikergruppe deutlich durch das Th2-Zytokin IL-5 dominiert wird (Abb. 4.8).

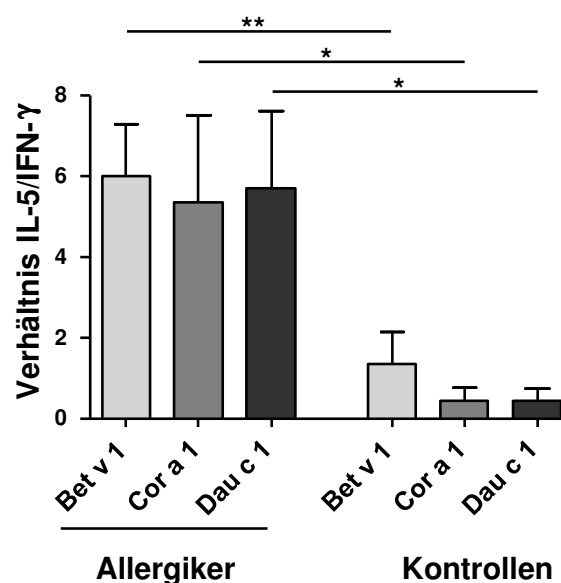


Abbildung 4.8 Zytokinverhältnis IL-5/IFN- γ .

Das Verhältnis der Zytokine IL-5 zu IFN- γ wird für jeden Allergiker (n=20) und gesunde (n=12) Spender einzeln berechnet und hier als Durchschnitt \pm SEM zusammengefasst dargestellt. Signifikanzen: * p < 0,05; ** p < 0,01. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

Zusätzlich wurden die Zytokine IL-2, IL-4 und IL-17 gemessen, konnten jedoch in den Überständen aus der Primärkultur am dritten Tag nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.3 T-Zellproliferation nach identischer und homologer Restimulation

Für die Restimulationsversuche werden die CD4⁺ T-Zellen von Allergikern und gesunden Spendern, die primär bereits mit den Allergenen Bet v 1, Cor a 1 oder Dau c 1 voraktiviert bzw. zu Kontrollzwecken unspezifisch mit unbeladenen DC stimuliert wurden (siehe

4.1.1), mit dem jeweils identischen Allergen aus der Primärkultur, d.h. (Bet v 1 → Bet v 1) bzw. (Cor a 1 → Cor a 1) oder dem homologen Allergen, d.h. (Cor a 1 → Bet v 1) bzw. (Dau c 1 → Bet v 1) und (Bet v 1 → Cor a 1) bzw. (Dau c 1 → Cor a 1) reaktiviert. Die Restimulation mit Dau c 1 ist nicht gezeigt. Anschließend erfolgt auch hier die Messung der Proliferation mittels ³H-Thymidininkorporation.

Um eine Kreuzreaktivität nachweisen zu können, werden zunächst alle Daten auf die unspezifische Hintergrundproliferation normalisiert, die in diesem Falle entsteht, wenn CD4⁺ T-Zellen sowohl primär als auch sekundär mit unbeladenen DC stimuliert werden. Der SI für diese unspezifische Proliferation wird als SI = 1 definiert. Anschließend, muss der SI der T-Zellen bestimmt werden, die primär unspezifisch mit unbeladenen DC stimuliert wurden und sekundär mit dem jeweiligen Kreuzallergen reaktiviert werden, hier: (Kontrolle → Bet v 1) bzw. (Kontrolle → Cor a 1). Dieser wird dann jeweils mit dem SI der T-Zellen verglichen, die primär allergenspezifisch voraktiviert wurden und mit dem homologen Allergen restimuliert werden, hier: (Cor a 1 → Bet v 1) und (Dau c 1 → Bet v 1), bzw. (Bet v 1 → Cor a 1) und (Dau c 1 → Cor a 1). Ist der SI dieser T-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle signifikant erhöht, so kann man von einer vorhandenen Kreuzreaktivität sprechen.

Im Folgenden werden die T-Zellantworten nach der Restimulation von insgesamt 15 Atopikern und 12 gesunden Kontrollen analysiert.

Betrachtet man die Restimulation mit Bet v 1 in der Gruppe der Allergiker, so ist zu erkennen, dass die identische sekundäre Stimulation (Bet → Bet; SI = 2,9) im Vergleich zur Kontrolle (Ktr. → Bet; SI = 1,5) einen signifikant erhöhten Stimulationsindex aufweist. Genauso verhält es sich mit den T-Zellen der Allergiker, die mit den Homologen Cor a 1 (Cor a 1 → Bet v 1; SI = 2,9) und Dau c 1 (Dau c 1 → Bet v 1; SI = 2,3) in der Primärkultur voraktiviert wurden. Auch hier ist der Anstieg der Proliferation verglichen mit der Kontrolle signifikant, man kann hier also von einer T-Zellkreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Cor a 1 sprechen (Abb. 4.9 oben, links).

Bei der Restimulation mit Cor a 1 sind die Ergebnisse ähnlich. Die mit dem identischen Allergen restimulierten T-Zellen (Cor a 1 → Cor a 1; SI = 2,7), und diejenigen, die primär mit Bet v 1 voraktiviert wurden (Bet v 1 → Cor a 1; SI = 2,5) haben beide im Vergleich zur Kontrolle (Ktr. → Cor a 1; SI = 1,1) eine signifikant gesteigerte Proliferation. Bei primär Dau c 1-stimulierten T-Zellen (Dau c 1 → Cor a 1; SI = 1,1) kann dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Die Proliferation liegt auf einer Ebene mit der Kontrolle, es gibt keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.9 oben, rechts). Eine Kreuzreaktivität ist hier nur zwischen Bet v 1 und Cor a 1 nachweisbar.

In der Gruppe der nichtallergischen Kontrollspender ist weder bei identischer Restimulation (Bet v 1 → Bet v 1; SI = 1,1 bzw. Cor a 1 → Cor a 1; SI = 1,1) noch bei Restimulation mit den jeweils homologen Allergenen (Cor a 1 → Bet v 1; SI = 1,1 bzw. Dau c 1 → Bet v 1; SI = 1,0 und Bet v 1 → Cor a 1; SI = 1,1 bzw. Dau c 1 → Cor a 1; SI = 1,1) ein signifikanter Effekt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Ktr. → Bet v 1; SI = 1,0 bzw. Kontrolle → Cor a 1; SI = 1,1) zu erkennen. Die Proliferation der Kontrollpopulationen, sowie die der identisch- und kreuzreaktivierten T-Zellen liegt auf einem Niveau. Es kann keine T-Zellkreuzreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.9 unten, rechts und links).

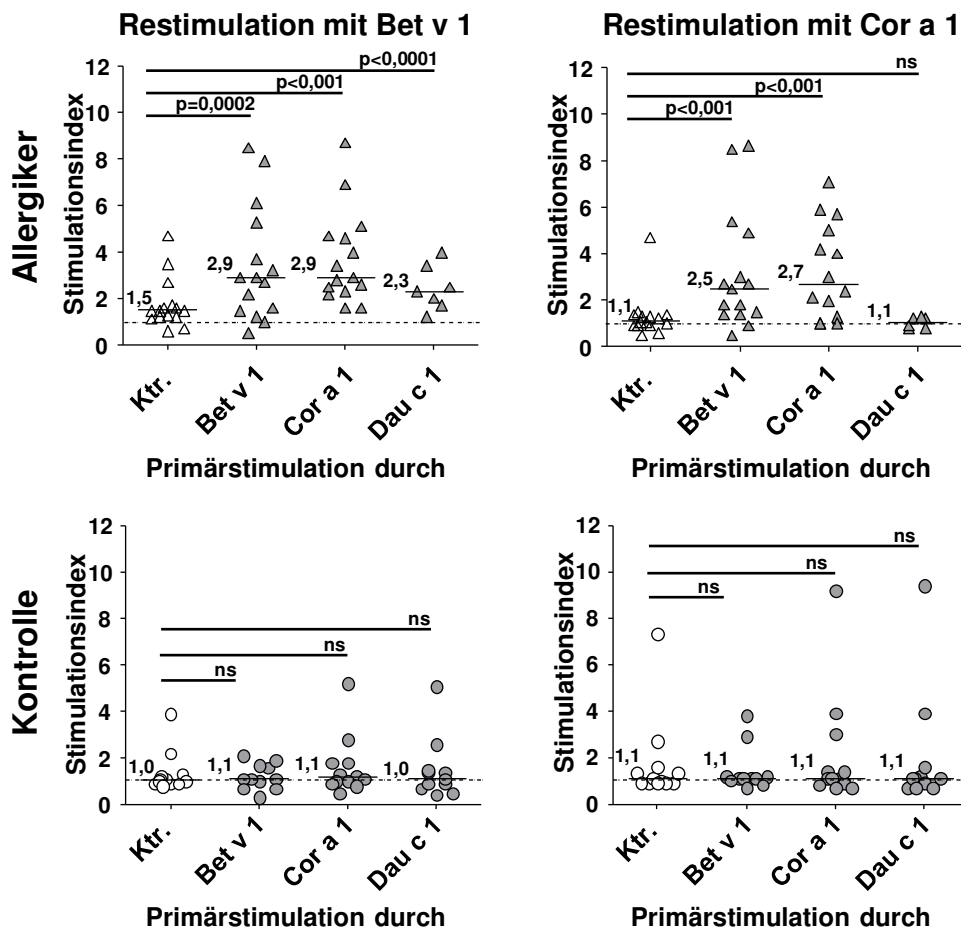


Abbildung 4.9 T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach Restimulation.

Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse der Restimulation mit Bet v 1 (links) und Cor a 1 (rechts) von Allergikern (n=15) (oben) und gesunden (n=12) (unten) Spendern. Der Stimulationsindex (SI) der allergenspezifischen Proliferation errechnet sich aus der Normalisierung auf die Proliferation, die durch unbeladene DC bei primär unspezifisch aktivierten T-Zellen induziert wird (SI = 1; schwarz gepunktete Linie). Signifikant: $p < 0,05$; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

Zur weiteren Analyse der T-Zellkreuzreaktivität und um einen genaueren Einblick in die individuelle T-Zellantwort der einzelnen allergischen Spender zu erlangen, werden die Daten der identischen Restimulation und der Restimulation mit dem jeweils homologen Allergen der einzelnen Probanden einer anderen Normalisierung unterzogen. Sie werden nicht wie oben gezeigt auf die Hintergrundproliferation (Kontrolle → Kontrolle) abgeglichen, sondern auf die Kontrollen (Kontrolle → Bet v 1) = 100 % (Abb. 4.10 links) und (Kontrolle → Cor a 1) = 100 % (Abb. 4.10 rechts).

Werden die Cor a 1-voraktivierten T-Zellen der allergischen Spender mit dem homologen Allergen Bet v 1 restimuliert (Cor a 1 → Bet v 1), so gibt es im Vergleich zur Kontrolle (Ktr. → Bet v 1) bei elf von 15 Probanden (A009, A018, A019, A037, A074, A076, A091, A094, A107, A120 und A126) eine signifikant erhöhte Proliferation. Somit weisen 73 % der Spender eine T-Zellkreuzreaktivität zwischen Cor a 1 und Bet v 1 auf. Die Analyse der mit Dau c 1 primär stimulierten und mit Bet v 1 sekundär aktivierten T-Zellen (Dau c 1 → Bet v 1) ergibt, dass bei fünf von sieben Spendern (A018, A019, A091, A094 und A120) eine relevante T-Zellantwort induziert werden kann. Es kann also bei 71 % dieser Probanden eine Kreuzreaktivität zwischen Dau c 1 und Bet v 1 gezeigt werden (Abb. 4.10, links).

Wird mit Cor a 1 restimuliert, so ist bei primär Bet v 1-stimulierten T-Zellen (Bet v 1 → Cor a 1) von Allergikern in 13 von 15 Fällen eine signifikante Erhöhung der Proliferation zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass 87 % dieser Atopiker eine T-Zellkreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Cor a 1 aufweisen. Sind die T-Zellen allerdings mit Dau c 1 voraktiviert (Dau c 1 → Cor a 1), kann lediglich bei einem Spender (A018) eine signifikant gesteigerte Proliferation festgestellt werden. Also haben nur 17 % der Spender eine kreuzreaktive T-Zellantwort zwischen Dau c 1 und Cor a 1 (Abb. 4.10, rechts).

Die beiden experimentellen Ansätze, zum einen die Restimulation mit Bet v 1 und zum anderen mit Cor a 1, zeigen, dass insgesamt alle 15 auf diese Weise analysierten Spender in mindestens einem der beiden Versuchsreihen eine T-Zellkreuzreaktivität zwischen den Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 aufzeigen (Bet v 1 → Cor a 1 oder Cor a 1 → Bet v 1) (Abb. 4.9 und Abb. 4.10).

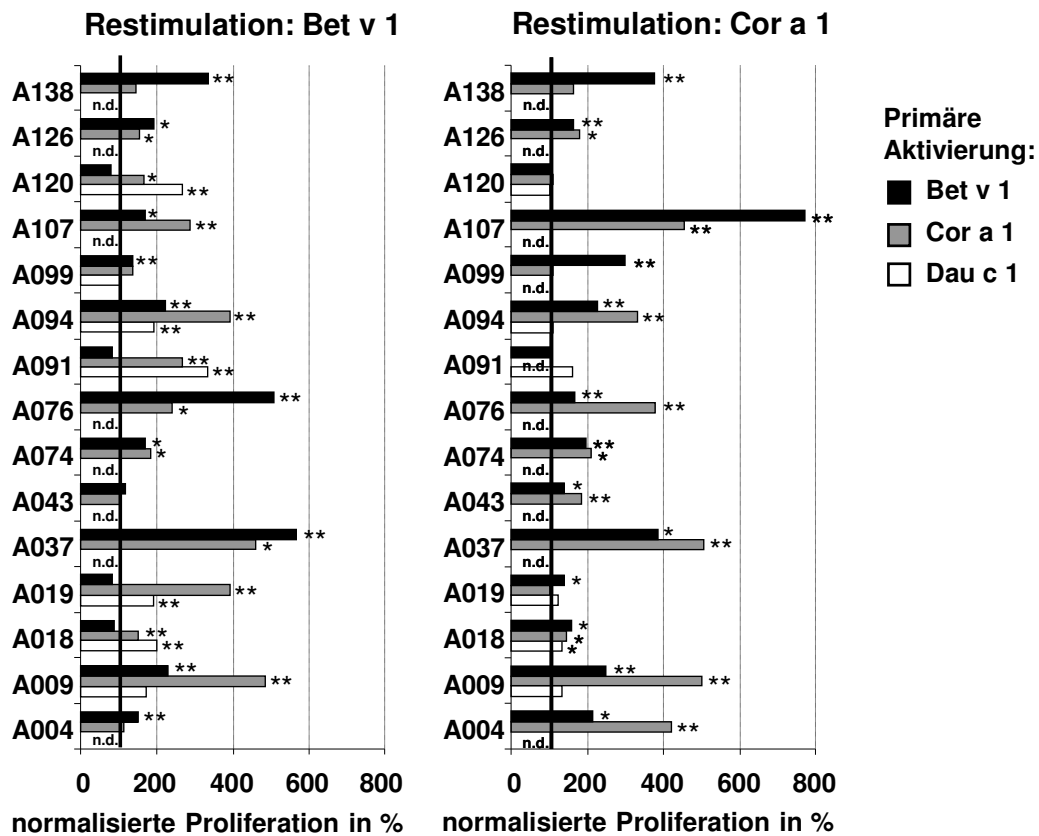


Abbildung 4.10 Individuelle T-Zellproliferation (^3H -Thymidinassay) nach Restimulation.

Gezeigt ist die individuelle T-Zellproliferation nach Restimulation mit Bet v 1 (links) und Cor a 1 (rechts). Die Daten sind auf die Proliferation von primär unspezifisch aktivierten T-Zellen, die mit dem jeweiligen Allergen restimuliert werden normalisiert ((Ktr. \rightarrow Bet v 1) = 100 % bzw. (Ktr. \rightarrow Cor a 1) = 100 %). Die errechneten Signifikanzen beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollen ((Ktr. \rightarrow Bet v 1) bzw. (Ktr. \rightarrow Cor a 1)) Schwarze Linie = 100 %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant; n.d. = nicht durchgeführt. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.5 Analyse der T-Zellantwort mittels Durchflusszytometrie

Der ^3H -Thymidinassay ist eine bewährte Standardmethode, um die Proliferation von CD4^+ T-Zellen in der Primärkultur und nach Restimulation zu messen. Jedoch ist dieses Verfahren in mancher Hinsicht limitiert.

Bei der Analyse der T-Zellkreuzreaktivität von Atopikern ist man mit diesem Assay nach der Restimulation nicht in der Lage zu unterscheiden, welche T-Zellen nach sowohl primärer als auch sekundärer, oder ausschließlich nach sekundärer Stimulation proliferieren. Eine Analyse auf Ebene der T-Zellsubpopulationen ist somit nicht möglich und das Ausmaß der T-Zellkreuzreaktivität innerhalb der Subpopulationen kann nicht bestimmt werden.

Die Proliferationsmessung im Durchflusszytometer mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Proliferationsfarbstoffen ermöglicht es nun, solche Subpopulationen zu differenzieren. Hierzu werden die CD4⁺ T-Zellen der Allergiker direkt vor der primären Aktivierung mit dem Proliferationsfarbstoff CellTrace Violet gefärbt. Vor der Restimulation werden diese zurück gewonnen und es wird zusätzlich eine Färbung mit CFSE durchgeführt. Neben der in der Arbeitsgruppe bereits häufig verwendeten und etablierten CFSE-Färbung wurden für die Etablierung dieser Methode weitere Proliferationsfarbstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen an T-Zellen getestet. Zum einen PKH26 (Sigma Aldrich, Stadt, Land), das die Membran von Zellen anfärbt. Dieser rot fluoreszierende Farbstoff erwies sich als nicht brauchbar, da bei der Messung im FACS an Tag 1 nach der Färbung im Histogramm keine distinkte Population zu erkennen war. Die einzelnen Proliferationszyklen konnten in den Folgetagen nicht nachverfolgt werden. Zum anderen wurden die beiden Proliferationsfarbstoffe eFluor670 (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) und CellTrace Violet (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) getestet, deren Funktionsweise auf dem Prinzip von CFSE beruht (siehe 3.14.1). Sowohl eFluor670 (max. Emission: 670 nm), als auch CellTrace Violet (max. Emission: 450 nm) sind beide für die Proliferationsmessung im Durchflusszytometer geeignet. Die Färbung erfolgt jeweils sehr homogen und die einzelnen Proliferationschritte können sehr gut differenziert werden. Dennoch wurde CellTrace Violet für die folgenden Versuche ausgewählt, da die Messung der Fluoreszenz mit dem violetten Laser des FACS-Gerätes erfolgt und so für weitere Analysen (z.B. intrazelluläres Zytokin-FACS) die am häufigsten verwendeten Fluoreszenzkanäle weiterhin zur Verfügung stehen.

4.5.1 Einfluss der Proliferationsfarbstoffe auf die Eigenschaften von T-Zellen

Vor Beginn der Versuchsreihe mit den Allergikern wird an CD4⁺ T-Zellen zunächst getestet, ob sich die Doppelfärbung mit CellTrace Violet und CFSE negativ auf die Viabilität und die proliferative Kapazität der T-Zellen auswirkt.

Der Einfluss der beiden Fluoreszenzfarbstoffe auf die Viabilität wird mit Hilfe von Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) analysiert. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches während der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite transloziert wird. 7-AAD ist hingegen ein Farbstoff, der nur in tote Zellen eindringen kann und dort in die DNA interkaliert. Die Annexin V/7-AAD doppelt positiven Zellen gelten als nicht mehr viabel.

Zur Austestung der Viabilität werden die CD4⁺ T-Zellen, die aus Buffycoat generiert wurden, primär und sekundär durch mit dem Recallantigen beladenen DC stimuliert, sodass auch hier eine relevante Proliferation induziert wird, wie sie in folgenden Versuchen durch die Stimulation mit Allergenen, hervorgerufen wird.

In dem einen gezeigten repräsentativen Beispiel (Abb. 4.11) ist der prozentuale Anteil nicht viabler T-Zellen an Tag 4 der Restimulation bei beiden T-Zellpopulationen, der ungefärbten und der Violet/CFSE-positiven, vergleichbar (14,2 % bzw. 12,1 % tote Zellen). Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abb. 4.11A). Sowohl CellTrace Violet als auch CFSE können parallel zur Messung der Proliferation im Durchflusszytometer eingesetzt werden, ohne die T-Zellviabilität negativ zu beeinflussen.

Um die proliferative Kapazität von Violet/CFSE-positiven T-Zellen zu bestimmen, werden sie primär mit Tetanustoxoid-beladenen DC aktiviert. Ein Teil der Zellen wird acht Tage später sekundär polyklonal mit α CD3 und α CD28 stimuliert, ein anderer Teil wird wie schon in der Primärkultur mit Tetanustoxoid-beladenen DC restimuliert.

An Tag 0 der Restimulation ist bei beiden T-Zellpopulationen ausschließlich die Proliferation zu beobachten, die durch die primäre Aktivierung der T-Zellen hervorgerufen wird. Es haben bereits 71,0 % bzw. 69,8% der Gesamtpopulation proliferiert (Abb. 4.11B oben). Werden die T-Zellen polyklonal reaktiviert, so proliferieren an Tag 4 nach der Restimulation bis zu 87 % der gesamten Population. Erfolgt die sekundäre Stimulation mit Tetanustoxoid, wird eine noch stärkere Proliferation induziert (92,8 %) (Abb. 4.11B unten). So sind fast alle T-Zellen trotz Doppelfärbung mit CellTrace Violet und CFSE in der Lage zu proliferieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Anwendung der beiden Proliferationsfarbstoffe keinen negativen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von CD4⁺ T-Zellen hat.

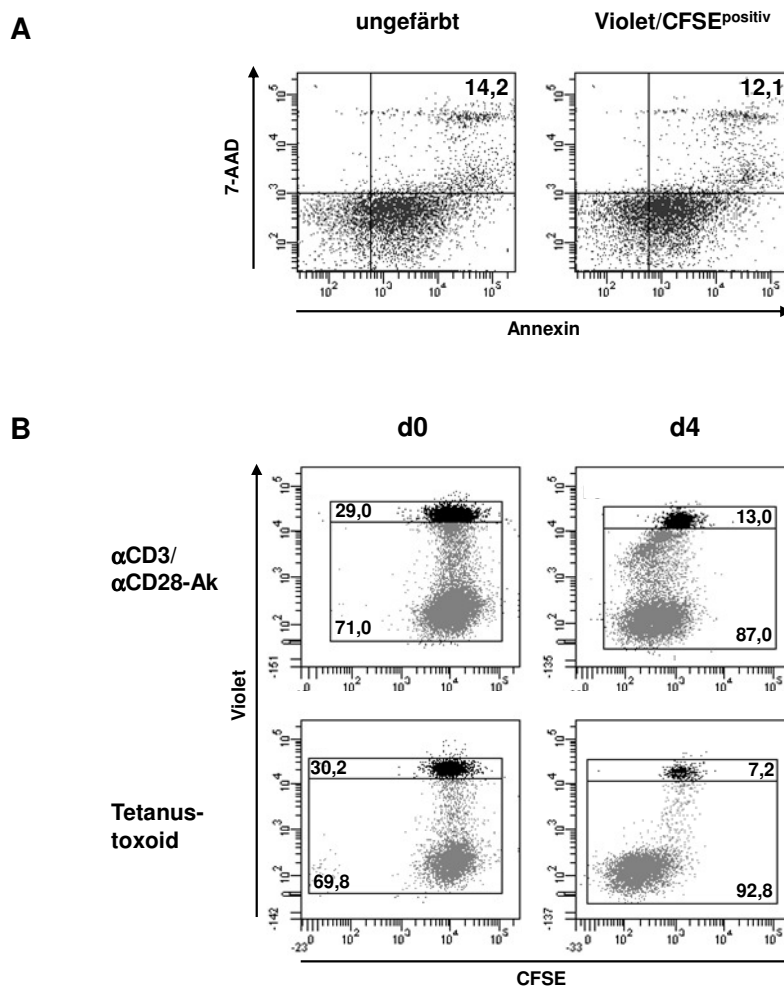


Abbildung 4.11 Einfluss der CellTrace Violet/CFSE-Doppelfärbung auf T-Zellen.

A. Viabilität: Gezeigt sind primär und sekundär mit Tetanustoxoid-beladenen DC-stimulierte CD4⁺ T-Zellen (ungefärbt bzw. primär Violet/sekundär CFSE^{positiv}) an Tag 4 der Restimulation. Angegeben ist der prozentuale Anteil toter Zellen (Annexin V/7-AAD positiv). B. Proliferative Kapazität. Dargestellt sind primär mit Tetanustoxoid-beladenen DC stimulierte CD4⁺ T-Zellen (primär Violet/sekundär CFSE^{positiv}) an Tag 0 und 4 der Restimulation mit den α CD3/ α CD28-Antikörpern (Ak) oder mit Tetanustoxoid-beladene DC. Angegeben ist der prozentuale Anteil nicht proliferierender (oberer Quadrant) bzw. proliferierender (unterer Quadrant) T-Zellen.

4.5.2 T-Zellproliferation in der Primärkultur

Nach Isolation der CD4⁺ T-Zellen von Allergikern werden diese vor ihrer primären Stimulation mit dem Proliferationsfarbstoff CellTrace Violet (Violet) gefärbt. Anschließend werden sie in einem ersten experimentellen Ansatz entweder mit Bet v 1-beladenen, oder unbeladenen Kontroll-DC aktiviert.

Betrachtet man exemplarisch einen Spender an Tag 4 der Primärkultur (Abb. 4.12A, links), so wird bei den Bet v 1-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu der unspezifischen

Kontrollgruppe eine relevante T-Zellproliferation induziert (Ktr. 1,3 %; Bet v 1: 2,7 %). Die zusammengefassten Ergebnisse von vier unabhängigen Spendern zeigen im Gegensatz zu der Kontrolle einen signifikanten Anstieg der allergenspezifischen Proliferation (Abb. 4.12A, rechts).

In einem weiteren Versuchsansatz werden die Violet-positiven T-Zellen der allergischen Spender mit Cor a 1-spezifischen bzw. unspezifischen DC zur Kontrolle in Primärkultur gesetzt. Als zusätzliche Kontrolle werden DC, die mit dem irrelevanten Nahrungsmittelallergen Ovalbumin (OVA) (Hühnereiweissallergen) beladen sind, zur T-Zellstimulation eingesetzt.

Wie schon bei der Primärstimulation mit Bet v 1 ist auch bei der Aktivierung mit Cor a 1 exemplarisch für einen Spender gezeigt (Abb. 4.12B, links) eine allergenspezifische Induktion der T-Zellproliferation zu erkennen. Im Vergleich zur Proliferation der beiden Kontrollen (Ktr. bzw. OVA: 4,7 % bzw. 4,2 %) ist die Cor a 1-induzierte Proliferation (11,0 %) deutlich erhöht (Abb. 4.12B, links). Kompiliert man die Daten von fünf unterschiedlichen Spendern, ist die allergenspezifische Proliferation im Gegensatz zu den beiden Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 4.12B, rechts).

Mit Hilfe des Proliferationsfarbstoffes CellTrace Violet kann mittels Durchflusszytometrie eine primäre allergenspezifisch induzierte Proliferation detektiert werden.

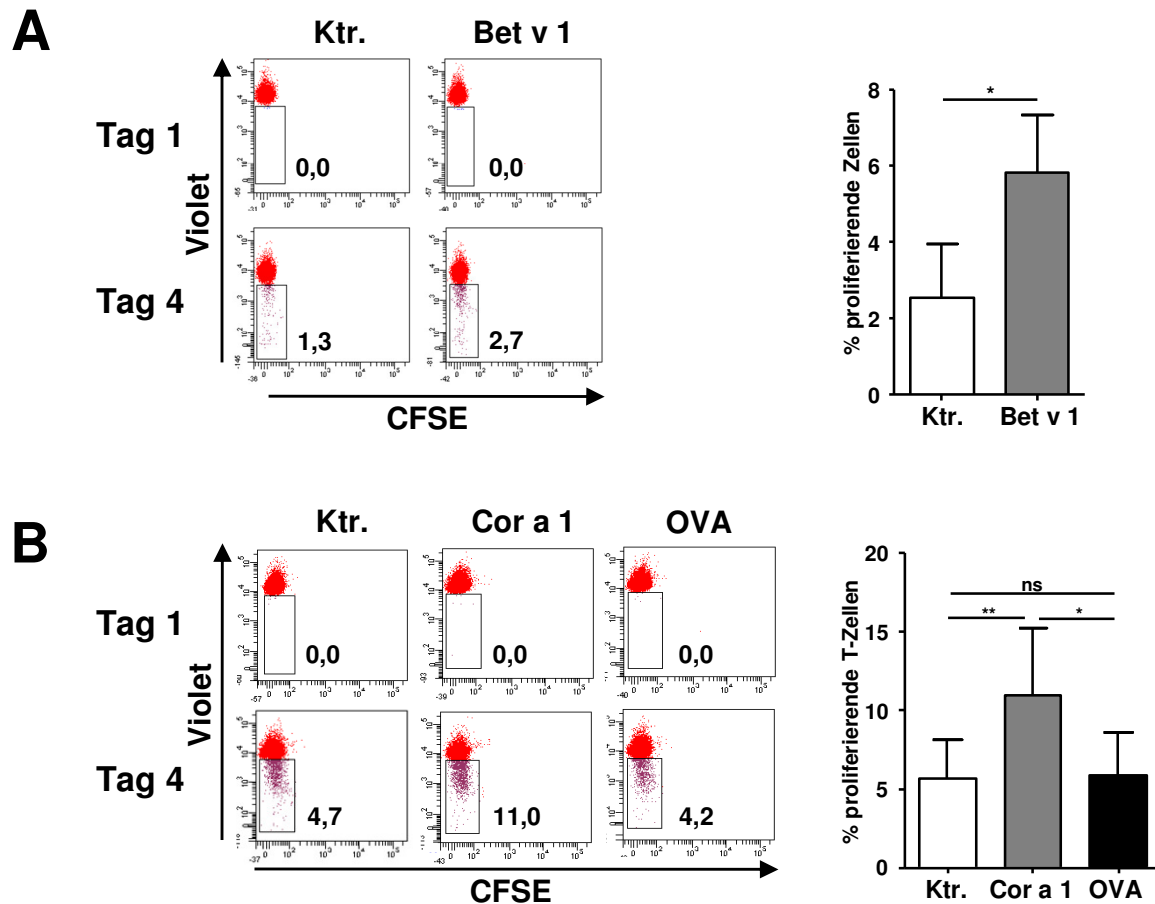


Abbildung 4.12 T-Zellproliferation (Durchflusszytometrie) nach primärer Stimulation.

Dargestellt ist die Proliferation von CellTrace Violet positiven $CD4^+$ T-Zellen nach primärer Stimulation mit Bet v 1 (A) oder Cor a 1 bzw. OVA (B) an Tag 1 und 4 von je einem exemplarischen Allergiker (A+B, links) sowie die zusammengefassten Ergebnisse von 4 (A, rechts) bzw. 5 (B, rechts) Allergikern. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil proliferierender T-Zellen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.5.3 T-Zellproliferation nach identischer und homologer Restimulation

Im Weiteren soll mit Hilfe der neuen durchflusszytometrischen Methode zum einen die identische Reaktivierung, vor allem aber die Kreuzreaktivität der T-Zellen im Hinblick auf definierte Subpopulationen analysiert werden, die vorher schon im 3H -Thymidinassay für die gesamte T-Zellpopulation gezeigt werden konnte.

Acht Tage nach der ersten Aktivierung werden die Violet-positiven T-Zellen der Atopiker wieder gewonnen und zusätzlich mit dem Proliferationsfarbstoff CFSE gefärbt. Im Anschluss daran werden diese Zellen restimuliert.

4.5.3.1 Restimulation von primär Bet v 1-spezifischen T-Zellen

Zunächst werden Bet v 1-spezifische CD4⁺ T-Zellen identisch (Bet v 1 → Bet v 1) oder mit dem homologen Allergen Cor a 1 (Bet v 1 → Cor a 1) restimuliert. Als Kontrollen dienen die T-Zellen, die unspezifisch voraktiviert wurden. Diese werden entweder mit unbeladenen oder mit Bet v 1- bzw. Cor a 1-spezifischen DC sekundär stimuliert ((Ktr. → Ktr.); (Ktr. → Bet v 1); (Ktr. → Cor a 1)).

Ist die Proliferation der Bet v 1-voraktivierten T-Zellen im Vergleich zu den unspezifisch voraktivierten T-Zellen hervorgerufen durch die Restimulation mit dem homologen Allergen Cor a 1 signifikant erhöht, so liegt eine T-Zellkreuzreaktivität vor.

In Abbildung 4.13A ist die T-Zellproliferation eines exemplarischen Spenders gezeigt. Man erkennt, dass die Kontrollen an Tag 4 nur zu einem geringen Prozentsatz proliferieren ((Ktr. → Ktr.): 3,0 %; (Ktr. → Bet v 1): 4,0 %; (Ktr. → Cor a 1): 4,6 %) (Abb. 4.13A, Tag 4, CFSE). Im Gegensatz dazu wird bei den Bet v 1-spezifischen T-Zellen sowohl durch die identische (Bet v 1 → Bet v 1), als auch die Kreuzrestimulation (Bet v 1 → Cor a 1) eine starke T-Zellproliferation von 9,6 % bzw. 9,4 % induziert.

Fasst man die Ergebnisse von drei voneinander unabhängigen Spendern zusammen und errechnet einen Stimulationsindex basierend auf den T-Zellen, die sowohl primär als auch sekundär mit unbeladenen DC stimuliert werden (Wert per Definition = 1) ergibt sich folgendes Bild: der Stimulationsindex (SI) und somit die Proliferation der sowohl identischen (Bet v 1 → Bet v 1) als auch der homologen Restimulation (Bet v 1 → Cor a 1) sind im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (für identische Restimulation (Bet v 1 → Bet v 1): (Ktr. → Ktr.) und (Ktr. → Bet v 1); für homologe Restimulation (Bet v 1 → Cor a 1): (Ktr. → Ktr.) und (Ktr. → Cor a 1)) signifikant erhöht (Abb. 4.13B).

Im Falle der Restimulation mit dem Kreuzallergen (Bet v 1 → Cor a 1) zeigt sich auch hier signifikant allergeninduzierte Proliferation bei den zusammengefassten Ergebnissen und damit die Kreuzreaktivität der reaktivierten T-Zellen, sodass das Ergebnis des repräsentativen Spenders bestätigt wird (Abb. 4.13A).

Zusätzlich kann durch diese Methode festgestellt werden, aus welcher T-Zellsubpopulation die in der Restimulation stark proliferierenden T-Zellen hervorgehen. Das heißt es kann gezeigt werden, ob sie entweder ausschließlich nach sekundärer Stimulation oder ob sowohl nach primärer als auch sekundärer Stimulation eine allergenspezifische Proliferation induziert wird. Im Falle der Restimulation mit dem homologen Allergen, hier Cor a 1, kann festgestellt werden, welche T-Zellen tatsächlich kreuzreaktiv, also Bet v 1/Cor a 1-reaktiv sind.

In Abbildung 4.13C, links sind die unterschiedlich stark proliferierenden T-Zellsubpopulationen von primär Bet v 1-stimulierten T-Zellen nach Restimulation mit dem homologen Allergen Cor a 1 (Bet v 1 → Cor a 1) an Tag 0/1 und Tag 4 eines Spenders dargestellt. Gezeigt ist zum einen die T-Zellsubpopulation, die sowohl nach Primär- als auch Restimulation nicht proliferiert (P3). Zum anderen ist die T-Zellsubpopulation gezeigt, die nach primärer Stimulation nur gering und nach sekundärer Stimulation nicht proliferiert (P4) (Abb. 4.13 C, links).

Verglichen werden nun die Subpopulation P3 an Tag 1 und Tag 4, bzw. die Subpopulation P4 an Tag 0/1 und Tag 4 nach Restimulation (Abb. 4.13C, rechts; n = 3). Dabei bilden P3 und P4 zusammen 100 % der gateden Zellen. Es ist zu erkennen, dass an Tag 4 nach der homologen Restimulation (Bet v 1 → Cor a 1) der prozentuale Anteil der gateden Zellen der einzelnen T-Zellsubpopulationen im Vergleich zu Tag 0/1 konstant geblieben ist. Die T-Zellen aus diesen beiden T-Zellsubpopulationen haben in der Restimulation nicht begonnen stark zu proliferieren. Die auf das Kreuzallergen hin proliferierenden T-Zellen gehören zu den Subpopulationen, die auch schon nach primären Stimulation mit Bet v 1 stark proliferiert hat. Somit sind die nach Restimulation stark proliferierenden T-Zellen, sowohl Bet v 1- als auch Cor a 1-reaktiv, sie sind Bet v 1/Cor a 1-kreuzreaktiv.

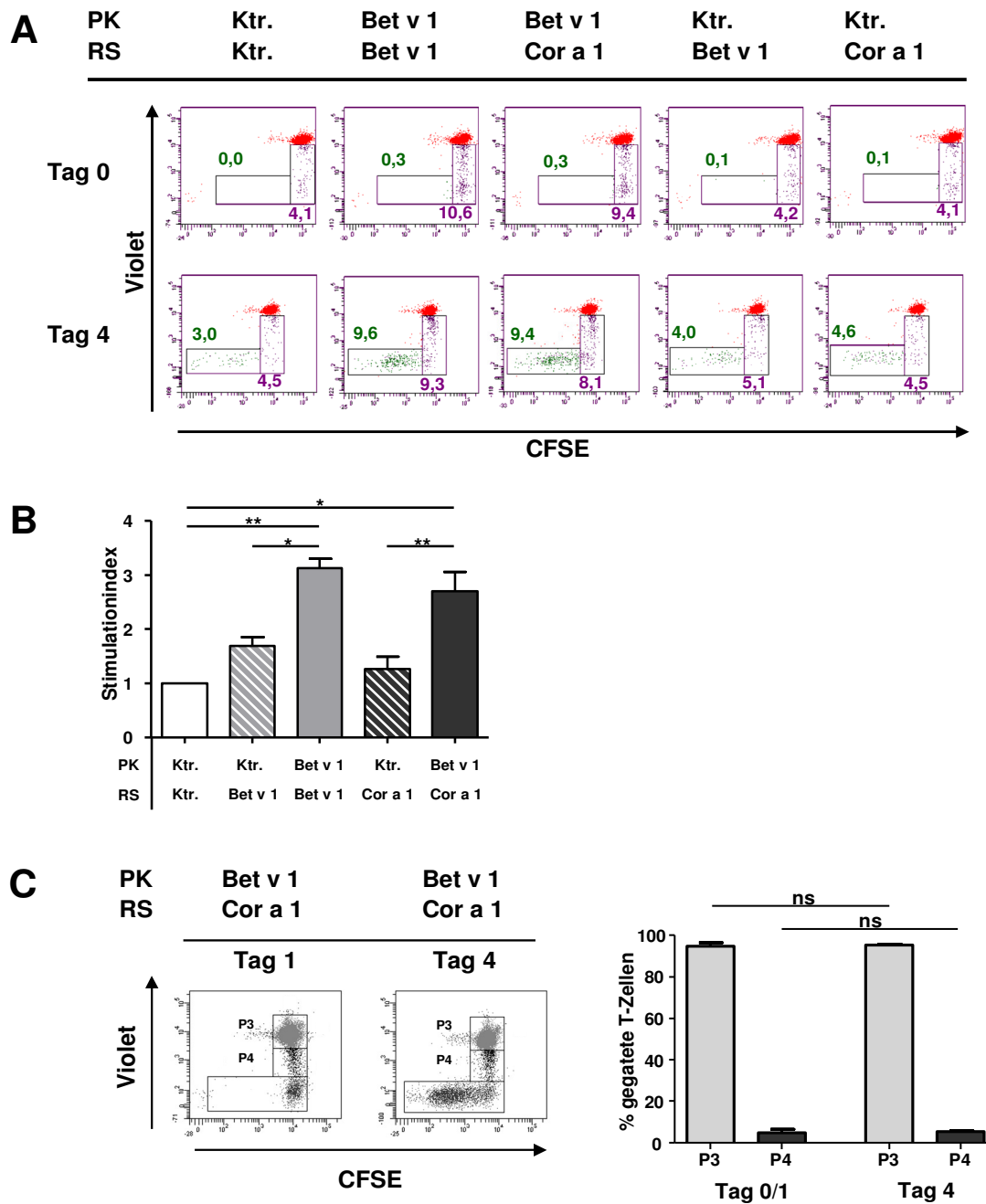


Abbildung 4.13 Proliferation (Durchflusszytometrie) von Bet v 1-spezifischen T-Zellen nach Restimulation.

Bet v 1-spezifisch und unspezifisch primär stimulierte (Primärkultur = PK) Violet/CFSE-doppelt positive T-Zellen von Allergikern werden mit Bet v 1-beladenen, Cor a 1-beladenen oder unbeladenen Kontroll-DC restimuliert (Restimulation = RS). Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Spenders; demonstriert ist der prozentuale Anteil proliferierender T-Zellen an Tag 0 und Tag 4 (A) sowie die zusammengefassten Ergebnisse von 3 unterschiedlichen Spendern an Tag 4, dargestellt als Stimulationsindices. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der Stimulationsindex SI bezieht sich auf die Proliferation der T-Zellen, die sowohl primär als auch sekundär mit unbeladenen Kontroll (Ktr.)-DC (PK Ktr. \rightarrow RS Ktr.) stimuliert werden, SI = 1 (B). Vergleich der nicht- (P3) und gering (P4) Bet v 1-reaktiven T-Zellen nach Restimulation mit Cor a 1 an Tag 0/1 und Tag 4 (C). Gezeigt ist das Ergebnis von einem repräsentativen Experiment (links) und die zusammengefassten Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten (rechts). P3 + P4 = 100 % gegatete T-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

4.5.3.2 Restimulation von primär Cor a 1-spezifischen T-Zellen

In einem nächsten Versuchsansatz werden die Cor a 1-voraktivierten CD4⁺ T-Zellen restimuliert, um auch die Kreuzreaktivität Cor a 1-spezifischer Zellen zu Bet v 1 zu testen (Abb. 4.14). Dazu wird entweder das identische Allergen Cor a 1 (Cor a 1 → Cor a 1) oder das Kreuzallergen Bet v 1 (Cor a 1 → Bet v 1) für die sekundäre Stimulation verwendet. Als Kontrolle dienen T-Zellen, die primär mit unbeladenen DC stimuliert werden und in der Restimulation entweder unspezifisch, oder mit Cor a 1 bzw. Bet v 1 restimuliert werden ((Ktr. → Ktr.); (Ktr. → Cor a 1); (Ktr. → Bet v 1)). Ist die Proliferation der Cor a 1-voraktivierten T-Zellen nach Restimulation mit Bet v 1 signifikant höher als bei unspezifisch voraktivierten T-Zellen, die auf dieselbe Weise restimuliert werden, dann liegt eine Kreuzreaktivität vor. Ergänzend wird das irrelevante Nahrungsmittelallergen OVA (siehe 4.5.2) als zusätzliche Kontrolle eingesetzt. Dabei werden mit OVA primär aktivierte T-Zellen entweder identisch (OVA → OVA) oder mit den relevanten Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 ((OVA → Cor a 1), (OVA → Bet v 1)) restimuliert (Abb. 4.14A und B).

Abbildung 4.14A zeigt exemplarisch die Daten von einem Spender. Werden die Cor a 1-spezifischen T-Zellen identisch mit Cor a 1 ((Cor a 1 → Cor a 1): 6,4 %) oder homolog mit Bet v 1 ((Cor a 1 → Bet v 1): 4,3 %) reaktiviert, ist an Tag vier im Vergleich zu den Kontrollen ((Ktr. → Ktr.): 1,1 %; (Ktr. → Cor a 1): 1,7 %; (Ktr. → Bet v 1): 1,8 %) eine stark erhöhte Proliferation zu beobachten (4.14A, Tag 4; CFSE). Betrachtet man ergänzend die OVA-Kontrollen, so ist an Tag vier nach Restimulation mit Bet v 1 und Cor a 1 keine relevante Proliferation zu beobachten ((OVA → Cor a 1): 0,3 %; (OVA → Bet v 1): 0,2 %) (Abb. 4.18A). Diese Daten zeigen eine Kreuzreaktivität der primär Cor a 1-stimulierten T-Zellen mit dem homologen Allergen Bet v 1, die durch die zusammengefassten Daten von vier Spendern bestätigt werden kann. Zur besseren Vergleichbarkeit wird ein Stimulationsindex, basierend auf den T-Zellen, die sowohl primär als auch sekundär unspezifisch stimuliert wurden, errechnet (Wert per Definition = 1).

Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ((Ktr. → Ktr.), (OVA → OVA), (Ktr. → Cor a 1), (OVA → Cor a 1)) ist die Proliferation der identisch restimulierten T-Zellen (Cor a 1 → Cor a 1) signifikant erhöht. Genauso verhält es sich mit den kreuzstimulierten T-Zellen (Cor a 1 → Bet v 1). Auch hier ist der Stimulationsindex verglichen mit den entsprechenden Kontrollen ((OVA → OVA), (Ktr. → Bet v 1), (OVA → Bet v 1)) signifikant erhöht. Hierbei liegt das Hauptaugenmerk auf der Kontrolle (Ktr. → Bet v 1). Der im Vergleich dazu signifikant gesteigerte Stimulationsindex der homologen Restimulation (Cor a 1 → Bet v 1) ist ein Hinweis auf die Kreuzreaktivität der T-Zellen.

Wie schon in 4.5.3.1 ist es nun auch hier möglich zu ermitteln, aus welcher T-Zellsubpopulation die nach homologer Restimulation, hier mit Bet v 1, stark proliferierenden T-Zellen entstammen. Es kann festgestellt werden, ob sie tatsächlich nach primärer und sekundärer Stimulation und somit Cor a 1/Bet v 1-kreuzreaktiv sind, oder ob sie ausschließlich nach sekundärer Stimulation proliferieren.

Dargestellt sind in Abbildung 4.14C, links die unterschiedlich stark proliferierenden Subpopulationen von primär Cor a 1-stimulierten T-Zellen nach Restimulation mit dem Kreuzallergen Bet v 1 (Cor a 1 → Bet v 1) an Tag 1 und Tag 3 eines repräsentativen Spenders. Es ist die T-Zellsubpopulation zu erkennen, die weder nach primärer noch sekundärer Stimulation proliferiert (P3) und jene, die ausschließlich nach Primärstimulation in geringem Ausmaß proliferiert (P4) (Abb. 4.14C, links).

Betrachtet man nun die Subpopulation P3 bzw. P4 an Tag 1 und Tag 4 nach Restimulation (Abb. 4.14C, rechts; n = 4; P3 + P4 = 100 % der gegateten T-Zellen), so stellt man fest, dass der prozentuale Anteil der gegateten T-Zellen im Verlaufe der Zeit in beiden Subpopulationen konstant bleibt und sich nicht signifikant ändert. Die nach Restimulation mit dem Kreuzallergen Bet v 1 stark proliferierenden Zellen entstammen nicht aus diesen beiden Subpopulationen, sondern aus der bereits nach primärer Stimulation mit Cor a 1 hoch reaktiven T-Zellsubpopulation. Die hier nach homologer Restimulation stark proliferierenden T-Zellen sind Cor a 1/Bet v 1-kreuzreaktiv (Abb. 4.14C, rechts).

Mit Hilfe der neuen Methode der Proliferationsmessung, die auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie basiert, ist es möglich kreuzreaktive T-Zellsubpopulationen zu identifizieren und somit die Kreuzreaktivität zwischen den Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 auf Einzelzellebene darzustellen, was vorher mittels ³H-Thymidinassay nicht möglich war.

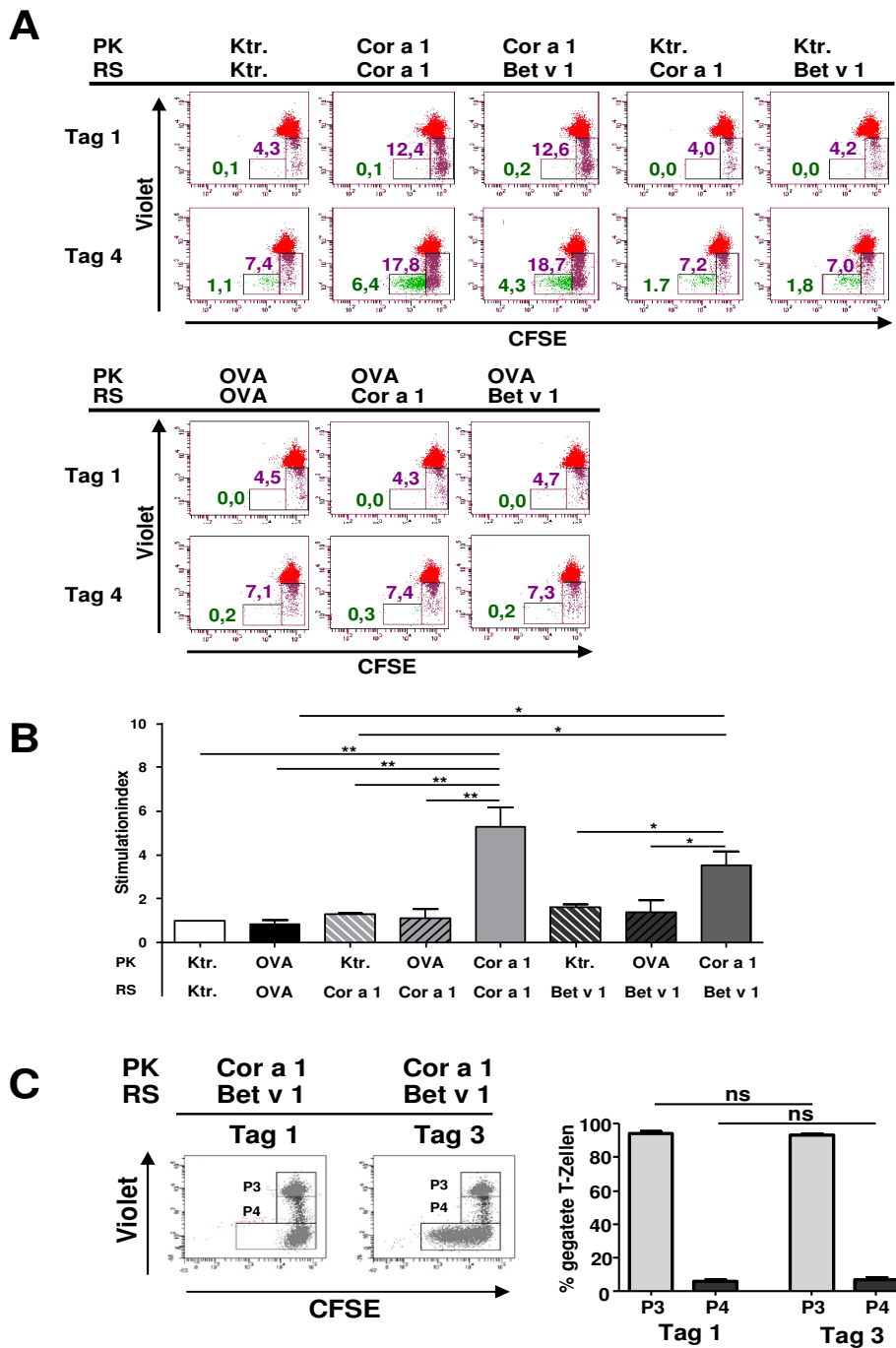


Abbildung 4.14 Restimulation (Durchflusszytometrie) von Cor a 1-spezifischen T-Zellen.

Cor a 1-spezifisch, unspezifisch bzw. OVA-spezifisch primär stimulierte (Primärkultur = PK) Violet/CFSE-doppelt positive T-Zellen von Allergikern werden mit Bet v 1-beladenen oder unbeladenen bzw. OVA-beladenen Kontroll-DC restimuliert (Restimulation = RS). Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Spenders, dargestellt ist der prozentuale Anteil proliferierender T-Zellen an Tag 1 und Tag 4 (A) sowie die zusammengefassten Ergebnisse von 4 unterschiedlichen Spendern an Tag 3/4, dargestellt als Stimmulationsindices, gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. Der Stimmulationsindex SI bezieht sich auf die Proliferation der T-Zellen, die sowohl primär als auch sekundär mit unbeladenen Kontroll (Ktr.)-DC (PK Ktr. \rightarrow RS Ktr.) stimuliert werden, SI = 1. (B). Vergleich der nicht- (P3) und niedrig (P4) reaktiven Cor a 1-spezifischen T-Zellen nach Restimulation mit Bet v 1 an Tag 1 und Tag 3/4 (C). Dargestellt sind das Ergebnis von einem repräsentativen Experiment (links) und die zusammengefassten Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten (rechts). P3 + P4 = 100 % gegatete T-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant. (Abbildung modifiziert nach Hofmann et al.⁶⁰)

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit werden 20 atopische Spender mit einer Pollenallergie gegen Birke und einer assoziierten Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten bezüglich ihrer allergenspezifischen IgE-Antwort, T-Zellantwort und vor allem bezüglich ihrer T-Zellkreuzreaktivität analysiert. Verwendet werden hierzu primäre CD4⁺ T-Zellen in einem Zellkultursystem ohne die Zugabe von exogenem IL-2, um einen unspezifischen Hintergrund möglichst gering zu halten. Außerdem werden bei der Analyse der Kreuzreaktivität zwei unterschiedliche Methoden der Proliferationsmessung angewandt: zum einen der schon lange etablierte und bewährte ³H-Thymidinassay und zum anderen eine neue auf Durchflusszytometrie und dem Einsatz von zwei unterschiedlichen Proliferationsfarbstoffen basierende Methode, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelt wurde.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die detaillierte Analyse der T-Zellkreuzreaktivität der Spenderkohorte zwischen den rekombinanten Allergenen Bet v 1.0101, Cor a 1.0401 und Dau c 1.0104.

5.1 Allergeneinfluss auf dendritische Zellen

Zur Analyse der allergenspezifischen T-Zellantwort und der T-Zellkreuzreaktivität im Weiteren werden in der vorliegenden Arbeit humane autologe DC verwendet, die aus Monozyten der Allergiker und gesunden Spendern generiert werden. Bereits in vorangegangenen Studien werden monozytengenerierte DC zu Analyse Zwecken bezüglich der allergenspezifischen T-Zellantwort eingesetzt⁶⁷⁻⁷¹.

Vor Beginn der eigentlichen Experimente mit den allergischen und nichtallergischen Spendern musste zunächst evaluiert werden, ob die Beladung der dendritischen Zellen mit den rekombinanten Allergenen Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 (20 µg/ml) einen nachteiligen Effekt auf die Reife der DC hat oder gar zu einer Ausreifung der Zellen führt, was die Ergebnisse der T-Zellproliferation negativ beeinflussen könnte. Des Weiteren wird der Einfluss der rekombinanten Allergene auf die Reinheit der antigenpräsentierenden Zellen untersucht.

Zur Bestimmung der Reife werden mittels Durchflusszytometrie der Reifemarker für dendritische Zellen CD83⁶² sowie die kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie CD80 und CD86⁶¹ betrachtet. Zusätzlich wird die Oberflächenexpression von HLA-DR⁶³, einem MHC II-Molekül, gemessen. Vergleicht man die Expression dieser Oberflächenmoleküle

auf unbeladenen dendritischen Zellen, die zur Kontrolle dienen, mit ihrer Expression auf den allergenbeladenen dendritischen Zellen, so ist kein Unterschied in der Ausreifung der verschiedenen DC-Populationen zu erkennen. Der prozentuale Anteil positiver Zellen ist durch alle Populationen hinweg konstant (siehe Abb. 4.2A). Zu demselben Ergebnis kommen bereits zwei andere Studien von Smole et al.^{71,72}. Verwendet werden dort ebenfalls wie in der vorliegenden Arbeit aus Monozyten generierte DC. Sie werden allerdings im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit angewandten Protokoll (siehe 3.10) lediglich mit TNF- α und IL-1 β oder alternativ mit LPS (Lipopolysaccharide) ausgereift. Beladen werden die DC in diesen beiden Studien mit unterschiedlichen rekombinanten Allergenen, z.B. mit diverse Isoformen des Birkenpollenallergens Bet v 1 (Bet v 1.0101, Bet v 1.1001, Bet v 1.0401), mit dem Apfelallergen Mal d 1.0108, dem Sellerieallergen Api g 1.0101 oder dem Karottellallergen Dau c 1.0103. Auch hier ist die Ausreifung der DC ausschließlich von der Zugabe des Reifungscocktails abhängig und wird nicht durch die Beladung mit rekombinanten Allergenen induziert.

Die Überprüfung der Reinheit der dendritischen Zellen erfolgt durch die Analyse der Oberflächenmoleküle CD2⁶⁴, CD14⁶⁵ und CD19⁶⁶. Dadurch soll ermittelt werden, ob die DC-Populationen mit T-Zellen, Monozyten oder B-Zellen verunreinigt sind. Es kann festgestellt werden, dass keiner dieser Marker durch die Allergenbeladung im Vergleich zu der unbeladenen DC-Population heraufreguliert wird (siehe Abb. 4.2B). Es wird also keine Veränderung der Reinheit der DC-Population in Hinblick auf eine Kontamination mit T-, B-Zellen oder Monozyten durch die Allergengabe induziert.

Da weder ein nachteiliger Effekt durch die Beladung mit den rekombinanten Allergenen auf die Ausreifung noch auf die Reinheit der DC festzustellen ist, können die rekombinanten Allergene für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche eingesetzt werden.

5.2 Zytokinanalyse

Um die Art der T-Zellantwort der allergischen Spendergruppe festzustellen, werden an Tag 3 der Primärkultur Kulturüberstände von den jeweiligen allergenspezifischen T-Zellpopulationen (Bet v 1, Cor a 1, Dau c 1) sowie von den unspezifischen Kontroll-T-Zellen gewonnen. Analysiert werden die Konzentration der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, von IL-9, das sowohl von Th2- als auch von Th9-Zellen sezerniert wird^{73,74}. Desweiteren wird die Konzentration des Th1-Zytokins IFN- γ , des regulatorischen Zytokins

IL-10 sowie von IL-2 ermittelt, welches das Wachstum von aktivierten T-Zellen induziert, aber auch eine kritische Rolle bei der Aufrechterhaltung von regulatorischen T-Zellen (Treg) in der Peripherie spielt⁷⁵. Auch das proinflammatorische Zytokin IL-17, das schon bei Patienten mit allergischen Erkrankungen wie Asthma nachgewiesen werden konnte^{73,76,77}, wird analysiert. Verglichen werden die erhobenen Daten mit den Ergebnissen von gesunden Spendern.

Es kann festgestellt werden, dass in der Gruppe der Atopiker durch die Allergene Bet v 1 und Cor a 1 die Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 signifikant und allergenspezifisch induziert werden, wobei IL-5 hier das dominierende Zytokin ist. Ihre allergenspezifische Induktion kann bereits in anderen Studien nachgewiesen werden, wobei auch dort die Produktion von IL-5 höher ist als die von IL-13^{71,72}.

Durch die Stimulation der T-Zellen mit Dau c 1 kann zwar eine tendenziell gesteigerte Sezernierung von IL-5 und IL-13 festgestellt werden, allerdings ist diese nicht signifikant. Diese Tatsache spiegelt auch die diagnostischen Daten der Atopiker wider. Eine Allergie gegen Karotten ist im Gegensatz zu einer Birkenpollen- oder Haselnussallergie weitaus weniger verbreitet und ausgeprägt (siehe Tab. 4.1 und Abb. 4.1).

Im Gegensatz zu anderen Studien sind beide Zytokine in der Nichtallergikerkohorte nicht nachweisbar^{77,78}. In der Studie von Devos et al.⁷⁸ wird zur Stimulation von PBMC ein Allergenextrakt der Hausstaubmilbe verwendet. Durch diese Stimulation kann IL-5 bei 24 % und IL-13 sogar bei 53 % der gesunden Spender mittels ELISA-Messung ermittelt werden. In der Studie von Xie et al.⁷⁷ werden PBMC mit einem Allergenextrakt der Erdnuss stimuliert. Das Zytokinniveau wird auf mRNA-Ebene analysiert. Auch hier kann in der Gruppe der gesunden Spender IL-5 und IL-13 nachgewiesen werden. Dabei ist IL-5 um das 21-fache und IL-13 um das 7,8-fache im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle erhöht. In diesen beiden Studien werden für die Zytokinanalysen allerdings PBMC in ihrer Gesamtheit und nicht aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen verwendet. Somit kann durch die Verwendung von PBMC eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen an der Zytokinproduktion beteiligt sein. Das kann zur Folge haben, dass in den Studien von Devos et al. und Xie et al. auch in der Gruppe der gesunden Spender IL-5 und IL-13 detektiert werden kann.

IL-4, ein prominentes Th2-Zytokin, kann in unserem System mittels ELISA nicht nachgewiesen werden. Dies mag daran liegen, dass in der vorliegenden Studie mit primären T-Zellen gearbeitet wird, die nicht mehrfach stimuliert werden, wodurch möglicherweise die Produktion von IL-4 induziert werden könnte. Dies bestätigen auch vorhergehende Arbeiten von Smole et al.^{71,72}, die durch eine einmalige Aktivierung von

CD4⁺ T-Zellen durch Bet v 1- oder Api g 1-spezifische DC ebenfalls kein IL-4 detektieren können. Im Kontrast dazu stehen allerdings die Arbeiten von Ebner et al.⁷⁹, Fritsch et al.³⁷ und Bohle et al.³³. Hier kann in T-Zelllinien und T-Zellklonen nach wiederholter allergenspezifischer Stimulation das Th2-Zytokin nachgewiesen werden.

IL-9, das bei allergischen Typ I Erkrankungen, vor allem bei allergischem Asthma, immer mehr in den Vordergrund rückt^{73,74,78}, wird in der Gruppe der Allergiker durch die Stimulation mit Bet v 1, Cor a 1 und auch Dau c 1 signifikant und allergenspezifisch induziert. Es wird hier in einem ähnlichen Niveau wie IL-13 sezerniert. In der Gruppe der Nichtallergiker kann IL-9 nicht detektiert werden. In den Studien von Devos et al.⁷⁸ und Xie et al.⁷⁷ ist IL-9 als stärkstes Unterscheidungsmerkmal zwischen Atopikern und nicht hypersensitiven Spendern beschrieben. Denn in beiden Arbeiten können im Gegensatz zu der vorliegenden Studie jeweils bei den gesunden Spendern auch die Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 auf geringem Niveau allergenspezifisch induziert werden. Bei Devos et al. ist IL-9 jedoch das einzige dieser drei Zytokine, welches fast ausschließlich bei Atopikern detektiert werden kann und als einziges das Ausmaß der klinischen Symptome der einzelnen Patienten widerspiegelt⁷⁸. Xie et al. zeigt, dass die Expression der *IL-9* mRNA im Allergiker um den Faktor 28 höher ist als in einem Nichtallergiker, wobei die *IL-5* mRNA Expression im Gegensatz dazu im Atopiker nur um das 21-fache erhöht ist als in der gesunden Kontrollgruppe. So wird auch in der Studie von Xie et al. bei dem Vergleich zwischen Atopikern und gesunden Kontrollen IL-9 als das dominierende Zytokin angesehen, welches auf eine vorhandene Typ I Allergie hinweist⁷⁷.

In der vorliegenden Arbeit ist IL-9 nicht das „atopieentscheidende“ Kriterium, hier ist die allergenspezifische IL-5-Sezernierung bei Atopikern im Durchschnitt etwa um den Faktor 3,4 höher als die des Zytokins IL-9. Somit ist IL-5 in dieser Studie das dominierende Zytokin bei den allergischen Spendern (siehe Abb. 4.7A).

Um einen noch genaueren Einblick in das Zytokinprofil und die damit verbundene T-Zellantwort der Birkenpollenallergiker mit assoziierter Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten zu erlangen, wird zusätzlich das klassische Th1-Zytokin IFN- γ analysiert. Es kann festgestellt werden, dass sowohl die T-Zellen der allergischen als auch der gesunden Spendergruppe in vergleichbarer Menge IFN- γ sezernieren (siehe Abb. 4.7B).

Da beide Gruppen im selben Maße IFN- γ produzieren ist es interessant, das Verhältnis von IL-5 (Th2-Zytokin) zu IFN- γ (Th1-Zytokin) innerhalb der beiden Spendergruppen miteinander zu vergleichen. Dabei stellt sich heraus, dass das Verhältnis bei den

Atopikern im Vergleich zu den Nichtallergikern durchweg signifikant höher ist (siehe Abb. 4.8). Dies lässt schließen, dass die T-Zellantwort bei den Allergikern deutlich durch das Th2-Zytokin IL-5 dominiert ist und IFN- γ dabei wohl keine entscheidende Rolle spielt.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die T-Zellantwort der Allergiker eine robuste Th2-Antwort ist, die ohne die Beteiligung von IL-4 maßgeblich durch die Sezernierung von IL-5 geprägt ist und durch die Produktion von IL-9 und IL-13 begleitet wird. Aufgrund des hohen Verhältnisses von IL-5 zu IFN- γ im Allergiker steht die leicht erhöhte Produktion von IFN- γ nicht im Widerspruch zu dieser Th2-Antwort.

5.3 Kreuzreaktivitäten

Nach der Ermittlung der Art der T-Zellantwort der Atopikerkohorte durch die Analyse des Zytokinprofils soll nun genauer auf die Kreuzreaktivität zwischen den einzelnen Allergenen eingegangen werden.

Sie existiert auf zwei unterschiedlichen Ebenen, die voneinander unabhängig sein können, nämlich auf Ebene des IgE (B-Zellkreuzreaktivität) und auf T-Zellebene (T-Zellkreuzreaktivität)²⁴. Hier werden nun die beiden unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten einer genaueren Betrachtung unterzogen, wobei die T-Zellkreuzreaktivität im Zentrum dieser Arbeit stehen soll.

Wie schon in 1.4 beschrieben, beruht die Kreuzreaktivität auf Homologien, also strukturellen Gemeinsamkeiten, die hauptsächlich bei Allergenen derselben Proteinfamilie vorkommen^{35,38,40}. Im Fokus stehen hier Allergene der PR-10-Familie, nämlich Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1, die ein hohes Maß an ähnlichen bzw. identischen Aminosäuresequenzen aufweisen^{27,33,38}. Haselnuss- (Cor a 1) und Karottenallergen (Dau c 1), die eine molekulare Masse von 17,4 kDa (160 Aminosäuren) bzw. 16,1 kDa (153 Aminosäuren) besitzen^{34,80}, teilen sich 67 % bzw. 38 % identische Aminosäuren mit dem Hauptallergen der Birke Bet v 1^{35,44,80}. Ihre Ähnlichkeit zu Bet v 1 beträgt 79 % bzw. 57 %³⁴.

Die Kreuzreaktivität zwischen dem Birkenpollenallergen und den Allergenen aus Nahrungsmitteln der Familie der Rosacea bzw. Apiacea wird auch „birch-fruit-vegetable syndrome“ genannt^{24,27}. Weiterhin sind diverse andere Kreuzallergien eines Pollenallergens in Kombination mit bestimmten Nahrungsmittelallergenen bekannt. Erwähnenswert ist hierbei das „Beifuß-Sellerie-Gewürz Syndrom“^{29,39} und das „Ambrosia-Banane-Melone Syndrom“³⁹.

5.3.1 IgE-Kreuzreaktivität

Bei der Bestimmung der IgE-Reaktivitäten gegen die rekombinanten Allergene Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 sowie gegen die Extrakte von Birkenpollen, Haselnüssen und Karotten mittels kommerziellem bzw. experimentellem ImmunoCAP-Test innerhalb der Allergikergruppe kann festgestellt werden, dass jeder Allergiker der Kohorte gegen Birkenpollen und mindestens gegen eines der beiden Nahrungsmittelallergene aus der PR-10 Familie sensibilisiert ist, auch wenn die Sensibilisierung gegen Karotte geringer ausfällt (Abb. 4.1 und Tab. 4.1).

Betrachtet man die einzelnen IgE-Reaktivitäten in Korrelation zueinander, so zeigt sich das unterschiedliche Ausmaß der Kreuzreaktivität auf B-Zellebene zwischen Pollenallergen und jeweiligem Nahrungsmittelallergen. Es fällt auf, dass die Korrelation zwischen Birkenpollenextrakt/Bet v 1 und Haselnussextrakt/Cor a 1 im Gegensatz zu Birkenpollenextrakt/Bet v 1 und Karottenextrakt/Dau c 1 hochsignifikant ist (Abb. 4.3). Erklären lässt sich dieses Phänomen durch die unterschiedlich ausgeprägte Identität bzw. Ähnlichkeit der jeweiligen Allergene zueinander. Bet v 1 und Cor a 1 sind sich strukturell sehr viel ähnlicher bzw. identischer als Bet v 1 und Dau c 1^{34,35,44,80} (siehe 5.3).

Die hohe Korrelation zwischen Bet v 1 und Cor a 1 und die Tatsache, dass in den folgenden Experimenten ausschließlich die rekombinanten Allergene und nicht die Extrakte verwendet werden, ist ausschlaggebend dafür, die IgE-Kreuzreaktivität zwischen diesen beiden rekombinanten Allergenen und die jeweilige IgE-Spezies (Bet v 1- bzw. Cor a 1-reaktives IgE) einer genaueren Betrachtung zu unterziehen.

Hierzu werden dosisabhängige IgE-Inhibitions-ELISAs (siehe 3.6) im Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt. Verwendet werden die Seren von den Allergikern mit der höchsten IgE-Reaktivität gegen das jeweilige Allergen.

Es kann gezeigt werden, dass die Bindung der Bet v 1-reaktiven IgE-Spezies an immobilisiertes Bet v 1 durch die Präinkubation mit löslichem Bet v 1 maximal inhibiert werden kann (Abb. 4.4, oben). Wird im Gegensatz dazu Cor a 1 als Inhibitor verwendet, so kann zwar auch hier das Bet v 1-reaktive IgE inhibiert werden, allerdings maximal nur zu 23 % – 75 %. Vergleicht man diese Ergebnisse mit der Analyse des Cor a 1-reaktiven IgE, so fällt auf, dass sowohl die Präinkubation mit Bet v 1 als auch mit Cor a 1 zu seiner maximalen Inhibition führt (Abb. 4.4, unten).

Zwei vorangegangene Studien^{32,41}, die ebenfalls IgE-Inhibitionsexperimente, einmal mittels Immunoblotting³² und einmal mittels ELISA⁴¹ durchgeführt haben, zeigen ähnliche Ergebnisse, jedoch unter Verwendung anderer Nahrungsmittelallergene als in der

vorliegenden Studie. Verwendet werden dort neben Bet v 1 homologe Nahrungsmittelallergene aus der PR-10 Familie, nämlich Api g 1 (Sellerie)³² und Pru av 1 (Kirsche)⁴¹. Die beiden Proteine haben eine molekulare Masse von 16,2 kDa bzw. 17,7 kDa und bestehen aus 153 bzw. 159 Aminosäuren³⁵. Dabei sind Api g 1 und Pru av 1 zu 40 % bzw. 59 % identisch und zu 61 % bzw. 74 % ähnlich mit Bet v 1³⁴. In beiden Studien ist die Präinkubation der Seren mit Bet v 1 dazu in der Lage die Bindung der homolog reaktiven IgE-Spezies (Api g 1- bzw. Pru av 1-reaktives IgE) zu einem sehr hohen Prozentsatz zu inhibieren. Die umgekehrte Reihenfolge, also die Präinkubation mit dem jeweiligen Nahrungsmittelallergen (Api g 1 bzw. Pru av 1) bewirkt jedoch keine, oder nur eine mittelmäßige Inhibition der Bindung von Bet v 1-reaktivem IgE^{32,41}.

Zusätzlich wird in der vorliegenden Arbeit die relative Potenz der löslichen Inhibitoren Bet v 1 und Cor a 1 ermittelt (durchgeführt vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI)), die die Bindung von Cor a 1-reaktivem IgE blockieren sollen (Abb. 4.4, unten rechts). Obwohl beide Inhibitoren die Cor a 1-reaktive IgE-Spezies gleichermaßen maximal inhibieren, besitzt Cor a 1 als Inhibitor eine sehr viel geringere relative Potenz als Bet v 1. Dies lässt darauf schließen, dass das Cor a 1-reaktive IgE dem Allergen Bet v 1 gegenüber eine höhere Avidität aufweist als gegenüber Cor a 1 selbst und somit dominant an Bet v 1 bindet.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und aus den beiden vorangegangenen Studien^{32,41} legen so die Vermutung nahe, dass sich alle relevanten IgE-Epitope des jeweiligen Nahrungsmittelallergens auch auf dem Pollenallergen befinden, aber nicht umgekehrt. Daraus kann wiederum geschlossen werden, dass hier im Falle der Nahrungsmittelallergie eine primäre Sensibilisierung durch das Pollenallergen vorangegangen sein muss, woraus sich eine sekundäre Nahrungsmittelallergie entwickelt hat. Das Birkenpollenallergen ist somit auch für die jeweilige Nahrungsmittelallergie das sensibilisierende Allergen^{32,41}.

Es lässt sich also in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal mit Hilfe eines dosisabhängigen Inhibitions-ELISA eine Kreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Cor a 1 auf Ebene des IgE nachweisen (B-Zell-Kreuzreaktivität), wobei das Cor a 1-reaktive IgE dominant kreuzreaktiv zum Bet v 1-reaktiven IgE ist.

5.3.2 T-Zellkreuzreaktivität

Die durch die Stimulation mit unterschiedlichen Allergenen hervorgerufene T-Zellantwort, wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht^{27,32-34,81-83}. Allerdings wurde dabei bisher hauptsächlich mit T-Zelllinien (TCL, engl. T cell lines) und T-Zellklonen (TCC, engl. T cell clones) gearbeitet, oder es wurden PBMC in ihrer Gesamtheit analysiert^{32-34,81-84}, ohne daraus die T-Zellen zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch ausschließlich mit primären T-Zellen gearbeitet, die aus den PBMC der Spender aufgereinigt werden. Ohne wiederholte Stimulationen, wie es sonst bei TCL und TCC der Fall ist, soll die Hintergrundproliferation möglichst gering gehalten und eine mögliche Differenzierung der T-Zellen aufgrund bestimmter Kulturbedingungen ausgeschlossen werden.

Zunächst werden die T-Zellanalysen dieser Studie mit dem bewährten und bereits häufig angewandten ³H-Thymidinassay durchgeführt^{32,81,85,86}.

Nach der primären Stimulation der T-Zellen mit Bet v 1- und Cor a 1-beladenen DC lässt sich eine signifikante allergenspezifische Induktion der Proliferation bei den Allergikern, jedoch nicht bei den gesunden Spendern feststellen (siehe Abb. 4.5). Mit der Stimulation durch Dau c 1-beladene DC verhält es sich anders. Sie sind auch bei den Allergikern nicht in der Lage, eine signifikante allergenspezifische Proliferation zu induzieren (siehe Abb. 4.5). Dieses Ergebnis geht, wie man Tab. 4.1 und Abb. 4.1 entnehmen kann, mit den klinischen Daten der Allergiker konform. Dort wird ersichtlich, dass eine Karottenallergie innerhalb der Spenderkohorte sehr viel geringer ausgeprägt oder verbreitet ist als eine Hypersensitivitätsreaktion gegen Birkenpollen oder Haselnüsse. Daher ist es naheliegend, dass keine deutlich signifikante Proliferation als Antwort auf Dau c 1 in der atopischen Spendergruppe beobachtet werden kann.

Die allergenspezifische Induktion der Proliferation im Allergiker im Gegensatz zum Nichtallergiker konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden^{32,72} und stimmen somit mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. In einer Arbeit von Bohle et al.³² werden PBMC von sowohl Allergikern als auch gesunden Probanden mit den rekombinanten Allergenen Bet v 1 und Api g 1 stimuliert. Während in der Allergikerkohorte eine allergenspezifische Proliferation der Lymphozyten beobachtet werden kann, kann in der gesunden Kontrollgruppe keine allergeninduzierte Lymphozytenproliferation festgestellt werden.

Die Studie von Smole et al.⁷² zeigt die allergenspezifische Proliferation von Atopikern im Vergleich zur gesunden Kontrolle mit Hilfe von naiven T-Zellen. Diese werden durch allergenbeladene DC stimuliert und lassen beim Allergiker im Vergleich zu einer

Mediumkontrolle eine signifikante allergenspezifische T-Zellproliferation erkennen. Nicht so bei der gesunden Gruppe. Dort kann die Proliferation der allergenstimulierten naiven T-Zellen das Proliferationsniveau der Mediumkontrolle nicht signifikant übersteigen.

Wie in vorangegangenen Studien kann in der hier vorliegenden Arbeit also im Allergiker eine allergenspezifische Induktion der Proliferation nach primärer Stimulation festgestellt werden, in diesem Fall als Antwort auf die rekombinanten Allergene Bet v 1 und Cor a 1. Allerdings kann keine Korrelation zwischen dem Niveau des spezifischen IgE gegen die hier verwendeten Allergene und der jeweiligen T-Zellproliferation der individuellen Spender beobachtet werden (vgl. Tab. 4.1, Abb. 4.1 und Abb. 4.6).

In der hier vorliegenden Arbeit werden zur Analyse der T-Zellkreuzreaktivität (Abb. 4.9 und 4.10) die primär stimulierten allergenspezifischen T-Zellen sowie die unspezifischen Kontroll-T-Zellen jeweils mit den rekombinanten Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 restimuliert. Betrachtet man die Allergikergruppe, kann nach einer sekundären Stimulation mit Bet v 1 (Abb 4.9, oben links) eine Kreuzreaktivität zwischen Cor a 1 und Bet v 1 sowie Dau c 1 und Bet v 1 beobachtet werden. Bei Restimulation mit Cor a 1 kann zusätzlich eine T-Zellkreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Cor a 1 gezeigt werden (Abb. 4.9, oben links). Bei individueller Betrachtung der allergischen Spender kann festgestellt werden, dass bei jedem einzelnen der untersuchten Probanden ohne Ausnahme eine T-Zellkreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Cor a 1, oder Cor a 1 und Bet v 1, vorhanden ist (Abb. 4.10). Es kann also gezeigt werden, dass bei den mittels ^3H -Thymidin gemessenen Experimenten 100 % der analysierten allergischen Spendern eine signifikante T-Zellkreuzreaktivität zwischen den Allergenen Bet v 1 und Cor a 1 auf Ebene von primären T-Zellen in mindestens einem experimentellen Ansatz (Restimulation mit Bet v 1, oder Restimulation mit Cor a 1) aufweisen.

Eine T-Zellkreuzreaktivität zwischen dem Pollenallergen Bet v 1 und den Nahrungsmittelallergenen Cor a 1 und Dau c 1 konnte bereits in grundlegenden Studien von Jahn-Schmid et al.³⁴ und Bohle et al.³³ bei Patienten mit Birkenpollenallergie und OAS, ausgelöst durch den Verzehr von Haselnüssen und Karotten, gezeigt werden. Allerdings werden die Experimente in beiden Arbeiten nicht mit primären T-Zellen durchgeführt. Jahn-Schmid et al.³⁴ haben unterschiedliche TCL und TCC generiert, die für verschiedene Epitope auf dem Bet v 1-Molekül spezifisch sind. Dabei können insgesamt zehn unterschiedliche T-Zell-aktivierende Regionen innerhalb der Moleküle bestimmt werden, die mindestens von 10 % der untersuchten Probanden erkannt werden. Die meisten analysierten Allergiker (61 %) reagieren auf das Epitop Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆, welches somit das immundominante Epitop auf dem Hauptbirkenpollenallergen darstellt. Gefolgt

wird dieses Epitop von Bet v 1₁₁₂₋₁₂₃, welches immerhin von 40 % der Probandenkohorte erkannt wird. 18 Allergiker der Kohorte, zeigen eine Reaktion auf ausschließlich nur eines der zehn unterschiedlichen Bet v 1-Epitope. Davon erkennen acht Patienten exklusiv das Epitop Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆.

Für die Kreuzreaktivität zwischen dem Birkenpollenallergen und seinen homologen Nahrungsmittelallergenen scheint das immundominante Epitop Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆ von immenser Wichtigkeit zu sein. Es befindet sich im stark konservierten C-Terminus des Allergenmoleküls. Die Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆-korrespondierenden Regionen auf den kreuzreaktiven Nahrungsmittelallergenen (z.B. Cor a 1₁₄₃₋₁₅₇, Dau c 1₁₄₁₋₁₅₃) sind ebenfalls im C-Terminus des jeweiligen Moleküls lokalisiert³⁴.

Um zu analysieren wie stark dieses Epitop des Birkenpollenallergens bei der Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen aus der PR-10-Familie involviert ist, hat die Arbeitsgruppe um Jahn-Schmid³⁴ Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆-spezifische TCL von 15 unterschiedlichen Spendern generiert und diese anschließend mit Peptiden, die die jeweils korrespondierenden Regionen auf dem homologen Nahrungsmittelallergen repräsentieren (z.B. Cor a 1₁₄₃₋₁₅₇, Dau c 1₁₄₁₋₁₅₃), stimuliert. Es kann beobachtet werden, dass 71 % dieser TCL durch eines oder mehrere der Nahrungsmittelpeptide eine signifikante Proliferation hervorgerufen werden kann. Davon reagierten 53 % der getesteten TCL auf Cor a 1₁₄₃₋₁₅₇ und 47 % auf Dau c 1₁₄₁₋₁₅₃. Zusätzlich werden elf Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆-spezifische TCC von acht unterschiedlichen Spendern generiert, die mit den vollständigen Allergenproteinen von diversen Nahrungsmitteln (z.B. Cor a 1, Dau c 1) stimuliert wurden. Es soll gezeigt werden, dass Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆ auch auf klonaler Ebene bei der Kreuzreaktivität eine wichtige Rolle spielt. Tatsächlich werden Cor a 1 und Dau c 1 zu 54,5 % bzw. 45,5 % der TCC erkannt. Jahn-Schmid et al.³⁴ können in ihrer Studie also mit Hilfe von TCL und TCC eine Kreuzreaktivität zwischen dem Birkenpollenallergen und den homologen Allergenen von Haselnuss und Karotte auf zellulärer Ebene demonstrieren. Außerdem kann Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆ als das immundominante Epitop des Hauptallergens der Birke identifiziert werden.

In der Studie von Bohle et al.³³ werden ebenfalls unterschiedliche TCL und TCC generiert, die allerdings eine Spezifität für unterschiedliche Epitope des Haselnussallergens Cor a 1.04 aufweisen. Auch hier können multiple T-Zellepitope identifiziert werden, die über das gesamte Protein verteilt sind. Es kann festgestellt werden, dass von diesen 20 Epitopen Cor a 1.04₁₄₂₋₁₅₃ das prominenteste Epitop auf dem Haselnussallergen ist. Es wird von acht der 17 TCL (47,1 %) erkannt. In folgenden Experimenten werden bezüglich des Epitops nicht weiter definierte Cor a 1.04-spezifische TCL generiert, die anschließend mit

den rekombinanten Pollenallergenen der Birke und der Haselnuss stimuliert werden. Alle TCL reagieren auf mindestens eines der beiden Pollenallergene, also auch auf das Birkenpollenallergen. So kann in diesem Fall eine Kreuzreaktivität zwischen Cor a 1.04 und Bet v 1 gezeigt werden. Im Weiteren werden 18 Cor a 1.04-spezifische TCC von neun unterschiedlichen allergischen Spendern isoliert, von denen alle auf eine Reaktion gegen rekombinantes Bet v 1 und Dau c 1 getestet werden. Bei acht von 18 TCC kann eine Reaktion gegen Bet v 1 beobachtet werden, zehn der Cor a 1.04-spezifischen TCC reagierten hingegen nicht auf das Birkenpollenallergen. Eine Reaktion auf die Stimulation mit Dau c 1 zeigten sieben der 18 unterschiedlichen TCC. So kann hier also ebenfalls eine Kreuzreaktivität zwischen den Cor a 1.04-spezifischen TCC und dem Pollenallergen der Birke sowie dem Nahrungsmittelallergen der Karotte nachgewiesen werden.

Die Kreuzreaktivität zwischen Cor a 1.04 und Dau c 1 wird in der Gruppe um Bohle zusätzlich einer genaueren Betrachtung unterzogen. Dabei kann festgestellt werden, dass alle Dau c 1-reaktiven TCC ausschließlich Cor a 1.04₁₄₂₋₁₅₃-spezifisch sind. Das C-terminale Epitop des Haselnussallergens scheint so für die Kreuzreaktivität zwischen den Hauptallergenen von Haselnuss und Karotte von großer Bedeutung zu sein.

Zusammenfassend können die Studien von Jahn-Schmid et al. und Bohle et al. erfolgreich eine Kreuzreaktivität zwischen dem Pollenallergen der Birke (Bet v 1) und den Nahrungsmittelallergenen von Haselnuss (Cor a 1) und Karotte (Dau c 1) durch die Verwendung von TCL und TCC nachweisen^{33,34}.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse dieser zwei Studien in Bezug auf die vorhandenen Kreuzreaktivitäten und kann ergänzend zum ersten Mal eine Kreuzreaktivität zwischen Bet v 1, Cor a 1 und in geringerem Maße Dau c 1 auf Ebene von primären T-Zellen ohne die Verwendung wiederholter Stimulationen zeigen.

Wie schon erwähnt, ist die Verwendung des Thymidinassays eine solide Methode, um die Kreuzreaktivität von T-Zellen zu analysieren. Jedoch geht dieses Verfahren mit gewissen Einschränkungen einher. Eine Unterscheidung, welche T-Zellen genau nach sowohl primärer als auch sekundärer Stimulation, oder lediglich nach sekundärer Stimulation proliferieren, ist nicht möglich. So stellt sich weiterhin die Frage, welche der proliferierenden T-Zellen wirklich kreuzreaktiv sind und welche reagieren eventuell ausschließlich auf das zur Restimulation eingesetzte Allergen und nicht auch auf jenes, welches zur primären Stimulation eingesetzt wird. Man kann also nicht zwischen diesen T-Zellsubpopulationen differenzieren und das Ausmaß der T-Zellkreuzreaktivität bei einem individuellen Spender bestimmen.

Durch den Einsatz von zwei unterscheidlichen Proliferationsfarbstoffen (CellTrace Violet und CFSE) und der Durchflusszytometrie ist dies jedoch möglich. Man ist nun in der Lage, eine detailliertere Analyse der T-Zellsubpopulationen durchzuführen, die nach der zweiten Stimulationsrunde proliferieren. Dieses Verfahren wurde zur Analyse der T-Zellkreuzreaktivität bisher nicht angewendet und wurde im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf die allergenspezifische Induktion und Kreuzreaktivitäten der T-Zellpopulationen neu etabliert.

Mit Hilfe der neuen Methode kann in der vorliegenden Arbeit nach der primären Stimulation von CD4⁺ T-Zellen mit Bet v 1 und Cor a 1 im Vergleich zu einer unspezifischen Kontrollgruppe und einem irrelevanten Nahrungsmittelallergen (OVA), das nicht homolog zu Bet v 1 oder Cor a 1 ist, eine signifikante T-Zellproliferation detektiert werden (Abb. 4.12).

Bei den Restimulationsexperimenten, die mittels Durchflusszytometrie analysiert werden, kann bei sowohl den primär Bet v 1- als auch bei den primär Cor a 1-voraktivierten T-Zellen als Reaktion auf die Stimulation mit dem identischem und auch dem homologen Allergen im Vergleich zu den Kontrollen eine allergenspezifische starke (Abb. 4.13A und 4.14A), bzw. bei den zusammengefassten Ergebnissen eine signifikante (Abb. 4.13B und 4.14B) Proliferation festgestellt werden. So können also hier mit Hilfe der durchflusszytometrischen Methode sowohl Bet v 1/Cor a 1- also auch Cor a 1/Bet v 1-kreuzreaktive T-Zellen detektiert werden. In beiden Versuchsansätzen lässt sich deutlich erkennen, dass die große Mehrheit der nach der zweiten Stimulationsrunde mit dem homologen Allergen proliferierenden T-Zellen aus der T-Zellsubpopulation hervorgehen, die bereits nach der primären Stimulation stark proliferiert hat (Abb. 4.13C und 4.14C).

Nach der homologen Restimulation kann bei den primär Bet v 1-voraktivierten T-Zellen keine Subpopulation beobachtet werden, die ausschließlich nach der Restimulation mit Cor a 1 proliferiert, ohne dabei Bet v 1-reaktiv zu sein. Es kann also keine Cor a 1-monospezifische T-Zellsubpopulation nach Restimulation mit dem Haselnussallergen detektiert werden. Im umgekehrten experimentellen Ansatz, also bei den primär Cor a 1-voraktivierten T-Zellen verhält es sich nach Restimulation mit dem Birkenpollenallergen genau so. Auch hier kann keine Bet v 1-monospezifische T-Zellsubpopulation festgestellt werden. Diese Ergebnisse schließen die Existenz solcher monospezifischen T-Zellsubpopulationen jedoch nicht aus. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Zellen bei diesem Versuchsansatz mit primären T-Zellen ohne wiederholte Stimulationen in so geringem Maße auftreten, dass sie jenseites der Detektionsgrenze dieser Methode

liegen. Hier kann folglich eine Prädominanz der kreuzreaktiven T-Zellsubpopulationen innerhalb der stark allergenreaktiven T-Zellen festgestellt werden.

Wie bereits in Kapitel 1.6 erwähnt, können manche Studien bezüglich einer erfolgreichen Hyposensibilisierung gegen Birkenpollen beobachten, dass die spezifische Immuntherapie mit der Verbesserung einer begleitenden Kreuzallergie gegen bestimmte Nahrungsmittel einhergeht⁵⁴⁻⁵⁶. Im Gegensatz dazu stehen andere Studien, die diesen positiven Effekt nicht feststellen können bzw. sogar eine Verschlechterung zeigt^{19,57,58}. Diese kontroversen Ergebnisse können, wenn man von den IgE-vermittelten Mechanismen absieht, durch ein unterschiedliches Ausmaß von Qualität und Quantität des kreuzreaktiven T-Zellrepertoires im einzelnen Patienten hervorgerufen werden. So kann die Kenntnis über monospezifische und kreuzreaktive T-Zellsubpopulationen im individuellen Allergiker zu einer Optimierung des Verfahrens der spezifischen Immuntherapie führen. Die durchflusszytometrische Methode birgt auch den Vorteil, dass die Kreuzreaktivität und die Reaktion der einzelnen T-Zellsubpopulationen im Laufe einer Immuntherapie im jeweiligen Patienten visualisiert und fortlaufend beobachtet werden können. Diese Erkenntnisse können dazu führen, dass in Zukunft eine allergenspezifische Immuntherapie sehr gut an einen individuellen Patienten angepasst werden kann und somit die Aussicht auf eine erfolgreiche Therapie erhöht wird.

6. Zusammenfassung

Eine Pollenallergie geht häufig mit einer sekundären Nahrungsmittelallergie einher, die durch die Kreuzreaktivität zwischen dem Pollen- und dem Nahrungsmittelallergen verursacht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kohorte von 20 Allergikern mit einer Typ I-Allergie gegen Birkenpollen und einer assoziierten Nahrungsmittelallergie gegen Haselnüsse und/oder Karotten in Bezug auf eine allergenspezifische IgE-Antwort, T-Zellantwort und vor allen Dingen hinsichtlich der T-Zellkreativität zwischen den rekombinanten Allergenen Bet v 1, Cor a 1 und Dau c 1 charakterisiert. Verwendet wurde hierzu ein Zellkultursystem mit primären CD4⁺ T-Zellen ohne die Zugabe von exogenem IL-2 oder wiederholten Stimulationen. Zur Analyse der T-Zellkreativität kamen zwei unterschiedliche Analyseverfahren zum Einsatz: zum einen der bewährte ³H-Thymidinassay und zum anderen eine neue durchflusszytometrische Methode, die auf der Verwendung von zwei unterschiedlichen Proliferationsfarbstoffen basiert.

Bei der Charakterisierung der T-Zellantwort konnte festgestellt werden, dass eine robuste Th2-Antwort vorliegt, die stark von dem Zytokin IL-5 dominiert wird, begleitet von einer signifikanten Produktion von IL-9 und IL-13, allerdings ohne die Beteiligung von IL-4.

Des Weiteren konnte zum ersten Mal mit Hilfe eines dosisabhängigen Inhibitions-ELISA eine B-Zellkreativität zwischen Bet v 1 und Cor a 1 gezeigt werden, wobei das Cor a 1-reaktive IgE prädominant ist und eine Subpopulation des Bet v 1-reaktiven IgE darstellt. Mittels ³H-Thymidinassay konnte eine T-Zellkreativität zwischen Bet v 1, Cor a 1 und in einem geringeren Maße zu Dau c 1 bei primären T-Zellen von Allergikern gezeigt werden. Ebenso konnte die Kreuzreaktivität zwischen Bet v 1 und Cor a 1 durch die neue durchflusszytometrische Methode bewiesen werden. Zusätzlich ist es mit Hilfe dieser neuen Methode nun möglich, zwischen den einzelnen T-Zellsubpopulationen zu unterscheiden, die sowohl nach primärer und sekundärer oder ausschließlich nach sekundärer Stimulation proliferieren. Es konnte festgestellt werden, dass die kreuzreaktiven T-Zellen aus der T-Zellsubpopulation hervorgehen, die bereits nach der primären Stimulation stark proliferiert haben. Somit kann also innerhalb des T-Zellrepertoires der allergischen Spender eine Prädominanz der kreuzreaktiven T-Zellsubpopulationen festgestellt werden. Eine monospezifische T-Zellsubpopulation konnte unter Verwendung der neuen Methode nicht detektiert werden.

Das Ausmaß von Qualität und Quantität einer Kreuzreaktivität kann nun visualisiert werden, was dazu beitragen kann, das Protokoll einer SIT zu verbessern und optimal an den individuellen Patienten anzupassen, um möglicherweise eine größere Chance auf eine erfolgreiche Therapie in Aussicht zu stellen.

7. Literatur

1. Rajan, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* **24**, 376–9 (2003).
2. Jamieson, M. Imagining “reactivity”: allergy within the history of immunology. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **41**, 356–66 (2010).
3. Murphy, K. P. *Janeway’s Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2012).
4. Geha, R. S. Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 603–8 (2003).
5. Devereux, G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 869–74 (2006).
6. Vandebulcke, L., Bachert, C., Van Cauwenberge, P. & Claeys, S. The innate immune system and its role in allergic disorders. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **139**, 159–65 (2006).
7. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–54 (2008).
8. Brooks, C., Pearce, N. & Douwes, J. The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **13**, 70–7 (2013).
9. Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* **112**, 352–63 (2004).
10. Romagnani, S. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1511–3 (2007).
11. Steinke, J. W., Rich, S. S. & Borish, L. 5. Genetics of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, S384–7; quiz S416 (2008).
12. Holgate, S. T. & Polosa, R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 218–30 (2008).
13. Galli, S. J. & Tsai, M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* **18**, 693–704 (2012).
14. Von Bubnoff, D., Geiger, E. & Bieber, T. Antigen-presenting cells in allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 329–39 (2001).
15. Milner, L. A. & Bigas, A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* **93**, 2431–48 (1999).
16. Zeng, W. “All things considered”: transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation. *Immunology* **140**, 31–8 (2013).
17. Prussin, C. & Metcalfe, D. D. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, S450–6 (2006).

18. Bischoff, S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 93–104 (2007).
19. Bohle, B. T lymphocytes and food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 424–33 (2004).
20. Mills, E. N. C. *et al.* The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy* **62**, 717–22 (2007).
21. Hoffmann-Sommergruber, K. *et al.* IgE reactivity to Api g 1, a major celery allergen, in a Central European population is based on primary sensitization by Bet v 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 478–84 (1999).
22. Wang, J. & Sampson, H. A. Food allergy. *J. Clin. Invest.* **121**, 827–35 (2011).
23. Zurzolo, G. A., Mathai, M. L., Koplin, J. J. & Allen, K. J. Hidden allergens in foods and implications for labelling and clinical care of food allergic patients. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **12**, 292–6 (2012).
24. Bohle, B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy* **62**, 3–10 (2007).
25. Breiteneder, H. & Ebner, C. Atopic allergens of plant foods. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **1**, 261–7 (2001).
26. Ma, S., Sicherer, S. H. & Nowak-wegrzyn, A. A survey on the management of pollen- food allergy syndrome in allergy practices. **122**, 784–788 (2003).
27. Bohle, B. *et al.* Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 242–9 (2006).
28. Katelaris, C. H. Food allergy and oral allergy or pollen-food syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **10**, 246–51 (2010).
29. Egger, M. *et al.* Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy* **61**, 461–76 (2006).
30. Mari, A., Ballmer-Weber, B. K. & Vieths, S. The oral allergy syndrome: improved diagnostic and treatment methods. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **5**, 267–73 (2005).
31. Klinglmayr, E. *et al.* Identification of B-cell epitopes of Bet v 1 involved in cross-reactivity with food allergens. *Allergy* **64**, 647–51 (2009).
32. Bohle, B. *et al.* Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3303–10 (2003).
33. Bohle, B. *et al.* Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a 1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 1392–9 (2005).
34. Jahn-Schmid, B. *et al.* Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 213–9 (2005).

35. Vieths, S., Scheurer, S. & Ballmer-Weber, B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **964**, 47–68 (2002).
36. Hirschwehr, R. *et al.* Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 927–36 (1992).
37. Fritsch, R. *et al.* Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 679–86 (1998).
38. Bonds, R. S., Midoro-Horiuti, T. & Goldblum, R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **8**, 82–6 (2008).
39. Wensing, M. *et al.* IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 435–42 (2002).
40. Aalberse, R. C., Akkerdaas, J. & van Ree, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* **56**, 478–90 (2001).
41. Mittag, D. *et al.* Birch pollen-related food allergy to legumes: identification and characterization of the Bet v 1 homologue in mungbean (*Vigna radiata*), Vig r 1. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 1049–55 (2005).
42. Ebner, C. *et al.* Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**, 962–9 (1995).
43. Breiteneder, H. & Ebner, C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 27–36 (2000).
44. Reese, G., Ballmer-Weber, B. K., Wangorsch, A., Randow, S. & Vieths, S. Allergenicity and antigenicity of wild-type and mutant, monomeric, and dimeric carrot major allergen Dau c 1: destruction of conformation, not oligomerization, is the roadmap to save allergen vaccines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 944–51 (2007).
45. Akdis, C. A. & Akdis, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 18–27; quiz 28–9 (2011).
46. Bohle, B. *et al.* Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 707–13 (2007).
47. Lombardi, C. *et al.* Administration regimens for sublingual immunotherapy to pollen allergens: what do we know? *Allergy* **64**, 849–54 (2009).
48. Akdis, M. Immune tolerance in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 700–7 (2009).
49. Akdis, M. & Akdis, C. A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 780–91 (2007).
50. Ozdemir, C., Kucuksezer, U. C., Akdis, M. & Akdis, C. A. Specific immunotherapy and turning off the T cell: how does it work? *Ann. Allergy. Asthma Immunol.* **107**, 381–92 (2011).

51. Jonuleit, H. & Schmitt, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**, 6323–7 (2003).
52. Miyara, M., Wing, K. & Sakaguchi, S. Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3⁺ regulatory T-cell activation and expansion. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 749–55; quiz 756–7 (2009).
53. Ebner, C. *et al.* Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin. Exp. Allergy* **27**, 1007–15 (1997).
54. Asero, R. Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients. *Clin. Exp. Allergy* **28**, 1368–73 (1998).
55. Bucher, X., Pichler, W. J., Dahinden, C. A. & Helbling, A. Effect of tree pollen specific, subcutaneous immunotherapy on the oral allergy syndrome to apple and hazelnut. *Allergy* **59**, 1272–6 (2004).
56. Bolhaar, S. T. H. P. *et al.* Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 761–9 (2004).
57. Kinaciyan, T. *et al.* Successful sublingual immunotherapy with birch pollen has limited effects on concomitant food allergy to apple and the immune response to the Bet v 1 homolog Mal d 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 937–43 (2007).
58. Hansen, K. S. *et al.* Food allergy to apple and specific immunotherapy with birch pollen. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 441–8 (2004).
59. Lauer, I. *et al.* Expression and characterization of three important panallergens from hazelnut. *Mol. Nutr. Food Res.* **52 Suppl 2**, S262–71 (2008).
60. Hofmann, C. *et al.* Cor a 1-reactive T cells and IgE are predominantly cross-reactive to Bet v 1 in patients with birch pollen-associated food allergy to hazelnut. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 1384–92.e6 (2013).
61. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515–48 (2005).
62. Prectel, A. T. & Steinkasserer, A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* **299**, 59–69 (2007).
63. Krawczyk, M. & Reith, W. Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens* **67**, 183–97 (2006).
64. Bachmann, M. F., Barner, M. & Kopf, M. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *J. Exp. Med.* **190**, 1383–92 (1999).
65. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 584–92 (2007).

66. Blom, B. & Spits, H. Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 287–320 (2006).
67. 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.* **105**, 988–96 (2000).
68. Hammad, H. *et al.* Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* **98**, 1135–41 (2001).
69. Weigt, H., Muhlradt, P. F., Larbig, M., Krug, N. & Braun, A. The Toll-like receptor-2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 cooperates with IFN-gamma to reverse the Th2 skew in an in vitro allergy model. *J. Immunol.* **172**, 6080–6 (2004).
70. Takishita, T. *et al.* Characterization of allergen-specific monocyte-derived dendritic cells generated from monocytes by a single-step procedure: effect on naïve and memory T cells. *Allergy* **60**, 211–7 (2005).
71. Smole, U. *et al.* Bet v 1 and its homologous food allergen Api g 1 stimulate dendritic cells from birch pollen-allergic individuals to induce different Th-cell polarization. *Allergy* **65**, 1388–96 (2010).
72. Smole, U. *et al.* Differential T-cell responses and allergen uptake after exposure of dendritic cells to the birch pollen allergens Bet v 1.0101, Bet v 1.0401 and Bet v 1.1001. *Immunobiology* **215**, 903–9 (2010).
73. Akdis, M. *et al.* Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 701–21.e1–70 (2011).
74. Williams, C. M. M., Rahman, S., Hubeau, C. & Ma, H.-L. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicol. Pathol.* **40**, 205–15 (2012).
75. Banchereau, J., Pascual, V. & O'Garra, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **13**, 925–31 (2012).
76. Poon, A. H., Eidelman, D. H., Martin, J. G., Laprise, C. & Hamid, Q. Pathogenesis of severe asthma. *Clin. Exp. Allergy* **42**, 625–37 (2012).
77. Xie, J. *et al.* Elevated antigen-driven IL-9 responses are prominent in peanut allergic humans. *PLoS One* **7**, e45377 (2012).
78. Devos, S. *et al.* Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 174–82 (2006).
79. Ebner, C. *et al.* Multiple T cell specificities for Bet v I, the major birch pollen allergen, within single individuals. Studies using specific T cell clones and overlapping peptides. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1523–7 (1993).
80. Lüttkopf, D. *et al.* Comparison of four variants of a major allergen in hazelnut (*Corylus avellana*) Cor a 1.04 with the major hazel pollen allergen Cor a 1.01. *Mol. Immunol.* **38**, 515–25 (2002).

81. Ebner, C. *et al.* Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J. Immunol.* **154**, 1932–40 (1995).
82. Jahn-Schmid, B. *et al.* Humoral and cellular cross-reactivity between Amb a 1, the major ragweed pollen allergen, and its mugwort homolog Art v 6. *J. Immunol.* **188**, 1559–67 (2012).
83. Schulten, V. *et al.* Characterization of the allergic T-cell response to Pru p 3, the nonspecific lipid transfer protein in peach. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 100–7 (2009).
84. Ebner, C. *et al.* Identification of multiple T cell epitopes on Bet v I, the major birch pollen allergen, using specific T cell clones and overlapping peptides. *J. Immunol.* **150**, 1047–54 (1993).
85. Steinbrink, K., Wölfel, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* **159**, 4772–80 (1997).
86. Steinbrink, K. *et al.* Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634–42 (1999).

Lebenslauf