

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

**Beeinflussung der allergenspezifischen Immuntherapie im murinen Modell durch  
TNF $\alpha$**

Marion Yvonne Mickler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Markus W. Ollert
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 21.07.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 10.10.2018 angenommen.



# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Allergie .....	1
1.1.1 Geschichte und Definition .....	1
1.1.2 Einteilung .....	1
1.1.3 Epidemiologie.....	1
1.1.4 Ursachen.....	2
1.1.5 Mechanismen der Typ I-Allergie .....	4
1.1.6 Begrenzung der allergischen Reaktion .....	7
1.1.7 Therapie.....	9
1.2 ASIT (Allergenspezifische Immuntherapie).....	11
1.2.1 Geschichte und Begrifflichkeit .....	11
1.2.2 Indikation.....	11
1.2.3 Praktische Anwendung.....	12
1.2.4 Allergenpräparate.....	13
1.2.5 Vorteile.....	13
1.2.6 Einschränkungen und Kontraindikationen .....	14
1.2.7 Nebenwirkungen und unerwünschte Wirkungen.....	15
1.2.8 Sicherheit und Verträglichkeit.....	15
1.2.9 Mechanismen.....	16
1.2.10 Einflussfaktoren und Verbesserung der Wirkung.....	19
1.3 Tumornekrosefaktor $\alpha$ – TNF $\alpha$ .....	21
1.3.1 Definition .....	21
1.3.2 Geschichte .....	22
1.3.3 Struktur von TNF $\alpha$ .....	22
1.3.4 Freisetzung von TNF $\alpha$ .....	22
1.3.5 Funktion .....	23
1.3.6 Die TNF-Familie und ihre Rezeptoren .....	26

1.3.7	TNF $\alpha$ in der Therapie .....	30
1.3.8	ASIT unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie.....	31
2	Material und Methoden.....	32
2.1	Material .....	32
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	32
2.1.2	Arbeitsmaterial .....	34
2.1.3	Pipetten.....	35
2.1.4	Geräte .....	36
2.1.5	Tiere.....	37
2.1.6	Betäubung, Ansatz.....	37
2.1.7	Software.....	37
2.1.8	Materialien für ELISA .....	38
2.1.9	ELISA.....	39
2.2	Methoden .....	42
2.2.1	Tierhaltung .....	42
2.2.2	Blutentnahme am Auge (Retrobulbärer Venenplexus).....	42
2.2.3	Intraperitoneale Injektion (i.p.) .....	42
2.2.4	Subkutane Injektion (s.c.).....	42
2.2.5	Anästhesie .....	42
2.2.6	BAL .....	43
2.2.7	Versuchsprotokoll.....	43
2.2.8	Zellzählung.....	46
2.2.9	Cytospin und Zelldifferenzierung .....	47
2.2.10	ELISA.....	47
2.2.11	Histologie .....	51
2.2.12	LAL-Test .....	52
3	Ergebnisse .....	53
3.1	Vorversuch.....	53
3.2	Versuch 1 (V1) .....	54
3.2.1	Gesamtzellzahl und Zelldifferenzierung aus der BAL- Flüssigkeit.....	56

3.2.2	Zytokine aus der BAL-Flüssigkeit .....	62
3.2.3	Immunglobulinbestimmung aus dem Serum.....	65
3.2.4	TNF $\alpha$ .....	70
3.2.5	Histologie .....	71
3.2.6	Zusammenfassung.....	72
3.3	Versuch 2 (V2) .....	73
3.4	Test der Funktion des Antikörpers.....	74
3.4.1	Test auf Verunreinigung mit LPS.....	74
3.4.2	Test der Block-Funktion im ELISA.....	74
3.4.3	In-vivo-Versuch .....	75
3.4.4	Zusammenfassung.....	75
3.5	Versuch 3 (V3) .....	76
3.5.1	Gesamtzellzahl und Zelldifferenzierung aus der BAL- Flüssigkeit.....	76
3.5.2	Zytokine aus der BAL-Flüssigkeit .....	82
3.5.3	Immunglobulinbestimmung aus dem Serum.....	86
3.5.4	TNF $\alpha$ .....	91
3.5.5	Zusammenfassung.....	91
4	Diskussion.....	92
4.1.1	TNF $\alpha$ und TSG-6.....	95
4.1.2	TNF $\alpha$ und TGF $\beta$ .....	97
4.1.3	TNF $\alpha$ und IDO.....	97
4.1.4	TNF $\alpha$ und die Antikörperbildung.....	102
4.1.5	TNF $\alpha$ und T <sub>regs</sub> .....	104
5	Zusammenfassung.....	111
6	Anhang.....	114
6.1	Literaturverzeichnis .....	114
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	124
6.3	Tabellenverzeichnis.....	126
7	Danksagung.....	127



## Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>Assay Diluent</i>
ADRB2	Adrenozeptor beta 2
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APRIL	<i>a proliferation induced ligand</i>
ASIT	allergenspezifische Immuntherapie
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit/ <i>Fluid</i>
BGS	Bundesgesundheitsurvey
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
c-myc	Protoonkogen (Name bezogen auf die Krankheit Myelozytomatose)
COX-2	Cyclooxygenase 2
CpG	<i>cytosine phosphorothionate guanosine</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>
d	<i>day/Tag</i>
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)

DC	Dendritische Zellen
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated Death Domain</i>
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i>
FASL	Fas Ligand
FcεRI	<i>high affinity Immunglobulin E receptor 1</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen / Einsekundenkapazität
Foxp3	<i>forkhead box protein P3</i>
g	Gramm
GAS	<i>interferon gamma activated sequence</i>
GATA	Transkriptionsfaktor, der die DNA-Sequenz GATA bindet
GCN2	<i>general control nonderepressible 2</i>
GITR	<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
JNK	Jun N-terminal Kinase
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LAL	<i>limulus amebocyte lysate</i>
LIGHT	<i>lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T-lymphocytes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LT $\alpha$	Lymphotoxin $\alpha$
LT $\beta$	Lymphotoxin $\beta$
MAC	Membranangriffskomplex
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Milliliter
min	Minute

MPL	Monophosphoryl-Lipid A
mRNA	messenger RNA
NF-IL-6	<i>nuclear factor for IL-6 expression</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OT	Objektträger
OVA	Ovalbumin
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAS	<i>periodic acid schiff's</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PGD2	Prostaglandin D2
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PTGDR2	Prostaglandin D2 Rezeptor
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal t-cell expressed and secreted</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS Virus	<i>Respiratory Syncytial Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
s.c.	subkutan
SCIT	subkutane Immuntherapie

SLIT	sublinguale Immuntherapie
SODD	<i>silencer of death domains</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	<i>TNF<math>\alpha</math> Converting Enzyme</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>effs</sub>	Effektor-T-Zellen
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen
TIM	<i>TRAF-interacting motif</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	<i>TNFR-associated Death Domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand receptor</i>
TRAMP	<i>TNF-like receptor apoptosis mediating protein</i>
T <sub>regs</sub>	regulatorische T-Zellen
Tris	<i>Trishydroxymethylaminomethane</i>
TSG-6	<i>TNF-stimulated gene 6</i>
V 1-3	Versuch 1-3
VF	Verdünnungsfaktor
WT	Wild-Typ



# 1 Einleitung

## 1.1 Allergie

### 1.1.1 Geschichte und Definition

Der Begriff Allergie wurde erstmals 1906 von dem Wiener Pädiater Clemens von Pirquet verwendet. Pirquet forschte über Infektionskrankheiten und erkannte, dass in der Pathogenese dieser Erkrankungen nicht nur die Krankheitserreger, sondern auch der Organismus mit seiner aktiven Reaktion auf die Erreger eine Bedeutung innehat. Der Terminus Allergie entstand aus den griechischen Wörtern *άλλος/allos* (anders) und *εργον/ergon* (Tätigkeit, Handlung). Pirquet jedoch verstand unter einer Allergie allgemein eine veränderte Reaktion/-sfähigkeit des Körpers (Huber 2006; Kay 2001). Diese Definition änderte sich in den folgenden Jahrzehnten und es entstand das heutige Verständnis einer Allergie als spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit (Huber 2006; Ring 1988, S. 13).

### 1.1.2 Einteilung

Die heutige Einteilung der Allergien beruht auf Coombs und Gell, die Allergien Typ I-IV unterschieden (Ring 1988, S. 16ff): Typ I entspricht der allergischen IgE-vermittelten Sofortreaktion, wie zum Beispiel Anaphylaxie, allergische Rhinitis und Konjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale sowie Nahrungsmittel- und Insektengiftallergien. Die allergischen Reaktionen Typ II beruhen auf zytotoxischen Antikörpern, die gegen körpereigene Zellen gerichtet sind, während der Typ III der Immunkomplex-vermittelten Allergie entspricht. Die Allergie Typ IV-Reaktion, auch Spättypreaktion genannt, kommt durch T-Zellen zustande. Diese Einteilung wurde später um Allergie Typ V und VI erweitert. Typ V ist durch granulomatöse Reaktionen gekennzeichnet, Typ VI beschreibt eine stimulierende Hypersensitivität, die durch Antikörper bewirkt wird. Zwischen den verschiedenen Reaktionen sind auch Überschneidungen und gegenseitige Beeinflussungen möglich, ebenso können Patienten an mehr als einer Allergie leiden (Ring 1988, S. 16ff). In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf Allergien des Typ I.

### 1.1.3 Epidemiologie

Allergien sind häufige Erkrankungen in den Industriestaaten und ihnen kommt eine große gesundheitspolitische Bedeutung zu. Die Lebenszeitprävalenz nach BGS98 liegt gesamt bei 40 %. Bei Frauen wird die Lebenszeitprävalenz mit 47% und bei Männern mit 33% angegeben. Die höchste Prävalenz liegt mit 62% bei westdeutschen Frauen zwischen 30

und 39 Jahren vor. Oft leiden die Patienten nicht nur an einer allergischen Erkrankung, es treten vielfach noch weitere Allergien auf. Im Laufe des Lebens ändert sich die Häufigkeitsverteilung der allergischen Erkrankungen: während bei Babys und Kleinkindern zumeist eine atopische Dermatitis oder eine Nahrungsmittelallergie auftritt, finden sich im Jugendalter hauptsächlich Rhinitis allergica und allergisches Asthma bronchiale. Im Alter sinkt die Prävalenz allergischer Erkrankungen im Allgemeinen (Grevers 2008, S. 4). Auch sind regionäre Unterschiede in der Prävalenz bekannt: Allergien sind in Städten häufiger als auf dem Land, in Industriestaaten häufiger als in Entwicklungsländern, in Westdeutschland häufiger als in Ostdeutschland (Hermann-Kunz 1999a, 2000). Allergien des Typ I werden zunehmend häufiger (Ring et al. 2001; Bousquet et al. 2011), so stieg die Prävalenz der allergischen Rhinitis alleine in den Jahren 1990 bis 1998 um 70 % an (Hermann-Kunz 1999b).

#### **1.1.4 Ursachen**

Für die Entstehung einer Allergie beziehungsweise die Zunahme der Prävalenz der Allergien gibt es viele mehr oder minder umstrittene Hypothesen.

Ein Grund für die steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen ist sicherlich das gesteigerte öffentliche Interesse und Gesundheitsbewusstsein sowie die in den letzten Jahrzehnten verbesserte Diagnostik (Ring et al. 2001).

Einen bedeutenden Beitrag zur Entstehung allergischer Erkrankungen leisten genetische Faktoren. Bestimmte Genloci wurden in diesem Zusammenhang identifiziert: zum Beispiel die chromosomale Region 11q12-13, die für die  $\beta$ -Untereinheit des IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI codiert und die Region 5q31-35, die zum einen Gene für Zytokine enthält, welche T<sub>H</sub>2-Reaktionen anregen, wie zum Beispiel IL-5, IL-9, IL-13 und vor allem IL-4, zum anderen die Gene der TIM-Familie für Oberflächenproteine der T-Zellen, des Endotoxinrezeptors CD14 und des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ADRB2 (Janeway und Murphy 2009, S. 706). Auch epigenetische Einflüsse werden diskutiert (Ring et al. 2001; Bousquet et al. 2011).

Auch Umweltfaktoren und Lebensstil tragen zum Auftreten von Allergien bei. Die Exposition gegenüber Allergenen steigt an. Ein Beispiel hierfür ist die Belastung mit Feinstaub sowohl in geschlossenen Räumen, hervorgerufen durch zum Beispiel Zigarettenrauch oder Geräte wie Laserdrucker und gleichzeitige Gebäudeisolierung, als auch in der Außenluft durch zum Beispiel Dieselpartikel (Jenerowicz et al. 2012). Feinstaubpartikel interagieren mit Pollen und aktivieren sie zu einer höheren Allergenfreisetzung (Ring et al. 2001). Besonders Dieselpartikel verschieben die Immunantwort in Richtung T<sub>H</sub>2.

Durch die Globalisierung ist auch das Spektrum der Allergene breiter geworden, viele nicht-heimische Pflanzen werden angesiedelt. Hierzu gehören beispielsweise Ambrosiaarten,

welche zum Großteil hochallergen sind (Burbach et al. 2009; Boehme et al. 2009). Zusätzlich führt der Klimawandel zu Veränderungen: durch die Temperaturerhöhung und die steigende CO<sub>2</sub>-Konzentration erhöht sich der Pollenflug, auch die Pollensaison wird länger (Behrendt und Ring 2012). Auch die Nahrung wird immer internationaler und exotischer (Ring et al. 2001).

Eine weitere Hypothese stellt die sogenannte „Hygienehypothese“ dar (Janeway und Murphy 2009, S. 709). Durch die immer weiter sinkende Zahl der Infektionskrankheiten in den westlichen Ländern tritt das Immunsystem immer weniger in Kontakt mit Viren, Bakterien sowie Pilzen und Parasiten. Eine große Rolle in der Abwehr von Pilzen und Parasiten spielt das IgE-System und eosinophile Granulozyten. Es wird vermutet, dass durch den sinkenden Kontakt mit diesen Erregern der dafür vorgesehene und qualifizierte Teil des Immunsystems stattdessen auf eigentlich harmlose Substanzen wie Pollen reagiert. Infektionen mit Viren und Bakterien hingegen beziehungsweise der Kontakt zu Endotoxinen, lösen eher eine T<sub>H</sub>1-Antwort aus und schützen somit vor Allergien.

Vor allem frühkindliche Infektionen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, da das Immunsystem in der frühen Kindheit eher T<sub>H</sub>2-geprägt ist und durch Infektionen wie Masern, Hepatitis A oder Kontakt mit Mycobacterium tuberculosis auf T<sub>H</sub>1-Reaktionen umgelenkt wird. Eine große Bedeutung scheinen hierbei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu haben. Dafür spricht auch, dass Kinder, die Geschwister haben oder die schon früh eine Kindertagesstätte besuchen und mit vielen Erregern in Kontakt kommen, besser vor allergischen Erkrankungen geschützt sind. Allerdings gibt es Ausnahmen: eine Infektion mit zum Beispiel RS-Viren kann altersabhängig auch allergiefördernd wirken (Janeway und Murphy 2009, S. 709).

Auch soziale Ursachen werden diskutiert. Kinder von Akademikern haben ein erhöhtes Risiko an allergischen Erkrankungen zu leiden (Hermann-Kunz 1999a), wobei man natürlich den Einfluss eines unterschiedlich ausgeprägten Gesundheitsbewusstseins auf diese Aussage nicht ausschließen darf.

Ebenso dürfen psychische und psychosomatische Faktoren nicht unbeachtet bleiben: Bei circa 20% der Patienten, die sich mit allergischen Symptomen beim Arzt vorstellen, kann keine organische Ursache festgestellt werden (Hausteiner-Wiehle et al. 2011). Risikofaktoren dafür sind eine schwierige Arzt-Patienten-Beziehung (Unzufriedenheit des Patienten/Gegenübertragung des Arztes), weibliches Geschlecht, sowie psychische Erkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass Zusammenhänge zwischen psychischem Stress und dem Immunsystem bestehen, worauf sich die Forschungsrichtung der Psychoneuroimmunologie entwickelte. Allergische Erkrankungen treten vermehrt nach Stress beziehungsweise Life-events, also mit Stress besetzten Lebenssituationen, auf. Stress kann zu einer zeitweiligen Schwächung des Immunsystems (Dhabhar 2009) sowie

einer Verschiebung des Zytokinegleichgewichts in Richtung  $T_H2$ -Antwort führen (Montoro et al. 2009; DeKruyff et al. 1998). Auch durch klassische Konditionierung kann eine allergische Reaktion ausgelöst werden (Vits et al. 2011).

### 1.1.5 Mechanismen der Typ I-Allergie

Gemeinsame Merkmale der allergischen Erkrankungen des Typ I sind ein erhöhter spezifischer IgE-Spiegel und ein  $T_H2$ -Zell-dominiertes Milieu. An Mediatoren und Zytokinen sind vor allem Histamin, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, an Zellen speziell Mastzellen und eosinophile Granulozyten zu nennen. Voraussetzung für eine Allergie ist zunächst die Sensibilisierung. Die später auftretende allergische Reaktion, die Effektorreaktion, wird in eine Sofort- sowie eine Spätreaktion unterteilt.



**Abbildung 1: Mechanismen der Typ I-Allergie**  
Anstieg der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13;  
Anstieg der IgE-Antikörper,  
Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen;  
Verschiebung der Immunantwort Richtung  $T_H2$

#### 1.1.5.1 Sensibilisierung

Allergene sind Substanzen, die allergische Reaktionen auslösen können. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie besondere Eigenschaften aufweisen, die die Immunreaktion in Richtung einer  $T_H2$ -Antwort lenken. Allergene sind meist Proteine mit einer geringen Molekülmasse und sind sehr gut löslich. So können sie sich bei Kontakt mit den Schleimhäuten gut von ihren Transportpartikeln (Pollenkörner, Milbenkot) trennen. Die vorwiegend geringe Allergendosis und der Eintritt über die Schleimhäute scheint eine Aktivierung von  $T_H2$ -Zellen zu begünstigen. Viele Allergene haben enzymatische Eigenschaften, wodurch sie vor allem durch Spaltung von Zellkontakten in das Epithel eindringen können (Janeway und Murphy 2009, S. 702ff).

Nach Eintritt der Allergene werden diese zunächst von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, die in die regionalen Lymphknoten wandern, dort die Antigene den naiven  $CD4^+$ -T-Zellen präsentieren und je nach Dosis und Art des präsentierten Antigens bestimmte Zytokine freisetzen. Während in einem Milieu von Zytokinen wie zum Beispiel IL-4, IL-5, IL-9

und IL-13, welches bei Reaktionen auf Allergene vorliegt, eine Entwicklung zu T<sub>H</sub>2-Zellen gefördert wird, sorgen Zytokine wie IL-12 oder IFN $\gamma$ , die besonders bei Präsentation von zum Beispiel Endotoxin freigesetzt werden, für die Ausbildung von T<sub>H</sub>1-Zellen. Die bei der allergischen Sensibilisierung entstehenden T<sub>H</sub>2-Zellen setzen selbst wiederum T<sub>H</sub>2-Zytokine frei, also IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, wodurch das Milieu weiter T<sub>H</sub>2-lastig wird und sich weitere naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen entwickeln (Deetjen und Alzheimer 2005, S. 402–405; Janeway und Murphy 2009, S. 705–707).

Die Interaktion zwischen APCs und naiven T-Zellen findet über verschiedene Rezeptoren statt. Die antigenpräsentierende Zelle exprimiert MHC (Major Histocompatibility Complex)-II Moleküle auf der Zelloberfläche. Diese bestehen aus zwei transmembranären Ketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Zwischen diesen Ketten besteht eine Rinne, in der die Zelle zuvor aufgenommene und prozessierte Antigene beziehungsweise Teile davon (lineare Peptide von 13-18 Aminosäuren oder mehr) präsentiert (Janeway und Murphy 2009, S. 160; Deetjen und Alzheimer 2005, S. 400).

Die T-Zelle exprimiert den T-Zell-Rezeptor. Hierbei handelt es sich um ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Dieser T-Zell-Rezeptor bindet lineare Peptidfragmente von 7-11 Aminosäuren, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Der T-Zell-Rezeptor ist sehr spezifisch und erkennt nur ein bestimmtes Epitop. Es existieren geschätzt 10<sup>11</sup> verschiedene T-Zell-Rezeptoren bei jedem Menschen. Diese Vielfalt der Rezeptoren entsteht durch unterschiedliche Mechanismen: bei der somatischen Rekombination werden zufallsgesteuert verschiedene Genabschnitte zusammengesetzt, wobei die Übergänge ungenau verknüpft werden, wodurch weitere Differenzierung gewonnen wird. Durch Kombination je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette wird weitere Variabilität erreicht. Mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist das CD3-Molekül, das über seine ITAM-Sequenzen für die Signalüberleitung in die Zelle zuständig ist (Hof et al. 2005, S. 72ff). Neben dem T-Zell-Rezeptor sind von Seiten der T-Zellen unter anderem auch noch die CD4-Moleküle und CD28-Moleküle von großer Wichtigkeit. CD4-Moleküle dienen der Erkennung von MHC-II, wodurch sie sicherstellen, dass nur fremde, von APCs präsentierte Peptide, eine Immunantwort auslösen. Als costimulierender Rezeptor ist auch CD28 zu nennen, dessen Bindung an die costimulierenden Liganden der APC, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), für die Aktivierung der T-Zelle notwendig ist (Janeway und Murphy 2009, S. 435; Deetjen und Alzheimer 2005, S. 402). Auch dadurch wird die Auslösung von Immunantworten kontrolliert. Die Costimulation durch CD28 trägt über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zur Freisetzung von IL-2 durch die T-Zellen selbst bei, welches zur Autostimulation und Proliferation der T-Zellen führt (Janeway und Murphy 2009, S. 304).

Bei Aktivierung der T-Zellen wird vor allem über IL-4 und das Fehlen von IL-12 der Transkriptionsfaktor STAT6 aktiviert. Dieser stimuliert wiederum den Transkriptionsfaktor

GATA-3. GATA-3 sorgt für die Freisetzung der Effektorzytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, die alle die weitere Stimulation von T<sub>H</sub>2-Antworten fördern (Janeway und Murphy 2009, S. 705). IL-4 ist besonders für die Aktivierung von B-Zellen und deren Antikörperswitch zu Antikörpern der Klasse IgE wichtig. IL-5 vermittelt vor allem Wachstum und Differenzierung sowie Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, die wiederum das *Major basic protein* freisetzen. IL-9 wirkt besonders auf mukosale Mastzellen, die dann über ihre gebundenen IgE-Antikörper Entzündungsmediatoren abgeben. IL-13 steigert die Schleimproduktion und die Kontraktion von glatter Muskulatur, wodurch es einen wesentlichen Beitrag zur Symptomatik des Asthma leistet (Janeway und Murphy 2009, S. 1008).

Auch B-Zellen sind antigenpräsentierende Zellen. Sie nehmen das zu ihrem spezifischen Antikörper passende Antigen auf und präsentieren es auf MHC-II-Molekülen. Erkennt eine bereits aktivierte T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor eine B-Zelle, die ein passendes Antigen auf MHC-II präsentiert, bindet sie diese. Durch Interaktion des CD40-Liganden auf der T-Zelle und dessen Rezeptor CD40 auf der B-Zelle, ist die B-Zelle im Stande, Rezeptoren für die von der T-Zelle gebildeten Zytokine zu exprimieren und Antikörper zu produzieren. Die Antikörper sind sehr spezifisch, ihre Variabilität erhalten sie ähnlich wie der T-Zell-Rezeptor über somatische Rekombination, ungenaue Verknüpfung und Kombination der schweren und leichten Ketten. Dazu kommt bei den Antikörpern noch der Mechanismus der somatischen Hypermutation, also Punktmutationen im variablen Bereich der Antikörper (Deetjen und Alzheimer 2005, S. 392).

#### **1.1.5.2 Sofortreaktion**

Die allergische Sofortreaktion findet innerhalb von Sekunden statt. Die von den B-Zellen in der Sensibilisierungsphase gebildeten Antikörper der Klasse IgE binden an die Rezeptoren FcεRI auf Mastzellen sowie basophilen Granulozyten. Mastzellen befinden sich meist im Gewebe in der Nähe von Körperoberflächen, wo potentielle Erreger eindringen können. Werden diese gebundenen IgE-Antikörper durch erneut eintretende passende Allergene quervernetzt, führt das zur Freisetzung von vorgefertigten zytoplasmatischen Granula. Diese enthalten Gewebsmediatoren wie Histamin, Heparin, Prostaglandine, Leukotriene, Enzyme, Chemokine und Zytokine (Janeway und Murphy 2009, S. 719ff). Histamin und Heparin erhöhen die Gefäßpermeabilität und fördern die Kontraktion der glatten Muskulatur. Prostaglandine und Leukotriene stimulieren zusätzlich noch die Schleimproduktion. Enzyme wie Trypsinase und Chymase sorgen für Gewebeschäden und den nachfolgenden bindegewebigen Umbau (Janeway und Murphy 2009, S. 716). Chemokine locken weitere Zellen an, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Die in den Granula enthaltenen Zytokine sind die obengenannten Zytokine der T<sub>H</sub>2-Reaktion sowie TNFα, welches Entzündungsreaktionen fördert und die Endothelzellen aktivieren kann, so

dass Entzündungszellen leichter aus dem Blutkreislauf in das Gewebe austreten können. Eine geringe Antigenexposition führt dabei meist zu einer stärkeren Reaktion der Mastzelle als höhere Dosen, die sogar eine IL-10 Produktion auslösen können (Galli et al. 2005; Gonzalez-Espinosa et al. 2003).

### **1.1.5.3 Spätphase**

Die Spätphase einer allergischen Reaktion tritt nach circa acht bis zwölf Stunden auf. Nach Freisetzung vorgefertigter Mediatoren aus Granula synthetisieren die aktivierten Mastzellen nun weitere Mediatoren und sondern diese ab. Dadurch wird die Entzündungsreaktion weiter verstärkt und Zellen, vor allem eosinophile Granulozyten und T-Zellen werden angezogen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei Prostaglandin D<sub>2</sub>, das über seinen Rezeptor PTGDR, welcher vor allem auf T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und basophilen Granulozyten exprimiert wird, eben diese Zellen aktiviert (Janeway und Murphy 2009, S. 717). Eosinophile Granulozyten befinden sich meist im Bindegewebe nahe den Epithelien. Sie setzen bei Aktivierung freie Radikale, chemische Mediatoren und Zytokine sowie das Major basic protein frei und verursachen dadurch Gewebeschäden und Gewebeveränderungen. Außerdem halten sie Entzündungen aufrecht und verstärken die Reaktion durch Aktivierung von weiteren Zellen wie Mastzellen und Basophilen. Zusammengefasst kommt es bei der Spätreaktion zu anhaltenden Ödemen und oft in der Folge zu Gewebsreaktionen wie Remodeling, Hypertrophie, Hyperplasie und zu chronischer Entzündung (Janeway und Murphy 2009, S. 719ff).

### **1.1.6 Begrenzung der allergischen Reaktion**

Freilich gibt es auch Gegenregulationsmechanismen, die Immunreaktionen begrenzen beziehungsweise fehlgeleitete Reaktionen verhindern. So wird sichergestellt, dass die Gewebeschäden durch immunologische Reaktionen so gering wie möglich gehalten werden. Ein hierbei sehr wichtiger Mechanismus ist zunächst die Spezifität, zum Beispiel der B-Zell- und T-Zellrezeptoren, vor allem in Verbindung mit der vorherigen Selektion der T-Zellen im Thymus. Hierbei werden autoreaktive T-Zellen ausgesondert und eliminiert (Deetjen und Alzheimer 2005, S. 395–400).

Außerdem sind zur Aktivierung von Immunzellen oft mehrere Signale beziehungsweise Costimulationen nötig. Als Beispiel sei die oben genannte Aktivierung (siehe Kapitel 1.1.5.1) von T-Zellen durch APCs genannt, die auf der Erkennung des Antigens, des MHC-Moleküls, sowie auf der Costimulation und dem Zytokinmilieu beruht.

Auch für die Antikörperproduktion durch B-Zellen sind mehrere Signale notwendig. Zuerst muss Kontakt mit einem Antigen erfolgen, im Anschluss ist ein Kontakt mit T-Zellen notwendig. Von dieser Regelung gibt es nur wenige Ausnahmen, zum Beispiel die T-Zell-

unabhängige B-Zell-Aktivierung durch LPS über CD14 auf B-Zellen (Deetjen und Alzheimer 2005, S. 392). Die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten ist ebenfalls streng reguliert. Zunächst muss ihre Differenzierung im Knochenmark durch IL-5 stimuliert werden, anschließend sind Chemokine, die sogenannten Eotaxine, für ihre Aktivierung zuständig (Janeway und Murphy 2009, S. 717).

Für die Begrenzung immunologischer Reaktionen sind vor allem das System der regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) sowie die Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  notwendig.

IL-10 wird von antigenpräsentierenden Zellen, von  $T_{\text{regs}}$ , zum Teil auch von  $T_{\text{H}2}$ - und Mastzellen gebildet, vor allem bei Vorliegen von höheren Antigendosen (Galli et al. 2005; Gonzalez-Espinosa et al. 2003). Dieses Zytokin fördert die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und hemmt die Expression von MHC, Effektor-T-Zellen ( $T_{\text{effs}}$ ) und die Freisetzung von deren Zytokinen.

TGF $\beta$  wird von  $T_{\text{regs}}$ , antigenpräsentierenden Zellen und Chondrozyten gebildet und wirkt entzündungshemmend durch die Hemmung von B- und T-Zellen sowie Makrophagen. Auf regulatorische T-Zellen wirkt TGF $\beta$  stimulierend (Jutel und Akdis 2008).

Die regulatorischen T-Zellen werden in verschiedene Subpopulationen unterteilt. Die regulatorischen T-Zellen im engeren Sinne sind die natürlichen regulatorischen T-Zellen, also  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen. Diese machen circa 10-15% der  $CD4^+$ -T-Zellen aus und kommen hauptsächlich in der Peripherie vor. Sie werden im Thymus auf ihre regulatorische Funktion festgelegt und unter anderem durch IL-10, Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), Adenosin und vor allem TGF $\beta$  aktiviert. Ihre Wirkung wird unter anderem über den Transkriptionsfaktor FoxP3 vermittelt und besteht hauptsächlich in der direkten Zell-zu-Zell-Hemmung von Effektor-T-Zellen als auch in der Freisetzung von IL-10 und TGF $\beta$ .

Weitere Subpopulationen sind  $T_{\text{H}3}$ -Zellen und  $T_{\text{R}1}$ -Zellen. Diese werden auch als adaptive regulatorische T-Zellen bezeichnet und entstehen in der Peripherie aus naiven  $CD4^+$ -T-Zellen.  $T_{\text{H}3}$ -Zellen sind vor allem mukosale Zellen und werden durch über die Schleimhaut aufgenommene Antigene aktiviert. Sie sezernieren vor allem TGF $\beta$ , aber auch IL-10 und IL-4. Ihre Hauptaufgabe scheint in der Induktion von oraler Toleranz zu liegen.  $T_{\text{R}1}$ -Zellen werden vor allem von IL-10 und IFN induziert, sie sezernieren vor allem IL-10 aber auch TGF $\beta$  (Jutel und Akdis 2008; Palomares et al. 2010; Chen und Oppenheim 2010).

Weiteren Einfluss auf die Hemmung der Immunreaktion hat die Indolamin-2,3-Dioxygenase. Dieses Enzym ist in den Tryptophanstoffwechsel eingebunden. Über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf dendritischen Zellen durch zum Beispiel LPS oder DNA kommt es zu einer erhöhten Expression der IDO durch dendritische Zellen. Diese erhöhte Expression kann auch durch die Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ausgelöst werden. IDO wirkt immunsuppressiv, zum Beispiel über die Induktion von  $T_{\text{regs}}$  (Taher et al. 2008).

Auch Adenosin, das von vielen Pollen freigesetzt wird, hat immunsuppressive Eigenschaften und bewirkt bei gesunden Probanden eine Erhöhung von IL-10. Bei Patienten mit Atopie ist diese Induktion nicht mehr möglich (Gilles et al. 2011).

Ebenso kann auch Vitamin D3 durch seine Wirkung in Bezug auf Zellproliferation und Immunregulation an der Begrenzung einer Immunantwort mitwirken und über dendritische Zellen das Zytokingleichgewicht und die Zellproliferation beeinflussen (Ma et al. 2010).

Mastzellen sind ebenfalls in die Immunregulation eingebunden und können je nach Antigenexposition immunsuppressive Zytokine, wie zum Beispiel IL-10 freisetzen (Galli et al. 2005; Gonzalez-Espinosa et al. 2003).

Durch diese verschiedenen Mechanismen wird das Immunsystem im Gleichgewicht zwischen Toleranz, Immunität und Reaktivität gehalten.

## **1.1.7 Therapie**

### ***1.1.7.1 Notwendigkeit der Therapie***

Es gibt viele Gründe, die für eine Notwendigkeit der Therapie allergischer Erkrankungen sprechen. Allergien können im Rahmen einer Anaphylaxie beziehungsweise eines allergischen Schocks lebensbedrohlich sein. Besonders häufige Auslöser sind im Kindesalter Nahrungsmittel, später Medikamente und Insektengifte. In Deutschland wurden nach Auswertung von Daten des statistischen Bundesamtes zwischen 2004 und 2008 150 Todesfälle durch Anaphylaxie bekannt, wobei die Dunkelziffer höher liegen dürfte. Laut dem 2006 von der Charité in Berlin ins Leben gerufenen Anaphylaxie-Register wurden im Zeitraum von 2006 bis November 2010 2114 Fälle von Anaphylaxie und sechs Todesfälle bekannt (Worm und Hompes 2012).

Zum anderen gibt es deutliche Hinweise, dass mit zumindest bestimmten Therapien das Risiko eines Etagenwechsels, also eines Auftretens von Asthma in Folge einer allergischen Rhinitis, gemindert werden kann. Dieses Risiko beträgt bei einem langjährigen Allergiker circa 25% (Grevers 2008, S. 144). Außerdem kann bei schon bestehendem Asthma die Anzahl der schweren Asthmaanfälle und die damit zusammenhängenden Klinikaufenthalte durch eine adäquate Therapie gesenkt werden (Corren 2007; Corren et al. 2004). Ebenso können oft weitere Sensibilisierungen verhindert werden (Wedi und Kapp 2004). Nicht zuletzt steigt durch Therapie die Lebensqualität der Allergiker, Ausfälle im Arbeitsleben und die damit verbundenen Kosten sinken.

### **1.1.7.2 Therapiemöglichkeiten**

Für Allergien stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Im nicht-pharmakologischen Bereich ist zunächst die Allergenkenz, also das Meiden des Allergens, zu nennen. Neben Verzicht auf Allergie-induzierende Nahrungsmittel und Abschaffen von Haustieren sei als ein weiteres Beispiel das sogenannte Encasing, also das Verwenden von Milbenschutzbezügen, genannt.

Antihistaminika werden vor allem bei Rhinitis allergica, Urticaria, Mastozytose, Anaphylaxie aber auch Asthma eingesetzt. Sie wirken über kompetitive Hemmung am H1-(Histamin)-Rezeptor und verhindern somit die Wirkungen des Histamins. Bei Engwinkelglaukom oder Leberstoffwechselstörung sollte auf den Einsatz jedoch eher verzichtet werden. Wechselwirkungen treten mit Medikamenten auf, die wie auch Antihistaminika über Zytochrom P-450 verstoffwechselt werden. Die häufigsten Nebenwirkungen bestehen in Müdigkeit, Mundtrockenheit und Übelkeit. Allerdings sind diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei den neueren Antihistaminika wesentlich seltener (Grevers 2008; Bousquet et al. 2008; Ring 1988, S. 130ff).

Glukokortikosteroide sind wichtige Bestandteile der Therapie von Allergien und sehr effektiv. Der Einsatz erfolgt topisch, intranasal oder auch systemisch. Sie wirken immunsuppressiv durch Hemmung der humoralen und zellulären Immunantwort und antientzündlich durch Hemmung der Prostaglandin- und Leukotriensynthese, durch Senken der Chemotaxis und Reduktion der Makrophagenaktivität. Nebenwirkungen, die vor allem bei systemischer Gabe auftreten können, sind unter anderem Atrophie, Hypertrichose, Cushing-Syndrom, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Osteoporose und Elektrolytentgleisungen (Ring 1988, S. 130ff; Grevers 2008; Bousquet et al. 2008).

Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten wie zum Beispiel Montelukast werden vor allem beim allergischen Asthma eingesetzt. Sie sind in der Regel gut verträglich, als Nebenwirkungen treten Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden auf. Leider ist die Wirkung von Montelukast nicht bei allen Patienten zufriedenstellend (Bousquet et al. 2008; Grevers 2008; Ring 1988, S. 130ff).

Cromoglicinsäure zählt zu den Mastzellstabilisatoren und hemmt somit die Mediatorfreisetzung aus aktivierten Mastzellen. Als Nebenwirkungen treten vor allem Kopfschmerzen und Eosinophilie auf (Ring 1988, S. 130ff; Grevers 2008; Bousquet et al. 2008).

Als weitere Therapie wird die allergenspezifische Immuntherapie (ASIT) eingesetzt, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

## **1.2 ASIT (Allergenspezifische Immuntherapie)**

### **1.2.1 Geschichte und Begrifflichkeit**

Das Prinzip der allergenspezifischen Immuntherapie (ASIT) ist seit über einhundert Jahren bekannt. Auch wenn schon zuvor Vorläufer der Immuntherapie entwickelt wurden, zum Beispiel durch Edward Jenner, der der Vorreiter der Pockenschutzimpfung war, oder durch Alexandre Besredka, der als erster an der Entwicklung der ASIT an einem experimentellen Tierversuch forschte und diesen Tieren verdünnte Allergen-Lösungen in steigenden Dosen verabreichte, wurde die Geburtsstunde der allergenspezifischen Immuntherapie auf das Jahr 1911 datiert. Leonard Noon führte die erste allergenspezifische Immuntherapie am Menschen durch. Er nannte diese Art der Therapie „prophylactic inoculation“. Hierbei injizierte er verdünnte Allergenextrakte in steigender Dosis und führte auch Provokationstests an der Konjunktivitis durch. Seine Arbeit wurde von seinem Kollegen John Freeman weitergeführt. 1955 erfolgte die erste kontrollierte Studie durch William Frankland (Ring und Gutermuth 2011).

Seither hat die allergenspezifische Immuntherapie immer breitere Anwendung gefunden und wurde im Laufe der Zeit immer weiterentwickelt. Neue Schemata und Anwendungen wurden entwickelt, so die Rush- und Ultrarush-Therapie, und neben der subkutanen die sublinguale Immuntherapie. Ferner wurden die Allergene immer verbessert und Zusätze und Adjuvantien für eine wirkungsvollere ASIT ermittelt. Auch wenn bis heute die genaue Wirkweise der ASIT nicht restlos bekannt ist, wurden viele Hypothesen beziehungsweise widerlegt und so viele Teilmechanismen schon ergründet. Dadurch hat sich auch die Bezeichnung für diese Art der Therapie mit der Zeit verändert. Aus der prophylaktischen Inokulation wurde über die Desensibilisierung die Hyposensibilisierung. Später entwickelte sich die Benennung Immuntherapie und der heute am meisten gebrauchte Begriff „spezifische Immuntherapie“. Da der Begriff „spezifische Immuntherapie“ jedoch nicht ganz eindeutig ist, weil auch eine Immuntherapie mit Antikörpern als spezifische Immuntherapie bezeichnet werden kann, tendiert man aktuell eher zum Terminus der allergenspezifischen Immuntherapie (Ring und Gutermuth 2011).

### **1.2.2 Indikation**

Die Indikation zur allergenspezifischen Immuntherapie kann durch verschiedene Kriterien gestellt werden (Moote und Kim 2011): der Nachweis einer IgE-vermittelten relevanten Sensibilisierung muss vorliegen (zum Beispiel über Hauttestungen, In-vitro-Testungen), eine Allergenkarenz ist nicht möglich oder ausreichend, und andere Therapien führen nicht zum gewünschten Erfolg beziehungsweise werden vom Patienten nicht toleriert oder abgelehnt. Auch bei in der Anamnese vorliegender systemischer Reaktion, vor allem mit

respiratorischen und kardiovaskulären Symptomen, ist eine ASIT indiziert (Wedi und Kapp 2004). Besonders effektiv ist eine allergenspezifische Immuntherapie bei Allergenen wie Insektengiften, Pollen und Hausstaubmilben, weniger bei Tierepithelien (Wedi und Kapp 2004).

### **1.2.3 Praktische Anwendung**

Das Prinzip der allergenspezifischen Immuntherapie beruht auf der Applikation von langsam steigenden Dosen von relevanten Allergenen. Bei Patienten mit sehr starken Reaktionen in der Anamnese oder Reaktionen während der allergenspezifischen Immuntherapie ist eine noch langsamere Steigerung, eine Wiederholung der letzten Dosis oder sogar eine Dosisminderung nötig (Ring 1988, S. 140ff). Bei der subkutanen allergenspezifischen Immuntherapie (SCIT) werden die Allergene streng subkutan in die Streckseite des Oberarms injiziert. Die Einstiegsdosis ist meist eine 1.000-10.000 fache Verdünnung der Erhaltungsdosis. In der Einleitungsphase wird je nach Allergenpräparat alle drei bis sieben Tage für wässrige Extrakte, beziehungsweise alle ein bis zwei Wochen für Semidepotpräparate gespritzt (Wedi und Kapp 2004). Es gibt mittlerweile auch Protokolle bei denen die Erhaltungsdosis schneller erreicht wird: die Rush- oder Ultrarush-Protokolle, vor allem bei Insektengiftallergie angewendet, die die Erhaltungsdosis innerhalb von vier beziehungsweise zwei Tagen erlangen (Wedi und Kapp 2004). Diese Therapien werden stationär durchgeführt.

Nach Erreichen der Erhaltungsdosis wird nur noch alle 4-6 Wochen injiziert. Als Erhaltungsdosis bezeichnet man diejenige Dosis, bei der Symptomfreiheit oder zumindest eine deutliche Besserung vorliegt, oder diejenige Dosis, die über längere Zeit ohne systemische Nebenwirkungen toleriert wird (Ring 1988, S. 140ff).

Die Erhaltungsdosis liegt zum Beispiel bei den Insektengiften bei 100 µg Gift pro Injektion. Die allergenspezifische Immuntherapie wird mit der Erhaltungsdosis dann drei bis fünf Jahre fortgeführt. Bei nicht ausreichender Wirksamkeit und hohem Risiko kann die Erhaltungsdosis höher gesetzt werden beziehungsweise die allergenspezifische Immuntherapie länger als fünf Jahre oder sogar lebenslang durchgeführt werden. Im Rahmen der Sicherheit ist es notwendig, dass die allergenspezifische Immuntherapie von allergologisch erfahrenen Ärzten durchgeführt wird und eine ausreichende Notfallversorgung sichergestellt ist (Wedi und Kapp 2004). Vor jeder Injektion ist eine Anamnese zur Verträglichkeit der vorigen Dosis und zu Medikamenteneinnahmen zu führen, nach der Injektion muss der Patient mindestens 30 Minuten in der Praxis unter Aufsicht verbleiben und im Anschluss schwere körperliche Anstrengungen meiden (Ring 1988, S. 140ff).

Neben der subkutanen allergenspezifischen Immuntherapie existiert noch die sublinguale Immuntherapie (SLIT). Dabei werden Allergenpräparate in Kontakt mit der oralen Mukosa gebracht. Die sublinguale allergenspezifische Immuntherapie war lange Zeit umstritten, doch mehren sich die Nachweise ihrer Effektivität (Durham et al. 2010), auch wenn im Vergleich zur subkutanen Immuntherapie eine weitaus höhere Allergendosis appliziert werden muss und der Therapieerfolg erst später einsetzt (Keles et al. 2011). Die Vorteile der sublingualen Therapie sind die leichte Applikation, die auch von zu Hause aus erfolgen kann, das Fehlen von systemischen, schwerwiegenden Nebenwirkungen, die leichte Anwendbarkeit und Akzeptanz bei Kindern aufgrund fehlender Injektionen (Wedi und Kapp 2004; Ring 1988). Ein neuer Aspekt ist die Kombination beider Therapieformen. Keles et al. und Boyce et al. (Keles et al. 2011; Boyce et al. 2012) führten eine Studie an Kindern durch, in der die Wirksamkeit der Kombination einer SCIT in der Einleitungsphase und der SLIT in der Erhaltungsphase gezeigt wurde.

#### **1.2.4 Allergenpräparate**

Im Gegensatz zu anderen Ländern wie zum Beispiel den USA, werden in Deutschland standardisierte Produkte verwendet, die durch das Paul-Ehrlich-Institut überprüft werden (Englert et al. 2012). Früher wurden vor allem wässrige Allergenextrakte verwendet, doch um die Anzahl der nötigen Injektionen zu senken, wurden immer mehr Depot- und Semidepotpräparate entwickelt. Diese erhält man durch Kopplung der Allergene an Aluminiumhydroxid oder L-Tyrosin. Als weitere Entwicklung wurden Allergoide hergestellt, also chemisch veränderte Allergene. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie weniger allergen sind und IgE-Antikörper weniger binden. Dafür sind sie verstärkt immunogen, das heißt sie stimulieren das Immunsystem und fördern die Bildung allergenspezifischer IgG-Antikörper (Ring und Gutermuth 2011; Kleine-Tebbe et al. 2012). Um die Standardisierung zu verbessern wurden mehr und mehr rekombinante Allergene hergestellt (Ring 1988).

#### **1.2.5 Vorteile**

Die allergenspezifische Immuntherapie spielt in der heutigen Therapie der Allergien eine sehr große Rolle. Sie ist – im Gegensatz zu allen anderen Therapien, die nur symptomatisch wirken – nach wie vor die einzige kausale Therapie von Allergien (Jutel und Akdis 2011; Kleine-Tebbe et al. 2012). Nicht nur ihre momentane Wirksamkeit wurde in vielen Studien belegt (Calderon et al. 2007), sondern auch ihre langanhaltende Wirkung über die Therapiedauer hinaus. Diese langanhaltende Wirkung ist sowohl für die SCIT als auch die SLIT belegt (Durham et al. 2010; Durham et al. 1999). Darüber hinaus hat die allergenspezifische Immuntherapie auch präventive Eigenschaften. Sie senkt das Risiko eines Etagenwechsels, also des Neuauftretens eines Asthma bei vorbestehender Rhinitis

allergica (Jacobsen et al. 2007), und bei schon bestehendem Asthma kann sie das Auftreten schwerer Asthmaanfälle mäßigen (Corren 2007; Corren et al. 2004). Durch eine allergenspezifische Immuntherapie bei Sensibilisierung auf ein Allergen, kann verhindert werden, dass weitere, neue Sensibilisierungen auftreten (Purello-D'Ambrosio et al. 2001).

### **1.2.6 Einschränkungen und Kontraindikationen**

Als Kontraindikationen gelten Erkrankungen, die ein erhöhtes Risiko für schwere Nebenwirkungen und systemische Reaktionen während der allergenspezifischen Immuntherapie mit sich bringen. Darunter fallen Hyperthyreose und kardiovaskuläre Erkrankungen wie zum Beispiel instabile Angina pectoris, ausgeprägte Arrhythmie, schlecht eingestellte Hypertonie oder ein vorangegangener Myokardinfarkt, da bei eventuell notwendiger Adrenalingabe das Risiko für Nebenwirkungen steigt (Wedi und Kapp 2004; Kleine-Tebbe et al. 2012; Moote und Kim 2011). Auch instabiles Asthma bronchiale gilt als Kontraindikation, vor allem wenn die FEV<sub>1</sub> trotz adäquater Therapie unter 70% liegt (Kopp et al. 2009). Weiterhin liegt eine Kontraindikation bei Malignomen wegen der theoretischen Möglichkeit der Progredienz, bei schweren Erkrankungen des Immunsystems, Immunsuppression, Immundefekten, sowie Autoimmunerkrankungen vor. Laut Frew et al. (Frew 2010) ist der schädliche Effekt der allergenspezifischen Immuntherapie bei diesen Erkrankungen jedoch nicht nachgewiesen, zumindest unter der Bedingung, dass die Risiken und der Nutzen der Therapie vorher richtig beurteilt wurden.

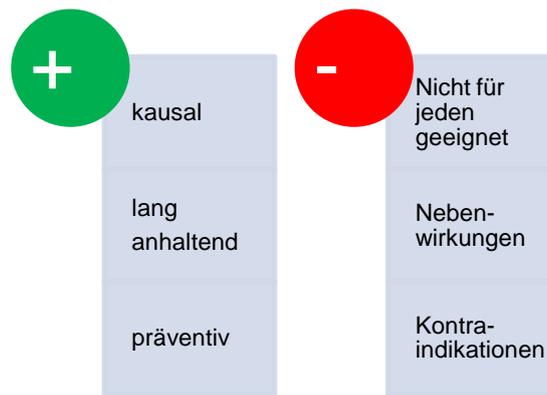
Ebenso führen medikamentöse Therapien zu Kontraindikationen für die allergenspezifische Immuntherapie. Unter Therapie mit  $\beta$ -Blockern sollte eine ASIT möglichst nicht durchgeführt werden, da  $\beta$ -Blocker das Risiko für Nebenwirkungen und schwere Reaktionen erhöhen und die Therapie der schweren Reaktionen mit Adrenalin durch die Blockade der Rezeptoren erschwert ist. Umstritten ist jedoch, ob, aufgrund der Gefahr eines Angioödems, auch eine Therapie mit ACE-Hemmern als Kontraindikation gilt (Wedi und Kapp 2004). Fehlende oder mangelnde Compliance ist ebenfalls ein Grund, der gegen die Einleitung einer allergenspezifischen Immuntherapie spricht (Moote und Kim 2011). Erhöhte Vorsicht ist beim Einsatz der allergenspezifischen Immuntherapie bei Kindern unter 5 Jahren, alten Menschen und schwangeren Frauen geboten (Moote und Kim 2011; Wedi und Kapp 2004; Kleine-Tebbe et al. 2012). Eine ASIT sollte nach Möglichkeit in der Schwangerschaft nicht begonnen werden, eine bereits laufende ASIT, die gut vertragen wird, kann jedoch weitergeführt werden (Ring 1988, S. 147). Freilich sind auch bei Vorliegen von Kontraindikationen Ausnahmen möglich. Es muss immer eine Risiko-Nutzen-Abwägung durchgeführt werden, vor allem bei Insektengiftallergien, da bei einem Insektenstich auch eine tödliche Anaphylaxie auftreten kann.

### **1.2.7 Nebenwirkungen und unerwünschte Wirkungen**

Bei der allergenspezifischen Immuntherapie können verschiedenartige und verschieden schwere Nebenwirkungen auftreten. Nebenwirkungen und unerwünschte Reaktionen sind umso häufiger, je weniger gut die Indikation gestellt wurde, beziehungsweise je weniger adäquat die Risiko-Nutzen-Abwägung durchgeführt wurde. Auch bei Mischpräparaten von unterschiedlichen Allergenen und Verwendung von nicht standardisierten Präparaten treten Nebenwirkungen häufiger auf (Wedi und Kapp 2004). Grundsätzlich kann man lokale und systemische Reaktionen unterscheiden. Unter lokale Reaktionen fallen Rötung, Schwellung und Juckreiz an der Einstichstelle. Eine lokale Therapie mit Kühlung oder topischen Steroiden ist hier oft ausreichend. Die systemischen Reaktionen können mild bis schwer hin zur Anaphylaxie sein. Die ersten Symptome der Anaphylaxie können sehr variabel und unspezifisch sein, als Beispiele seien Urticaria, Dyspnoe, Ödeme, Schwindel, Synkope, Flush und gastrointestinale Symptome wie Krämpfe, Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen genannt (Moote und Kim 2011). Die Therapie erfolgt mit Adrenalin, Corticosteroiden, Antihistaminika und Bronchodilatoren (Moote und Kim 2011).

### **1.2.8 Sicherheit und Verträglichkeit**

Trotz gelegentlicher Nebenwirkungen und unerwünschter Reaktionen ist die allergenspezifische Immuntherapie eine sehr sichere und gut verträgliche Therapiemöglichkeit. Die Inzidenzen schwerer, nicht fatal verlaufender systemischer Nebenwirkungen liegen für unmodifizierte Semidepot-Präparate zwischen 0,002% und 0,0076%. Bei modifizierten Semidepot-Präparaten sind die Inzidenzen mit zwischen 0,01% und 0,005% pro Injektion etwas höher. Das Risiko eines anaphylaktischen Schocks lag bei 0,0004% pro Injektion. Die SLIT weist allgemein ein wesentlich geringeres Nebenwirkungsrisiko auf. Diese Ergebnisse beruhen auf einer Datenerhebung des Paul-Ehrlich-Instituts im Zeitraum zwischen 1991 und 2000 (Lüderitz-Püchel et al. 2001). In dieser Zeit wurden 555 schwerwiegende Reaktionen nach Injektion gemeldet, 37% wären durch Einhalten der Sicherheitsbestimmungen vermutlich zu verhindern gewesen. Essentiell sind also Sicherheitsvorkehrungen wie eine vor jeder Injektion durchzuführende ausreichende Anamnese, eine korrekte Indikationsstellung, adäquate Überwachung des Patienten, gut ausgebildetes Personal und gutes Notfallmanagement (Lüderitz-Püchel et al. 2001; Moote und Kim 2011; Wedi und Kapp 2004).



**Abbildung 2: Vorteile (grün) und Nachteile (rot) der ASIT**

### 1.2.9 Mechanismen

Trotz der langen klinischen Erfahrung mit der allergenspezifischen Immuntherapie sind ihre genauen Mechanismen noch nicht vollständig bekannt. Jedoch ist das Verständnis der Mechanismen unabdinglich für die Verbesserung sowohl der Wirksamkeit als auch der Sicherheit der ASIT. Der grundsätzliche Mechanismus der allergenspezifischen Immuntherapie ist die Induktion von Toleranz, vor allem der peripheren T-Zellen.

Eine besonders wichtige Rolle spielen hierbei die durch die allergenspezifische Immuntherapie aktivierten beziehungsweise induzierten  $T_{regs}$  (Cezmi A. Akdis MD 2010). Verschiedenen Subpopulationen der  $T_{regs}$  wurde eine Beteiligung an den Wirkungen der ASIT nachgewiesen: den natürlichen  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  regulatorischen T-Zellen, den adaptiven regulatorischen T-Zellen  $T_R1$  und  $T_H3$ , aber auch  $CD8^+$  regulatorischen T-Zellen und regulatorischen NK-Zellen. Diese Zellen sezernieren hauptsächlich die Zytokine IL-10 und TGF $\beta$ , wobei  $T_R1$ -Zellen hauptsächlich IL-10 produzieren und  $T_H3$ -Zellen vor allem TGF $\beta$ . Regulatorische T-Zellen hemmen die Antigenpräsentation (Jutel und Akdis 2011; Janeway und Murphy 2009) und die Aktivierung von dendritischen Zellen. Damit wird die Aktivierung von Effektor-T-Zellen sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine gesenkt. Über direkten Zell-Zell-Kontakt hemmen  $T_{regs}$  die Fc $\epsilon$ RI-abhängige Mediatorfreisetzung der Mastzellen. Diese Hemmung wird über OX40 und OX40L vermittelt (Gri et al. 2008).

Durch die Sekretion der inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  werden weitere hemmende Funktionen induziert. Effektor-T-Zellen wie  $T_H1$ -/ $T_H17$  und besonders  $T_H2$ -Zellen werden supprimiert und ihre Funktion dadurch eingeschränkt. Die Reifung von dendritischen Zellen und ihre Antigenpräsentation über MHC-II wird gesenkt. Auch die Interaktion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen wird gestört, indem IL-10 die Costimulation zwischen B7 und CD28 blockiert (Jutel et al. 2006). Ebenfalls durch IL-10 wird die

proinflammatorische Wirkung von sowohl eosinophilen Granulozyten als auch basophilen Granulozyten und Mastzellen vermindert. Der Spiegel des eosinophilen kationischen Protein (ECP), ein Marker der Aktivierung eosinophiler Granulozyten, sowie der Histamin-Spiegel, als Marker für Mastzellen, sinken. Auch die Chemokinproduktion sinkt, womit die Chemotaxis eingeschränkt ist, und somit inflammatorische Zellen nicht so leicht angelockt werden beziehungsweise ins Gewebe übertreten können (Jutel und Akdis 2011). So ist die Eosinophilie in den Atemwegen und die Hyperreagibilität der Atemwege vermindert (Van et al. 1998; Vissers et al. 2004). Der Transkriptionsfaktor FoxP3, der einen essentiellen Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen und ihre Proteine darstellt, wird durch IL-10 und TGF $\beta$  im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus hochreguliert, indirekt durch IL-10 und direkt und indirekt durch TGF $\beta$  (Jutel et al. 2006). Außerdem vermittelt TGF $\beta$  die erhöhte Expression von CTLA-4 auf T-Zellen und die verminderte Expression von Fc $\epsilon$ RI auf Langerhans-Zellen (Jutel et al. 2006). Die vorgenannten Abläufe zeigen die bedeutende Rolle der immunsuppressiven Zytokine. Vissers et al. zeigten diese Relevanz, indem sie mit der Blockade von IL-10 die Wirksamkeit der allergenspezifischen Immuntherapie aufhoben. (Vissers et al. 2004).

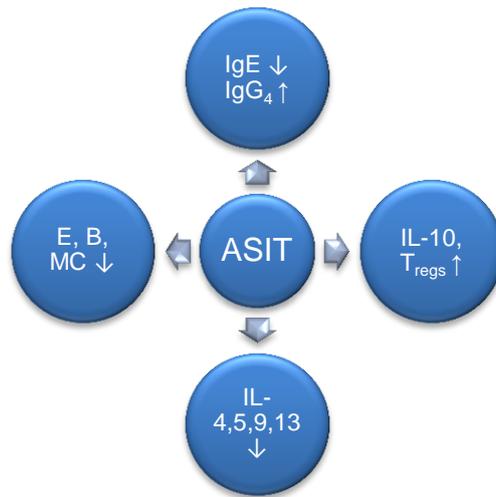
Im Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie verändert sich auch die Zusammensetzung der verschiedenen Antikörperklassen. Unter dem Einfluss von TGF $\beta$  steigt das allergenspezifische IgA, das vor allem im Bereich der Schleimhäute auftritt. IL-10 ist vor allem für den Antikörper-Switch von IgE zu IgG4 verantwortlich (Akkoc et al. 2011). Das allergenspezifische IgE sinkt im Laufe der ASIT, während das allergenspezifische IgG4 meist um das 10- bis 100fache ansteigt. Diese IgG4-Antikörper scheinen blockierende Eigenschaften aufzuweisen, indem sie das Allergen binden, bevor es an das zellgebundene IgE bindet, somit Mastzellen und basophile Granulozyten aktiviert und die allergische Sofortreaktion einleitet. Außerdem haben IgG4-Antikörper einige antiinflammatorische Eigenschaften. Sie zeigen eine geringere Affinität gegenüber Fc-Rezeptoren (Jutel und Akdis 2011). Auch sind Antikörper der Klasse IgG4 nicht zur Aktivierung des proinflammatorischen Komplement-Systems befähigt. Sie verhindern ebenfalls die Bildung von Immunkomplexen durch andere Antikörper. Es gibt jedoch Hinweise, dass die alleinige Erhöhung von Antikörpern der Klasse IgG4 im Serum nicht mit dem klinischen Erfolg der allergenspezifischen Immuntherapie korreliert. Sie scheint eher mit der applizierten Allergendosis zusammenzuhängen. Wichtig ist deshalb nicht nur die Quantität, sondern vor allem die Aktivität der allergenspezifischen IgG4-Antikörper (Jutel und Akdis 2011; Gilles und Traidl-Hoffmann 2012).

Im Verlauf einer allergenspezifischen Immuntherapie sind auch Veränderungen im Zytokin-Gleichgewicht erkennbar. Es zeigt sich eine Verschiebung des Zytokin-Gleichgewichts von

T<sub>H</sub>2 nach T<sub>H</sub>1. Die T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 nehmen ab, während die T<sub>H</sub>1-Zytokine IL-12 und IFN $\gamma$  relativ oder absolut zunehmen (Jutel und Akdis 2011; Jutel et al. 2006). Vissers et al. beschreiben diese Veränderungen im Verhältnis von IL-5 zu IL-10 (IL-5/IL-10-Ratio), das sich im Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie in Richtung IL-10 verschiebt (Vissers et al. 2004). Wie oben erwähnt steigen auch die inhibitorischen Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  an (Gogishvili et al. 2007; Vissers et al. 2004; Van et al. 1998).

Auch Histamin spielt eine bedeutende Rolle in der Induktion von Toleranz. Diese Wirkungen werden über den Histamin Rezeptor H<sub>2</sub> vermittelt. Die Sekretion von IL-10 durch dendritische Zellen und T<sub>H</sub>2-Zellen wird gesteigert. Umgekehrt wird die Sekretion von IL-12 von dendritischen Zellen sowie die Chemotaxis der eosinophilen Granulozyten gehemmt. Die Proliferation von T-Zellen und damit deren Sekretion von Zytokinen wie IL-4 und IL-13 wird gehemmt (Akdis et al. 2008). Histamin steigert auch die inhibitorische Wirkung von TGF $\beta$  auf T-Zellen (Kunzmann et al. 2003).

Diese durch die allergenspezifische Immuntherapie herbeigeführten Veränderungen treten in einem bestimmten zeitlichen Ablauf auf. In den ersten Tagen ist schon eine geringere Mediatorenfreisetzung durch Mastzellen und basophile Granulozyten zu erkennen. Im Laufe der ersten Woche steigt die Zahl der regulatorischen T-Zellen an. Im weiteren Verlauf steigt sowohl der Spiegel der allergenspezifischen Antikörper IgE und IgG4 an. Während die IgG4-Antikörper danach weiter steigen, sinken die IgE-Antikörper im Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie dann wieder ab. Für das erst spät absinkende IgE werden langlebige Plasma-Zellen verantwortlich gemacht, die das IgE noch über längere Zeit produzieren. Die Gewebereaktion nimmt ebenfalls erst ziemlich spät im Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie ab, die Anzahl der Mastzellen und eosinophilen Granulozyten im Gewebe sinkt (Jutel und Akdis 2011; Gilles und Traidl-Hoffmann 2012; Akdis und Akdis 2011).



**Abbildung 3: Molekulare Effekte der ASIT**

Durch die ASIT sinkt die Anzahl der Antikörper der Klasse IgE, während die der Klasse IgG4 steigen.

Die Zahl der Effektorzellen der Allergie, eosinophile Granulozyten (E), basophile Granulozyten (B) und Mastzellen (MC) sinkt.

Die T<sub>H</sub>2-Zytokine sinken, während die Anzahl der immunsuppressiven Zellen und immunsuppressive Zytokine ansteigen.

### 1.2.10 Einflussfaktoren und Verbesserung der Wirkung

Obwohl die allergenspezifische Immuntherapie eine gut etablierte Therapiemodalität ist, liegt es doch im Interesse, sowohl die Effektivität als auch die Verträglichkeit der allergenspezifischen Immuntherapie zu verbessern, um in Zukunft mehr Patienten durch diese Therapie helfen zu können. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Effektivität der allergenspezifischen Immuntherapie zu steigern. Die wichtigsten Mechanismen hierbei sind einerseits die Gabe verbesserter beziehungsweise veränderter Allergene, andererseits die Gabe von Adjuvantien.

Allergene werden immer weiter dahingehend verbessert, dass sie weniger allergen und trotzdem genauso immunogen wirken. Das wird erreicht, indem man Allergene herstellt, die nicht so gut an ihren spezifischen IgE-Antikörper binden und damit die Sofortreaktion über die Mediatorfreisetzung von Mastzellen nicht oder nicht so gut auslösen können, aber andererseits die Rezeptoren der T-Zellen so gut binden, dass sie eine Immunmodulation und T-Zell-Toleranz induzieren können. Dies ist deshalb möglich, da IgE-Antikörper und B-Zell-Rezeptoren nur komplexe dreidimensionale Strukturen erkennen, während T-Zell-Rezeptoren lineare Epitope erkennen. Es gibt verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Allergene, die im Artikel „Mechanisms of allergen-specific immunotherapy“ (Akdis und Akdis 2007) zusammengefasst wurden. Eine Möglichkeit ist die Fusion von verschiedenen Major-Allergenen zu einem rekombinanten Allergen. Auch können Fragmente von Major-Allergenen zu sogenannten chimären Allergenen fusioniert werden. Durch sterische

Hinderung wird die IgE-Bindung vermindert. Ferner wurde durch die Polymerisierung von Major-Allergenen eine verminderte Allergenität erzielt. So zeigte die Trimerisierung von Bet v 1 eine Verminderung der Mediatorenfreisetzung. Eine weitere Möglichkeit ist die Erstellung von Peptiden, die den T-Zell-Epitopen entsprechen und keine Fähigkeit zur Bindung von IgE aufweisen. Ebenso ist es möglich, Allergene zu fragmentieren und somit die T-Zell-Epitope zu erhalten, während die IgE-Bindungsstellen zerstört werden.

Durch die Gabe von Adjuvantien kann die Effektivität und die Sicherheit der allergenspezifischen Immuntherapie gesteigert werden. Depotpräparate mit Aluminiumhydroxid und L-Tyrosin verhindern die Dissemination der Allergene, erhalten ihre Konzentration im Gewebe und vermindern somit auch systemische Reaktionen (Bidad et al. 2011).

Liganden der Toll-like-Rezeptoren werden ebenfalls als Adjuvantien verwendet. Toll-like-Rezeptoren befinden sich insbesondere auf antigenpräsentierenden Zellen. Ihre Aufgabe besteht darin, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), also pathogen-spezifische Moleküle, zu erkennen. Bindung von Liganden an Toll-like-Rezeptoren führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit zur Bildung von Zytokinen. Die Aktivierung über Toll-like-Rezeptoren führt zu einer  $T_H1$ -dominierten Immunantwort und damit zur Verschiebung des Zytokin-Gleichgewichts zu Ungunsten einer  $T_H2$ -Antwort. Als Beispiel seien DNA-Bestandteile wie CpG (cytosine phosphorothionate guanosine), ein Ligand des Toll-like-Rezeptors 9 und MPL, ein LPS-Derivat, welches an Toll-like-Rezeptor 4 bindet, genannt. Diese Toll-like-Rezeptor-Liganden, an Allergene gekoppelt, steigern die  $T_H1$ -Antwort (Bidad et al. 2011; Frew 2010; Johansen et al. 2005). Auch Liganden des Toll-like-Rezeptors 2, wie Lipopeptide und Peptidoglycane, haben  $T_H1$ -verstärkende und  $T_H2$ -schwächende Eigenschaften (Johansen et al. 2005; Ring und Gutermuth 2011). Ebenso wirken sie regulatorisch, indem sie regulatorische T-Zellen, sowohl  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$ , aktivieren (Tsai et al. 2010).

Es wurde gezeigt, dass auch mykobakterielle Adjuvantien das Risiko für allergische Reaktionen senken (Ring und Gutermuth 2011; Bidad et al. 2011; Stirling und Chung 2000). Die Bindung des Allergens an virusartige Partikel (virus-like particles) verbessert die Wirkung der allergenspezifischen Immuntherapie. Die Immunogenität wird dadurch im Vergleich zur Allergenität gesteigert (Ring und Gutermuth 2011; Bidad et al. 2011).

Ma et al. (Ma et al. 2010) zeigten, dass die Gabe von Vitamin D3 die Effektivität der allergenspezifischen Immuntherapie steigert. Vitamin D3 hat nicht nur Wirkungen im Bereich des Calcium- und Phosphatstoffwechsels, sondern auch immunmodulatorische Eigenschaften. Viele Zellen des Immunsystems haben membranständige oder zytosolische

Vitamin D3-Rezeptoren, zum Beispiel B- und T-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen (Ma et al. 2010).

Für Omalizumab, einen rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörper gegen IgE (Anti-IgE-Antikörper), wurde ebenfalls eine Verbesserung der allergenspezifischen Immuntherapie nachgewiesen. Dieser Antikörper bindet lösliches IgE und verhindert die Bindung der IgE-Antikörper an die Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen, Basophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Wirkung der allergenspezifischen Immuntherapie gesteigert wird und dass Nebenwirkungen der allergenspezifischen Immuntherapie, vor allem systemische Nebenwirkungen, weniger häufig auftreten. Mit der Prämedikation mit Omalizumab soll erreicht werden, dass durch eine größere Sicherheit der allergenspezifischen Immuntherapie die Indikationsstellung dieser Therapie ausgeweitet werden kann. Dies ist vor allem bei Patienten mit erhöhtem Risiko, zum Beispiel Asthmapatienten, oder bei Patienten, bei denen die allergenspezifische Immuntherapie auf Grund von unerwünschten systemischen Wirkungen nicht (weiter) durchgeführt werden kann, besonders relevant (Kopp et al. 2009; Kopp 2011).

Es wurden auch Studien durchgeführt, die als Adjuvantien Inhibitoren der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-13 einsetzten. Diese Inhibitoren konnten zwar die Sensibilisierung durch Allergene vermindern, auf die allergenspezifische Immuntherapie zeigten sie jedoch nicht die erwartete Wirkung (Gogishvili et al. 2007).

Für eine weitere Verbesserung der Wirksamkeit der allergenspezifischen Immuntherapie wurden auch neue Applikationsformen in Betracht gezogen. Senti et al. beschrieben die intralymphatische Immuntherapie, bei der, unter sonografischer Kontrolle, die Allergene über oberflächliche Lymphknoten appliziert werden. Die Vorteile dieses Verfahrens sind zum einen die weniger häufigen Injektionen und die geringere Dosis an Allergenen die benötigt wird. Zum anderen ist laut Senti et al. die ILIT (intralymphatic immunotherapy) sehr gut verträglich, sehr effektiv, quasi schmerzfrei und fördert die Compliance der Patienten (Senti et al. 2009; Bidad et al. 2011).

## **1.3 Tumornekrosefaktor α – TNFα**

### **1.3.1 Definition**

Der Tumornekrosefaktor α, kurz TNFα, ist ein Zytokin mit zahlreichen verschiedenen Funktionen und Eigenschaften. Er spielt eine Rolle im Immunsystem, bei Entzündungsreaktionen, in der Apoptose und der Hemmung von Zellwachstum. Ebenso hat TNFα wachstumsfördernde Eigenschaften und wirkt als Wachstums- und

Differenzierungsfaktor. TNF $\alpha$  vermittelt seine Wirkungen über Zellregulation und im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen und Mediatoren.

### **1.3.2 Geschichte**

Ursprünglich hatte TNF $\alpha$  Bedeutung in der Tumorthherapie. Schon vor über hundert Jahren wurden Fälle von Tumorpatienten beobachtet, bei denen es, vor allem im Rahmen einer begleitenden Infektion, zur Tumorregression oder sogar Heilung kam. Um 1890 entwickelte William Coley eine Tumorthherapie mit bakteriellen Toxinen. Diese Therapie wurde jedoch bald von den neueren Radio- und Chemotherapien abgelöst. Später fand man heraus, dass das Phänomen der Tumorregression über Lipopolysaccharide beziehungsweise Endotoxin vermittelt wurde (Balkwill 1989; Wanebo 1989). O'Malley beschrieb 1962, dass diese Eigenschaft über das Serum behandelter Tiere übertragbar sei (Balkwill 1989). 1975 benannte Carswell diese vermittelnde Substanz „Tumornekrosefaktor“ (Carswell et al. 1975). Fast zehn Jahre später wurde das menschliche Gen für TNF sequenziert (Balkwill 1989; Wanebo 1989).

### **1.3.3 Struktur von TNF $\alpha$**

Das Gen von TNF $\alpha$  liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Chr 6p21.3) und befindet sich damit in der Region, die auch für MHC-Moleküle codiert. Es enthält vier Exons. Zuerst wird TNF $\alpha$  in der Zelle als 26 kDa schweres und 233 Aminosäuren langes Propeptid produziert (Wanebo 1989). Dieses Propeptid wird zuerst als Transmembranprotein in die Zellmembran transportiert. Es ist ein sogenanntes Typ-II-Membranprotein, was bedeutet, dass es sich um ein Protein mit einer einzelnen Transmembranhelix handelt, dessen N-terminales Ende auf der zytosolischen Seite der Membran liegt (Hehlgans und Mannel 2002). Auch hier ist es schon biologisch aktiv (Hehlgans und Pfeffer 2005). Es wird von der Metalloprotease TACE (TNF $\alpha$  Converting Enzyme) gespalten und dadurch entsteht die lösliche Form des TNF $\alpha$ . Diese ist 157 Aminosäuren lang und ist 17 kDa schwer. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,3 (Wanebo 1989). Diese Form lagert sich zumeist als Homotrimer zusammen und bildet das 51 kDa schwere aktive, lösliche TNF $\alpha$  (Balkwill 1989). Nur so können die TNF-Rezeptoren aktiviert werden (Eck und Sprang 1989).

### **1.3.4 Freisetzung von TNF $\alpha$**

Die Freisetzung von TNF $\alpha$  erfolgt über verschiedene Wege. Zum einen kann TNF $\alpha$  über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren und die weitere Vermittlung über den NF- $\kappa$ B Signalweg produziert werden (Janeway und Murphy 2009, S. 536). Die Liganden für Toll-like-Rezeptoren sind zum Beispiel Bestandteile der Bakterienwand wie zum Beispiel Lipopolysaccharide. Nach Stimulation durch Endotoxin ist die maximale Serumkonzentration

des TNF $\alpha$  nach zwei Stunden erreicht, allerdings sinkt sie aufgrund der kurzen Halbwertszeit (18,2 Minuten) auch sehr schnell wieder ab (Oliver et al. 1993). Auch Viren können die Freisetzung von TNF $\alpha$  triggern. Andere Zytokine wie IL-1 und IFN $\gamma$ , aber auch CSF (colony stimulating factors) können ebenfalls die Bildung von TNF $\alpha$  induzieren.

Produzenten des TNF $\alpha$  sind vor allem Makrophagen und Monozyten, besonders die Kupffer-Zellen der Leber und peritoneale Makrophagen, gefolgt von Monozyten aus dem Blut und Makrophagen der Milz (Wanebo 1989). Aber auch Lymphozyten, dendritische Zellen und sogar Mastzellen können die Quelle für TNF $\alpha$  sein (Balkwill 1989; Hehlhans und Mannel 2002; Janeway und Murphy 2009, S. 79).

Hemmend auf die Freisetzung von TNF $\alpha$  wirkt exogenes Insulin und PGE<sub>2</sub>. Ebenso senken  $\beta$ -Blocker und Adrenalin den TNF $\alpha$ -Spiegel (Wanebo 1989).

### 1.3.5 Funktion

#### 1.3.5.1 TNF $\alpha$ als wachstumsfördernder und zytotoxischer Faktor

TNF $\alpha$  ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen.

Eine wichtige Rolle spielt TNF $\alpha$  im Zellwachstum und der Zellteilung. TNF $\alpha$  wirkt dabei synergistisch mit Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) und Insulin und stimuliert sowohl deren Produktion als auch eine erhöhte Expression ihrer Rezeptoren. TNF $\alpha$  aktiviert *second messenger* wie c-myc oder MAPK (mitogen-activated protein kinase) und vermittelt so den Übergang der G<sub>0</sub> in die G<sub>1</sub>-Phase im Zellzyklus und wirkt somit mitogen (Vietor et al. 1993; Balkwill 1989). Dieser Effekt wurde zuerst in Fibroblasten gezeigt (Palombella et al. 1988).

Im Gegensatz dazu hat TNF $\alpha$  aber auch zytostatische und zytotoxische Eigenschaften. TNF $\alpha$  unterstützt ebenfalls die Aktivität von Makrophagen in der Abtötung bestimmter Immunzellen durch beispielsweise die Induktion der NO-Produktion (Janeway und Murphy 2009, S. 455).

Namensgebend für TNF $\alpha$  war die zytotoxische Wirkung gegenüber bestimmten Tumoren, die zur Regression und in einigen Fällen sogar zum völligen Verschwinden von Tumoren führte (siehe auch Kapitel 1.3.2). Asher et al. beschrieben den Einfluss von TNF $\alpha$  auf verschiedene Tumoren in Mäusen. Sie fanden heraus, dass die Fähigkeit zur Einleitung der Nekrose der Tumorzellen von der Immunogenität der verschiedenen Tumoren abhängt. Bereits 24 Stunden nach TNF-Gabe fand sich eine deutliche Nekrosezone in bestimmten Tumoren, nach 72 Stunden fand sich ein Gemisch aus Entzündungszellen und Zellschatten der Tumorzellen (Asher et al. 1987). Die zytotoxischen Effekte des TNF $\alpha$  werden über die sogenannte Todesdomäne an Rezeptoren vermittelt und über die folgende Caspasen-Aktivierung eingeleitet (Hehlhans und Pfeffer 2005) (siehe auch Kapitel 1.3.6). Auch toxische

Leukotriene und freie Radikale sind unter anderem an der Zytostase beteiligt (Balkwill 1989). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass TNF $\alpha$  synergistisch mit einer Reihe von Zytostatika wirkt (Regenass et al. 1987).

#### **1.3.5.2 TNF $\alpha$ und Kachexie**

Die Ausschüttung von hohen Mengen von TNF $\alpha$  führt zu Gewichtsverlust und folgend zur Kachexie. Cerami et al. beschrieben als Ursache vor allem eine Hemmung der Lipoproteinlipase. Die Lipoproteinlipase ist für die Hydrolyse der Triacylglyceride und somit für die Versorgung der Fettzellen mit Fettsäuren zuständig. Somit ist eine Hypertriglyceridämie bei Entzündungen nachweisbar. Da TNF $\alpha$  vor allem bei chronischen Erkrankungen und Tumoren erhöht ist, und es Nachweise gibt, dass die Tumorzellen selbst potente TNF $\alpha$ -Produzenten sind, ist in diesen Fällen oft eine Kachexie zu beobachten (Tumorkachexie) (Cerami und Beutler 1988).

In den 1980er Jahren wurde die Ursache der Kachexie einem Zytokin namens Cachektin zugeschrieben. Später fand man jedoch heraus, dass Cachektin dem TNF $\alpha$  entspricht (Beutler et al. 1985).

#### **1.3.5.3 TNF $\alpha$ im Immunsystem und in der Entzündung**

Die Wirkung des TNF $\alpha$  auf das Immunsystem beginnt schon in dessen Entwicklung. Bei fehlendem TNF $\alpha$  ist die Bildung von folliculären dendritischen Zellen blockiert, die Bildung der Peyer Plaques ist gehemmt (Hehlgans und Pfeffer 2005). Auch die Mikroarchitektur der weißen Pulpa der Milz ist gestört (Janeway und Murphy 2009, S. 380). TNF $\alpha$  hat auch Einfluss auf verschiedene Zellen des Immunsystems: neben der oben erwähnten Stimulation der Phagozytoseaktivität der Makrophagen aktiviert TNF $\alpha$  auch neutrophile Granulozyten und B-Zellen und fördert die Antikörperproduktion. TNF $\alpha$  steigert die MHC-I Expression und die IL-1 Produktion. TNF $\alpha$  und IL-1 haben viele gemeinsame Wirkungen, vor allem im Bereich der Entzündungsreaktion. Beide wirken proinflammatorisch und induzieren Fieber (Dinarello et al. 1986). Allerdings unterscheiden sie sich dadurch, dass IL-1 weniger zytotoxische Eigenschaften aufweist und die MHC-Produktion nicht so ausgeprägt steigert wie TNF $\alpha$  (Dinarello et al. 1986). Auch fördert TNF $\alpha$  die Bildung von Interferon  $\gamma$  und GM-CSF, wodurch über eine positive Rückkopplung auch wieder die Freisetzung von TNF $\alpha$  gesteigert wird (Wanebo 1989).

TNF $\alpha$  ist auch bei akuten Entzündungen maßgeblich beteiligt. In der Leber fördert er die Bildung von Akute-Phase-Proteinen, wie CRP (C-reaktives Protein), Komplementfaktoren, Fibrinogen, Prothrombin und Weiteren (Deetjen und Alzheimer 2005, S. 388ff; Hof et al. 2005, S. 104). Durch eine Steigerung der COX-2 (Cyclooxygenase 2) kommt es zur erhöhten Bildung von PGE<sub>2</sub> und folglich im Hypothalamus zur Auslösung von Fieber (Janeway und

Murphy 2009, S. 117). TNF $\alpha$  spielt auch eine Rolle in der Endothelaktivierung. Er steigert die Permeabilität der Gefäße, löst Tight junctions (Janeway und Murphy 2009, S. 606) und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen, die aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen freigesetzt werden (Janeway und Murphy 2009, S. 114). Selektine erkennen Integrine auf Leukozyten, leiten die Adhäsion dieser Zellen ein und ermöglichen schließlich die Diapedese. So kommt es zur Bildung von Ödemen, zur vermehrten Durchblutung von Geweben und schließlich auch zur Gewebeerstörung (Hehlgans und Mannel 2002). Durch eine von TNF $\alpha$  verursachte Steigerung der lokalen Gerinnungsaktivität wird versucht, die Entzündung möglichst lokal zu halten und die weitere Ausbreitung von Pathogenen zu verhindern (Janeway und Murphy 2009, S. 117).

Auch bei vielen Autoimmunerkrankungen und chronischen Erkrankungen ist TNF $\alpha$  erhöht, so zum Beispiel bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Hier sind seit längerem Antikörper gegen TNF $\alpha$  therapeutisch im Einsatz. Seit einigen Jahren mehren sich in der Literatur Hinweise, dass auch eine Stimulation des TNFR2, zum Beispiel mit TNF $\alpha$ -Agonisten künftig in der Therapie von zum Beispiel Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden könnten. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass hierdurch nicht nur T<sub>regs</sub> stimuliert werden, sondern auch autoreaktive T-Zellen selektiv zerstört werden (Faustman und Davis 2010; Faustman und Davis 2013).

Als Maximalvariante kann TNF $\alpha$  auch einen septischen Schock mit Kreislaufversagen auslösen. Im Rahmen der akuten Entzündung sind neben TNF $\alpha$  auch IL-6 und IL-1 $\beta$  beteiligt, die synergistisch wirken. Diese drei Zytokine werden auch als endogene Pyrogene bezeichnet (Janeway und Murphy 2009, S. 117). In Ratten, die rekombinanten TNF $\alpha$  erhielten, konnte ein schockähnlicher Zustand ausgelöst werden (Cerami und Beutler 1988). Im Umkehrschluss wurde gezeigt, dass in TNF-Rezeptor-defizienten Mäusen kein septischer Schock ausgelöst werden kann (Pfeffer et al. 1993), allerdings kann die entzündliche Reaktion auch nicht begrenzt werden. Das weist auch auf immunregulatorische Funktionen des TNF $\alpha$  hin.

#### **1.3.5.4 Immunregulatorische Funktionen von TNF $\alpha$**

Es gibt viele Hinweise für immunregulatorische Funktionen von TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  ist neben IFN $\gamma$  ein starker Aktivator derIDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase). Diese hat immunsuppressive Eigenschaften zum Beispiel die Induktion von T<sub>regs</sub> (Chen et al. 2008a; Li et al. 2011). T<sub>regs</sub> können auch direkt durch TNF $\alpha$  induziert werden. Diese Aktivierung wird über den TNFR2 vermittelt (Chen et al. 2007). TSG-6 ist ein TNF $\alpha$ -induziertes Protein, das ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften aufweist (Wisniewski und Vilcek 1997). Ob und wann TNF $\alpha$  pro- oder antiinflammatorisch wirkt, scheint unter anderem von der Dosis des TNF $\alpha$

und der Dauer der Wirkung abzuhängen. Auch die postseptische Immunsuppression scheint durch TNF $\alpha$  verursacht (Chen et al. 2007).

### 1.3.5.5 Weitere Funktionen

TNF $\alpha$  schützt Zellen vor der Infektion durch Viren, schafft also einen antiviralen Status. Allerdings ist dieser Effekt nicht so ausgeprägt wie bei den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Interferonen (Balkwill 1989).

Die Rolle von TNF $\alpha$  im Knochen besteht in der Aktivierung von Osteoklasten und damit im Knochenabbau. Auch Chondrozyten werden zum Abbau von Proteoglycanen und zur Sekretion von knorpelabbauenden Enzymen wie zum Beispiel Kollagenase stimuliert. Prostaglandin E2 steigt unter TNF $\alpha$ -Einwirkung an (Dayer et al. 1985; Wanebo 1989).

Ferner ist TNF $\alpha$  an der Neoangiogenese beteiligt (Balkwill 1989).

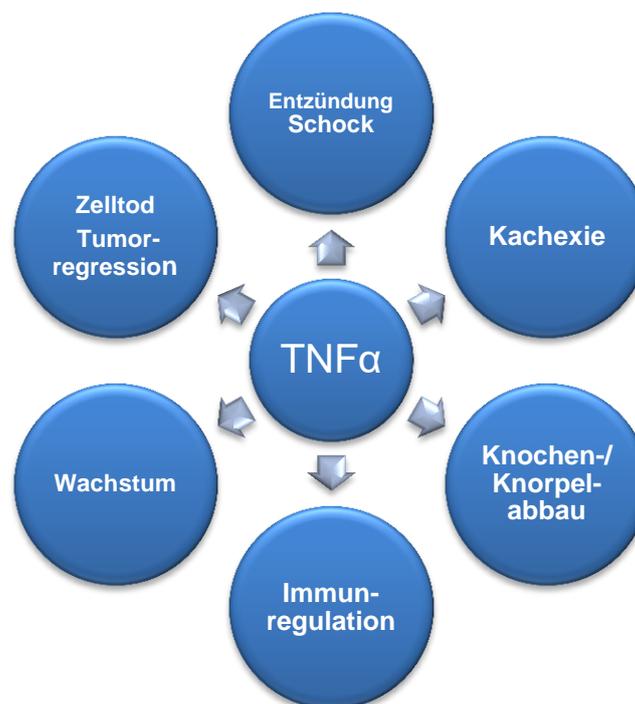


Abbildung 4: Zusammenfassung der wichtigsten Funktionen von TNF $\alpha$

### 1.3.6 Die TNF-Familie und ihre Rezeptoren

Zur TNF/TNFR Superfamilie gehören zwischenzeitlich mehr als 40 Moleküle (Hehlgans und Pfeffer 2005). Bei den Liganden gehören neben TNF $\alpha$  auch Lymphotoxin  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) und Lymphotoxin  $\beta$  (LT $\beta$ ) zur engeren TNF-Familie. Weitere Liganden sind zum Beispiel FASL (Fas Ligand), RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), APRIL (a proliferation induced ligand), und OX40L. Bei den Rezeptoren kann man verschiedene

Gruppen unterscheiden: FAS (CD95), TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor), TRAMP (TNF-like receptor apoptosis mediating protein) und TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1) besitzen alle eine sogenannte Todesdomäne und können somit die Apoptose der Zielzelle einleiten.

OX40, TNFR2 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2), CD27, CD30, CD40, LT $\beta$ R und RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B) hingegen haben TIMs (TRAF-interacting motifs). Damit können sie TRAFs (TNFR-associated factor) binden. Bisher sind 6 TRAFs bekannt, die die Rezeptoren, weitere Signalmoleküle und IAPs (inhibitors of apoptosis) binden können (Hehlgans und Pfeffer 2005).

### **1.3.6.1 Liganden**

#### **1.3.6.1.1 Lymphotoxin $\alpha$ (LT $\alpha$ )**

Das Zytokin Lymphotoxin  $\alpha$ , auch TNF $\beta$  genannt, gehört ebenfalls zur TNF-Familie. Dieses Zytokin hat ähnliche Eigenschaften wie TNF $\alpha$ . Auch die zugehörigen Gene finden sich in direkter Nachbarschaft. Die beiden Moleküle stimmen zu 30% ihrer Aminosäuren überein und nutzen die gleichen Zellrezeptoren. Allerdings ist von Lymphotoxin  $\alpha$  keine membranständige Form bekannt (Balkwill 1989). Lymphotoxin  $\alpha$  wird von aktivierten T-Lymphozyten produziert. Auch Lymphotoxin  $\alpha$  lagert sich zu Homotrimeren zusammen, gleichwohl sind auch Heterotrimere mit LT $\beta$  bekannt. Die Homotrimere aktivieren, wie TNF $\alpha$  selbst, die beiden TNF $\alpha$ -Rezeptoren TNFR1 und 2 (Hehlgans und Mannel 2002).

#### **1.3.6.1.2 Lymphotoxin $\beta$ (LT $\beta$ ) und LIGHT**

LT $\beta$  wird ebenfalls von aktivierten Lymphozyten exprimiert. LT $\beta$  existiert nur als membranständiges Molekül, eine lösliche Form ist bis dato unbekannt. Diese membranständige Form kann Heterotrimere mit LT $\alpha$  bilden: LT $\alpha_1\beta_2$  und LT $\alpha_2\beta_1$ . LT $\alpha_2\beta_1$  bindet ebenso wie LT $\alpha$  und TNF $\alpha$  an die Rezeptoren TNFR 1 und 2, während LT $\alpha_1\beta_2$  an den LT $\beta$ -Rezeptor (LT $\beta$ R) bindet. Dieser Rezeptor bindet auch den Liganden LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with herpes simplex virus glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T-lymphocytes), während LIGHT auch noch an den spezifischen Rezeptor HVEM (Herpes Virus Entry Mediator) bindet (Hehlgans und Mannel 2002; Hehlgans und Pfeffer 2005).

### **1.3.6.2 Rezeptoren**

Die vielfältigen Wirkungen von TNF $\alpha$  werden über zwei membranständige Rezeptoren vermittelt, Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) 1 und 2. Diese sind in ihrer extrazellulären Domäne sehr ähnlich und zeichnen sich unter anderem durch Cystein-reiche Domänen und

Disulfidbrücken aus (Hehlhans und Pfeffer 2005), unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer intrazellulären Domäne und ihrer Signaltransduktion. Die Anzahl der Rezeptoren kann durch zum Beispiel IFN $\gamma$  gesteigert werden (Wanebo 1989).

#### 1.3.6.2.1 TNFR1

Dieser Rezeptor, auch p55 oder CD120a genannt, hat eine Masse von 55-60 kDa. TNFR1 wird auf fast allen Geweben exprimiert. Vor allem der lösliche TNF ist ein Ligand des TNFR1, wobei auch der membranständige TNF gebunden wird. TNFR1 kann durch eine intrazelluläre sogenannte Todesdomäne die Apoptose der Zielzelle einleiten. Nach Bindung von TNF $\alpha$  lagert sich der Rezeptor zu Trimeren zusammen (Janeway und Murphy 2009, S. 458), wird internalisiert und bindet Adaptermoleküle. Dazu gehören TRADD (TNFR-associated Death Domain) und FADD (Fas-associated Death Domain). Diese bilden gemeinsam den DISC (Death-inducing signaling complex). Dieser wiederum bindet die Procaspase 8, die sich durch ihre hohe lokale Konzentration autokatalytisch spaltet. Dadurch wird Caspase 8 freigesetzt und es kommt zur kaskadenartigen proteolytischen Aktivierung weiterer Caspasen, die durch ihre proteolytische Aktivität zum Zelltod führen. Zuerst werden Proteine des Zytoskeletts gespalten und anschließend die dadurch freigesetzte DNA fragmentiert (Hehlhans und Mannel 2002). Um eine fälschliche oder Liganden-unabhängige Aktivierung der Todesdomänen zu vermeiden, gibt es die SODDs (silencer of death domains). Diese binden die Todesdomänen und verhindern die Rekrutierung von TRADD (Hehlhans und Pfeffer 2005). Bei Ligandenbindung dissoziiert SODD und ermöglicht die Bindung von TRADD. Durch die IAPs (inhibitors of apoptosis) wird ebenfalls die Einleitung der Apoptose verhindert. Die IAPs hemmen die Effektor-Caspasen. Induziert werden die IAPs unter anderem über den NF- $\kappa$ B-Signalweg.

TRADD kann aber auch einen anderen Signalweg vermitteln, indem es TRAF2 (TNF-associated factor 2) und RIP (receptor interacting protein) anregt. Dadurch werden weitere Signalwege aktiviert, so der NF- $\kappa$ B- und der AP-1-Signalweg. Im NF- $\kappa$ B-Signalweg wird zunächst die IKK (I $\kappa$ B-Kinase) aktiviert. Diese phosphoryliert die I $\kappa$ B, ein NF- $\kappa$ B-inhibierendes Molekül. Durch die Phosphorylierung wird NF- $\kappa$ B freigesetzt und ist nun aktiv. Weitere Signalwege laufen über die Aktivierung von MAP-Kinasen, so zum Beispiel p38 und JNK/AP-1 (Faustman und Davis 2010; Janeway und Murphy 2009, S. 297). Durch diese Signalwege werden eher anti-apoptotische Signale und Transkriptionsfaktoren aktiviert und eine inflammatorische Reaktion ausgelöst (Hehlhans und Mannel 2002). Diese Signalwege können im Gegensatz zum apoptoseinduzierenden Signalweg auch ohne eine Internalisierung des Rezeptors stattfinden.

#### 1.3.6.2.2 TNFR2

Dieser Rezeptor, auch p75 oder CD120b genannt, hat eine Masse von 75-80 kDa. TNFR2 hat keine Todesdomäne und ist somit nicht direkt apoptoseauslösend. Er kommt nicht ubiquitär vor, sondern hauptsächlich in lymphatischem Gewebe. Die Expression wird genau reguliert. TNFR2 wird vor allem durch den membranständigen TNF aktiviert. Der Rezeptor bindet bei Aktivierung TRAF2 und aktiviert den NF- $\kappa$ B-Signalweg, den JNK/AP-1-Signalweg, den p38/MAPK Signalweg, den ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Signalweg und den PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-Signalweg. Diese wirken durch die Hochregulierung von den TNF-assoziierten Proteinen 1 und 2 (TRAF1 und 2) und den Apoptose-Inhibitoren c-IAP 1 und 2 anti-apoptotisch. Allerdings beobachtete man eine erhöhte Apoptoserate bei gleichzeitiger Aktivierung beider TNF $\alpha$ -Rezeptoren. Grell et al. vermuteten die Ursachen in der durch TNFR2 ausgelösten endogenen Produktion von TNF $\alpha$ , die wiederum TNFR1 aktiviert und einer intrazellulären Beeinflussung von TNFR1 durch TNFR2 über TRAF2 oder JNK (Jun N-terminal Kinase) (Grell et al. 1999; Hehlgans und Mannel 2002; Hehlgans und Pfeffer 2005).

#### 1.3.6.2.3 *Icp75TNF Receptor Type 2*

Hierbei handelt es sich um einen intrazellulären TNF-Rezeptor, der nicht auf der Zellmembran exprimiert wird. Ansonsten entspricht der Aufbau des Rezeptors dem des TNFR2-Rezeptors. Seine Aktivierung führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und hat somit anti-apoptotische und protektive Wirkungen. Das mag auch eine Erklärung dafür sein, dass Zellen die TNF-Rezeptoren exprimieren und zugleich selbst TNF produzieren, gegen die zytotoxischen Wirkungen des TNF geschützt sind (Hehlgans und Mannel 2002).

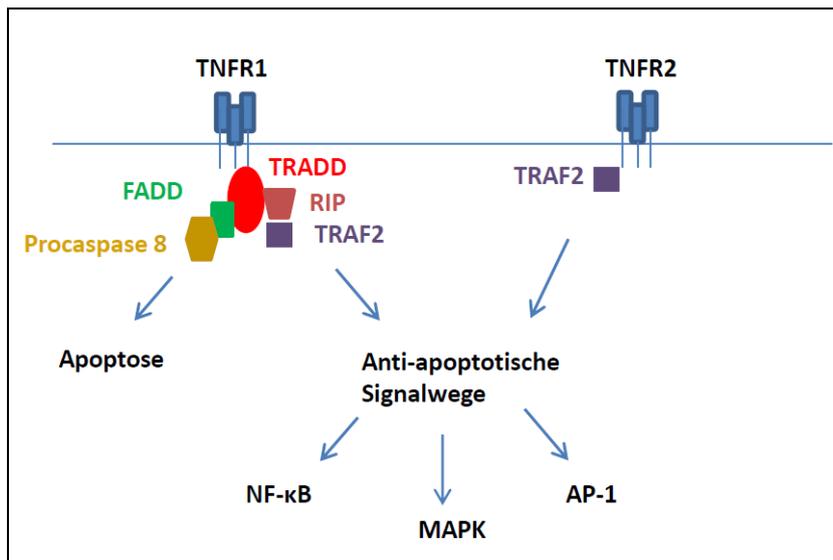


Abbildung 5: Signalweg der TNF-Rezeptoren

### 1.3.7 TNF $\alpha$ in der Therapie

Der therapeutische Einsatz von TNF $\alpha$  selbst ist aufgrund der nur kurzen Halbwertszeit nur schwierig möglich. Die Halbwertszeit liegt bei nur 18,2 Minuten (Oliver et al. 1993). Eine umso größere Rolle spielen jedoch Antikörper gegen TNF $\alpha$ . Diese werden vor allem in der Therapie von Autoimmunerkrankungen beziehungsweise Erkrankungen des Rheumatischen Formenkreises eingesetzt (Faustman und Davis 2010). Als Beispiele seien die chronische Polyarthrit, die Psoriasis-Arthritis, Psoriasis vulgaris, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Morbus Bechterew genannt. Die am häufigsten verwendeten Präparate sind Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Etanercept.

Infliximab, Handelsname Remicade®, ist ein monoklonaler, chimärer Antikörper, der nur intravenös verabreicht werden kann. Die Infusionen erfolgen in Woche 0, 2 und 6, anschließend alle 2 Monate. Die Halbwertszeit beträgt 26 Tage. Adalimumab, Handelsname Humira®, ist ein monoklonaler komplett humanisierter Antikörper, der alle zwei Wochen subkutan verabreicht wird und eine Halbwertszeit von 14 Tagen aufweist. Golimumab ist ebenfalls ein monoklonaler komplett humanisierter Antikörper, welcher subkutan im Abstand von 4 Wochen verabreicht wird. Etanercept, Handelsname Enbrel® ist ein Fusionsmolekül aus löslichem TNF-Rezeptor und IgG1-Fc-Anteil. Die Anwendung erfolgt subkutan 1-2 mal pro Woche. Die Halbwertszeit liegt bei 5 Tagen.

Unter Therapie mit TNF $\alpha$ -Antikörpern können einige zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten. So kann es zu lokalen Schwellungen und Reizungen der Einstichstelle kommen. Kopfschmerzen und Grippe-ähnliche Symptome können auftreten. Die Infektionsneigung bis hin zu septischen Infektionen ist erhöht, vor allem was opportunistische Infektionen betrifft. Da TNF $\alpha$  eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer Tuberkulose-Infektion durch das Immunsystem spielt, kann es bei der Blockade von TNF $\alpha$  zu

einer Reaktivierung der Tuberkulose kommen. Deshalb ist ein negativer Tuberkulose-Test vor Therapiebeginn nötig. Auch autoimmunartige Erkrankungen, wie zum Beispiel das lupus like syndrome oder Neuropathien können auftreten. Vor allem unter einer Therapie mit Adalimumab kann es zu einer Verschlechterung einer Herzinsuffizienz kommen. Besonders unter Infliximab als chimärem Antikörper besteht das Risiko einer allergischen Reaktion und eines Verlustes der Wirksamkeit aufgrund von Anti-Infliximab-Antikörpern. Auch ein erhöhtes Lymphomrisiko unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie wird diskutiert (Plewig 2012, S. 637–638, 2012, S. 1887–1892).

### **1.3.8 ASIT unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie**

Hintergrund dieser Arbeit war der Fall einer Patientin in unserer Klinik. Diese Patientin litt an rheumatoider Arthritis und M. Bechterew. Therapiert wurde sie mit Infliximab (Remicade®) und anschließend Etanercept (Enbrel®). Unter dieser Therapie waren ihre Erkrankungen lange Zeit stabil.

Diese Patientin stellte sich mit einer Wespengiftallergie vor. Das spezifische IgE gegenüber Wespengift lag bei über 100 kU/l. Die Patientin hatte in der Vorgeschichte mehrmals eine schwere Anaphylaxie erlitten. Deshalb wurde bei ihr unter Abwägung der Risiken trotz Anti-TNF $\alpha$ -Therapie eine allergenspezifische Immuntherapie eingeleitet. Es konnte unter der Therapie kein Anstieg des allergenspezifischen IgG4 nachgewiesen werden. Auch bei einer Stichprovokation kam es zu einer allergischen Reaktion. Nach drei Jahren ASIT mit bereits verdoppelter Dosierung, konnte immer noch kein IgG4-Anstieg nachgewiesen werden.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Blockade des TNF $\alpha$  eine erfolgreiche ASIT unmöglich macht beziehungsweise welche Rolle TNF $\alpha$  bei der ASIT spielt. Deshalb untersuchten wir im Mausmodell die ASIT unter Behandlung mit einem Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Kommentar	Hersteller	Bestellnummer
Albumin Bovine Fraction V (BSA)	Bovines Serumalbumin	Roth	8076.3
Anti-mouse/rat TNF $\alpha$ -Antikörper 1mg/ml	Functional Grade Purified, CloneTN3-19	eBioscience	16-7423-85
Citrat (Citric acid monohydrate)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Sigma	C-1909
Diff-Quik	Färbeset (3 Lösungen)	Medion Diagnostics	130832
	Fixierlösung: Fast Green 2mg/l in Methanol		
	Färbelösung I: 1,22 g/l Eosin Y in Phosphat-Puffer		
	Färbelösung II: 1,1 g/l Thiazin in Phosphat-Puffer		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO	Sigma	D-8418
Di-natriumcarbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma	S-7795
Di-natriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sodium phosphate dibasic)	Sigma	S-9763
Eosin Y		Thermo scientific	6766008
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck	1.00983.2511
Ether	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Merck	1.00921.1000
Entellan	Schnelleindeckmittel	Merck	107.961
FCS	Fötales Kälberserum	PAA	A15-041
Formaldehyd 37-40%	CH <sub>2</sub> O	Staub	
Hämalaun	Saures Hämalaun nach Mayer	Apotheke Klinikum rechts der Isar	
Imject Alum	Alu hydroxide + mg hydroxide + inactive stabilizers	Thermo Scientific Pierce Biotechnology	77161
Kaliumchlorid	KCl	Merck	1.04933.0500

Bezeichnung	Kommentar	Hersteller	Bestellnummer
Kaliumdihydrogenphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck	1.04873.1000
Kaliumhydroxid	KOH	Merck	1.05021.0250
Ketamin 10%	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{ClNO}$	WDT eG	E1222044WDD
Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000	LAL	Lonza	50-647U 50-648U
LPS	Lipopolysaccharid ultra pure E.coli K12 LPS 5 mg	Invivogen	Tlrl-eklps
Natriumchlorid	NaCl	Sigma	S-9888
Natriumdihydrogenphosphat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ Sodium phosphate monobasic monohydrat	Sigma	S-9638
Natriumhydrogencarbonat	$\text{NaHCO}_3$	Merck	1.06329.0500
OVA - Albumin from chicken egg white Grade V	Crystallized + lyophilized essentially salt-free	Sigma	A-5503
Paraffin	Paraplast 8 x 1 kg	Mc Cormick Scientific	501006
Perjodsäure	PAS Kit	Merck	1.01646
Pertex	Schnelleindeckmittel	Medite Burgdorf GmbH	PER 30000
Phosphate Buffered Saline (PBS), steril	pH 7,4	Gibco/Invitrogen	14190094
Polyoxythylene-Sorbitan Monolaureate	Tween 20 $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Sigma	P-7949
RPMI 1640		Gibco/Invitrogen	21875-034
Salzsäure	HCl, 32%	Merck	1.00319.2500
Schiff'sches Reagenz	PAS-Kit	Merck	1.01646
Schwefelsäure	$\text{H}_2\text{SO}_4$ , 96%	Merck	1.00731.2500
Sodium dodecyl sulfat solution 10%, 100 ml	SDS 10%	Fluka	71736
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$	Fluka	87748
Trizma Base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Sigma	T-1503
Trypan Blau 0,5% in NaCl 0,9%	$\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$	Böhringer-Mannheim	295833
Xylazin 2%	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}$	Ani Medica	
Xylol	$\text{C}_8\text{H}_{10}$	Merck	108681

## 2.1.2 Arbeitsmaterial

Bezeichnung	Kommentar	Hersteller	Bestellnummer
Aloecare TM Gentle Skin	Handschuhe	Meditrade	1231
C-Chip	Disposable hemocytometer System Neubauer Improved	Digital Bio	DHC-N01
Cellstar 5 ml	Glaspipetten	Greiner bio-one	606180
Cellstar 10 ml	Glaspipetten	Greiner bio-one	607180
Cellstar 20 ml	Glaspipetten	Greiner bio-one	760180
Cytofunnel	Disposable Sample Chambers	Shandon	5991040
Deckgläschen	18 x 18 mm	Menzel GmbH	BB018018A1
Diamond D200	Pipettenspitzen 200µl	Gilson	RWG9/79634
Easypeal easyseal	Sealing tape roll	Nunc	236707
epT.I.P.S. Standard	Pipettenspitzen 0,5-20 µl, 46 mm	Eppendorf	0030000.854
epT.I.P.S. Standard	Pipettenspitzen 2-200 µl, 53 mm	Eppendorf	0030000.870
epT.I.P.S. Standard	Pipettenspitzen 20-300µl, 55 mm	Eppendorf	0030000.897
epT.I.P.S. Standard	Pipettenspitzen 50-1000 µl, 71 mm	Eppendorf	0030000.919
Flachbodenplatten	für LAL	Nunc	167008
Histosetten	Tissue Processing/ embedding cassettes	Simport	M490-12 M490-5
Minocaps (Einmal-Kapillarpipette)	end to end 4µl, 30-32mm	Hirschmann Laborgeräte	9000104
Mikroschraubröhre	2 ml	Sarstedt	72.694.006
Neubauer Zählkammer	CE Doppelt	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	191844172
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH	ISO 8037/1
Objektträger-Kasten	neoLab für 100 OTs	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	2-2436
Omnifix-F 1 ml Luer Duo	Einmalspritze 25Gx5/8"	Braun	9161465V
Omnifix-F 1ml Luer Solo	Feindosierspritze Tuberkulinspritze	Braun	9161406V

<b>Bezeichnung</b>	<b>Kommentar</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Parafilm M	Laboratory film	American national Can Chicago	60631
Probenröhrchen (1 ml)	zur Plasmagewinnung	Kabe	Li1000A
Reaction Tubes, 1,5 ml		Greiner bio-one	616201
Shandon Filtercards white	für Cytospin	Thermo Fisher scientific	5991022
Tip-Tub, autoklavierbar	Trog zur Reagenzentnahme	Eppendorf	0030058.607
Tube 15 ml		Sarstedt	62.554.502
Tube 50 ml		Sarstedt	62.547.254
Tube 0,5 ml	Save Lock Tubes	Eppendorf	0030121.023
Tube 1,5 ml	Save Lock Tubes	Eppendorf	0030120.086
Tube 2,0 ml	Save Lock Tubes	Eppendorf	0030120.094
Tube 4,5 ml	Cryo Tube Vials	Nunc	337516
Tube		Sarstedt	55.476
Venflon Pro Venenerweilkanüle	20 GA, 1.26IN 1.1x32mm	BD	393204
Zellkulturplatten 96 well	Nunclon Surface	Nunc	163320

### 2.1.3 Pipetten

<b>Bezeichnung</b>	<b>Kommentar</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Eppendorf Reference	Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf	4910000.018
Eppendorf Reference	Pipette 2-20 µl	Eppendorf	4910000.026
Eppendorf Reference	Pipette 2-20 µl	Eppendorf	4910000.034
Eppendorf Reference	Pipette 10-100 µl	Eppendorf	4910000.042
Eppendorf Reference	Pipette 50-200 µl	Eppendorf	4910000.093
Eppendorf Reference	Pipette 100-1000 µl	Eppendorf	4910000.069
Transferpipette -12	12-Kanal-Pipette 20-200µl	Brand	30119a
Transferpipette -S12	12-Kanal-Pipette 20-200µl	Brand	30107a

#### 2.1.4 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CO <sub>2</sub> Inkubator	MCO-17AIC	Sanyo Fisher
Cytozentrifuge	Shandon Cytospin 3 MA 2470EO102	Shandon
Einbettautomat	EG 1150 C	Leica
Färbeautomat	Tissue stainer COT 20	medite
Flüssigstickstofftank	Apollo	Messer-Griesheim
Gefrierschrank	Economic Froster	Bosch
Käfige	Ventirack VRClassic (individually ventilated cage rack)	BioZone
Kühlschrank	Profi Line	Liebherr
Magnetrührer	RCTbasic	IKA Labortechnik
Mikroskop	DMLB	Leica
	Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikrotom	HM 355S	Microm
pH-Meter	CG 841	Schott
Photometer	Multiscan Ascent	Labsystems
Pipettierhilfen	Accu Jet	Brand
	Swift Pet	Abimed
Sterile Werkbank	HeraSafe HS15 96109275	Heraeus
Sterile Werkbank	HeraSafeHS15 96109276	Heraeus
Vernebler	Pari-Boy LC Sprint Junior	Pari GmbH
Vortexer		Bender/Hobein
	MS 1 Minishaker	IKA Labortechnik
Waage	SBC 31 Scaltec	Scaltec Instruments
	PB 303 Delta Range	Mettler Toledo
Wärmeschrank	TDO 50 Tissue Drying Oven	medite
Wasserbad	57°C PSI	Medizintechnik Grünwald
Zentrifuge	Megafuge 1.OR Thermo Electron Corporation	Heraeus/ Thermo Fisher

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus
	Biofuge pico	Heraeus

### 2.1.5 Tiere

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6 WT	Charles River, Deutschland

### 2.1.6 Betäubung, Ansatz

Bezeichnung	Kommentar	Hersteller
Ketamin/Xylazin	Ketamin 10%	WDT eG
	Xylazin 2%	Medica
	1 ml Ketamin; 0,1 ml Xylazin, mit PBS auf 10ml auffüllen	

### 2.1.7 Software

Software	Hersteller	Verwendungszweck
Ascent Software Version 2.6.	Thermo Labsystems	ELISA Auswertung
Citavi		Literaturverwaltung
Microsoft Office Professional Edition 2010	Microsoft Corporation	Statistische Auswertung, Grafiken, Text

### 2.1.8 Materialien für ELISA

Bezeichnung	Kommentar	Hersteller	Bestellnummer
Nunc Maxi sorb 96 well U-Form immuno plate	ELISA-Platte	Nunc	449824
BD OptEIA Set IL-5	Mouse IL-5 ELISA Set	BD Biosciences	555236
BD OptEIA Set IL-10	Mouse IL-10 ELISA Set	BD Biosciences	555252
BD OptEIA Set IFN $\gamma$	Mouse IFN $\gamma$ ELISA Set	BD Biosciences	555138
BD OptEIA Set TNF $\alpha$	Mouse TNF ELISA Set	BD Biosciences	555268
Mouse IL-13 CytoSet		Biosource/Invitrogen	CMC2223
OVA - Albumin from chicken egg white Grade V	Coating ELISA OVA IgG1	Sigma	A-5503
Monoklonaler Anti-Chicken Egg albumin Clone OVA 14	Standard ELISA OVA IgG1	Sigma	A-6075
Biotin Anti-mouse IgG1 0,5 mg/ml	Sekundärer AK ELISA OVA IgG1	BD Pharmingen	553441
OVA - Albumin from chicken egg white Grade V	Coating ELISA OVA IgE	Sigma	A-5503
Mouse Anti-ovalbumin IgE 0,1 mg/ml	Standard ELISA OVA IgE	Biozol	BZL 05653
Biotin Anti-mouse IgE 0,5 mg/ml	Sekundärer AK ELISA OVA IgE	BD Biosciences	553419
Sheep Anti-mouse IgE IgG fraction, monoclonal 34mg/ml	Coating ELISA total IgE	PC / The Binding Site	PC284
Purified Mouse IgE 0,5 mg/ml	Standard ELISA total IgE	BD Pharmingen	557079
Biotin-Conjugated Rat Anti-mouse IgE, monoclonal 0,5 mg/ml	Sekundärer AK ELISA total IgE	BD Pharmingen	553419
Streptavidin Peroxidase 1mg/ml	Für alle Ig-ELISA	Calbiochem	189733

## 2.1.9 ELISA

### 2.1.9.1 Puffer und Reagenzien

Assay Diluent (500 ml)

- 50 ml PBS, 10fach
- 50 ml FCS
- 450 ml Aqua dest.
- Lagerung bei 4°C

BSA 3% (500 ml)

- 15 g BSA (Albumin Bovine Fraction V)
- 50 ml Tris-Puffer, 10fach
- 450 ml Aqua dest.
- Lagerung bei 4°C

Citrat-Puffer (Substrat-/Galatti-Puffer) (200 ml)

- 8,41 g Citrat (citric acid monohydrate)
- 180 ml Aqua dest.
- pH 3.95 mit 4M KOH einstellen
- auf 200 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei 4°C

Coating-Puffer für ELISA: IL-5, IL-13, IFN $\gamma$ , Ig (500 ml)

- 4,20 g NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)
- 1,78 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Di-natriumcarbonat)
- 500 ml Aqua dest.
- Lagerung bei 4°C

#### Coating-Puffer für ELISA: IL-10, TNF $\alpha$ (500 ml)

- 9,25 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat)
- 5,90 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Di-natriumhydrogenphosphat)
- 450 ml Aqua dest.
- pH 6,5 mit 4 M KOH einstellen
- auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei 4°C

#### HCl 5M (200 ml)

- 100 ml HCl 32%
- 100 ml Aqua dest.
- Lagerung bei RT

#### H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M (Schwefelsäure) (420 ml)

- 60 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%
- 360 ml Aqua dest.
- Lagerung bei RT

#### KOH 4M (200 ml)

- 44,88 g KOH
- 200 ml Aqua dest.
- Lagerung bei RT

#### PBS 10fach (1 l)

- 80,0 g NaCl (Natriumchlorid)
- 11,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Di-natriumhydrogenphosphat)
- 2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)
- 2,0 g KCl (Kaliumchlorid)
- 900 ml Aqua dest.
- pH 7,4 mit 4M KOH einstellen

- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei RT

#### Tris-Puffer 10fach (1 l)

- 60,55 g Trizma Base
- 800 ml Aqua dest.
- pH 7,4 mit 5M HCl einstellen
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei RT

#### TMB (1 ml)

- 24 mg TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)
- 500 µg Ethanol absolute
- 500 µg DMSO (Dimethylsulfoxid, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO)
- Lagerung bei 4°C

#### Wasch-Puffer für Ig-ELISA (2 l)

- 1800 ml Aqua dest.
- 200 ml Tris-Puffer 10fach
- 2 ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate)
- Lagerung bei 4°C

#### Wasch-Puffer für Zytokin-ELISA (2 l)

- 1800 ml Aqua dest.
- 200 ml PBS 10fach
- 1 ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate)
- Lagerung bei 4°C

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Tierhaltung**

Es wurden weibliche C57BL/6 WT Mäuse verwendet, die bei Beginn der Versuche ca. 7 Wochen alt waren. Die Unterbringung erfolgte in einem spezifizierten, pathogenfreien (SPF) Tierstall in belüfteten Ventiracks, wobei jeweils bis zu vier Tiere in einem Käfig gehalten wurden. Zugang zu Wasser und Futter bestand ad libitum. Die Temperatur im Stall betrug 22°C, die Hell-/Dunkelphasen jeweils zwölf Stunden.

### **2.2.2 Blutentnahme am Auge (Retrobulbärer Venenplexus)**

Die anästhesierte Maus wurde mit dem Kopf leicht nach unten in der Hand gehalten. Mit Daumen und Zeigefinger wurde die periorbitale Haut leicht gestrafft.

Mit einer Kapillare wurde im Augwinkel, im Winkel von 45° in Richtung Orbitamitte, eingestochen und die Kapillare dabei vorsichtig gedreht bis Blut in die Kapillare eintrat. Dann wurde die Kapillare leicht zurückgezogen und das Blut in einem Röhrchen aufgefangen.

Das Blut wurde 7 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Analyse der Immunglobulinspiegel im Serum mittels ELISA bei -20°C eingefroren.

### **2.2.3 Intraperitoneale Injektion (i.p.)**

Die Mäuse wurden im Nacken mit Daumen und Zeigefinger fixiert und der Schwanz mit dem kleinen Finger gefasst. Bei Injektion wurde die Maus mit dem Kopf leicht nach unten gehalten um Verletzungen der inneren Organe zu vermeiden.

Die Injektion erfolgte im 30° Winkel knapp über einer gedachten Verbindungslinie beider Knie in den unteren rechten Quadranten des Abdomens nahe der Mittellinie, um eine Injektion in das Caecum zu verhindern.

Die Injektionslösung wurde in mäßigem Tempo und mit angemessenem Druck verabreicht.

### **2.2.4 Subkutane Injektion (s.c.)**

Die Mäuse wurden im Nacken gehalten, dabei eine Hautfalte gebildet und in diese Nackenfalte parallel zur Körperachse der Maus in moderater Geschwindigkeit injiziert.

Zuvor war das Nackenfell der Mäuse rasiert worden, um den Einstich zu erleichtern und einen korrekten Einstich zu gewährleisten.

### **2.2.5 Anästhesie**

Für eine Kurznarkose wurden die Mäuse mit Ether betäubt.

Für eine bis zu 30 min dauernde Narkose wurde eine Kombination aus Ketamin und Xylazin eingesetzt, um eine gute Allgemeinanästhesie bezüglich Analgesie, Muskelrelaxation und

vegetativen Wirkungen zu erreichen. 1 ml Ketamin 10% und 0,1 ml Xylazin 2% wurden mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Zur Anästhesie wurde den Mäusen 0,1 ml/10g KG i.p. langsam injiziert. Um ein Austrocknen der Cornea zu verhindern, wurde prophylaktisch eine Augensalbe verwendet. Während der Narkose wurde darauf geachtet, die Körpertemperatur der Mäuse nicht wesentlich absinken zu lassen.

Für die BAL wurde den Mäusen je 0,5 ml des o.g. Mischungsansatzes aus Ketamin/Xylazin verabreicht.

## **2.2.6 BAL**

Die Letalanästhesie der Mäuse erfolgte mit 0,5 ml des o.g. Mischungsansatzes aus Ketamin/Xylazin. Nach Erlöschen des Fußsohlenreflexes und anschließender Desinfektion mit Ethanol 80% erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes. Die Aorta wurde durchtrennt und die Tiere bluteten aus. Hierdurch sollte ein Übertritt von Bestandteilen des Blutes in die Lunge vermieden werden.

Anschließend wurde der Thorax eröffnet und die Trachea unter Schonung der Vena jugularis freigelegt. Die Trachea wurde punktförmig eröffnet und eine Kanüle (Venenverweilkanüle) eingeführt. Mit einer 1 ml Feindosierungsspritze wurden 0,8 ml PBS über die Kanüle in die Lunge gespritzt, der Thorax massiert und die BAL-Flüssigkeit vorsichtig wieder aufgezogen. Diese Spülung wurde 4x (V1), bzw. 2x (V2 und V3) wiederholt.

Die BAL-Flüssigkeit der ersten Spülung wurde separat in ein Tube (Tube1) gegeben, die BAL-Flüssigkeit der weiteren Spülungen in ein anderes Tube (Tube 2).

Tube 1 wurde bei 4°C mit 1000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand bei -20°C bis zur weiteren Analyse der Zytokinspiegel mittels ELISA eingefroren.

Anschließend wurden Tube 1 und Tube 2 gepoolt, ein weiteres Mal bei 4°C mit 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellett wurde in 600 µl RPMI/5%FCS aufgenommen und resuspendiert.

Alle Zellsuspensionen und Überstände wurden auf Eis gestellt.

## **2.2.7 Versuchsprotokoll**

### **2.2.7.1 Vorversuch**

Um die Menge des Antikörpers zu bestimmen, der nötig ist, um TNF $\alpha$  ausreichend zu blocken, wurde zunächst ein Vorversuch mit insgesamt 10 Mäusen durchgeführt. Den Mäusen wurden verschiedene Dosen eines Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers (50 µg, 100 µg, 250 µg) bzw. Placebo (PBS) intraperitoneal verabreicht. Sechs Stunden später wurden 10 µg LPS pro Maus intraperitoneal verabreicht (Ostberg et al. 2000), um die Bildung von TNF $\alpha$  zu induzieren. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuches, nach sieben und zehn

Stunden sowie zwei und vier Tage später. Aus den Serumproben erfolgte die Bestimmung der TNF $\alpha$ -Spiegel mit Hilfe des TNF $\alpha$ -ELISAs.

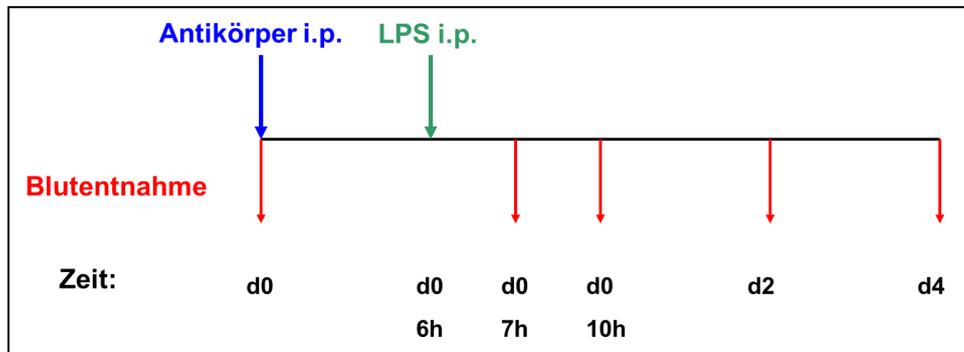


Abbildung 6: Protokoll Vorversuch

Anzahl der Mäuse	Injektion Versuchsbeginn	Injektion nach 6 Stunden
2 Mäuse	Placebo	Placebo
2 Mäuse	Placebo	10 $\mu$ g LPS
2 Mäuse	50 $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ - Antikörper	10 $\mu$ g LPS
2 Mäuse	100 $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ - Antikörper	10 $\mu$ g LPS
2 Mäuse	250 $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ - Antikörper	10 $\mu$ g LPS

Tabelle 1: Vorversuch: Übersicht über Gruppeneinteilung und Injektionen

### 2.2.7.2 Versuch

Das Versuchsprotokoll wurde von Joost L. M. Vissers et al. (Vissers et al. 2004) übernommen und dabei leicht abgewandelt.

Die Mäuse wurden mittels viermaliger intraperitonealer Injektion mit jeweils 10  $\mu$ g OVA (Ovalbumin Klasse V) adsorbiert an Aluminiumhydroxid (Imject Alum) in PBS an d0, d7, d14 und d28 sensibilisiert.

Zwei Wochen nach der letzten Sensibilisierung wurden die Mäuse in vier Gruppen à zehn Mäuse geteilt: die erste Gruppe erhielt Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und wurde immuntherapiert, die zweite Gruppe erhielt Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, wurde aber nicht immuntherapiert. Die dritte Gruppe wurde immuntherapiert, erhielt aber keinen Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, die vierte Gruppe erhielt weder Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper noch allergenspezifische Immuntherapie. Die

Versuchsanordnung der Versuche V2 und V3 wurde leicht verändert, die genaue Übersicht findet sich in Tabelle 2 und Tabelle 3.

Die allergenspezifische Immuntherapie fand dreimal in zweitägigem Abstand an Tag d42, d44 und d46 statt. 1 mg OVA (Ovalbumin Klasse V) in 0,2 ml PBS wurde subkutan in die Nackenfalte injiziert.

Der Antikörper wurde einmal vier Stunden vor der ersten allergenspezifischen Immuntherapie und einmal vier Stunden vor der ersten Challenge in einer Menge von 100 µg (bzw. 200 µg in einigen Tiergruppen in V2 und V3) und im Volumen von jeweils 0,2 ml (Verdünnung mit PBS) intraperitoneal gespritzt.

Die Challenge für die Tiere aller vier Gruppen wurde an d53, d56 und d59 durchgeführt, wobei 1% OVA in PBS vernebelt wurde und die Mäuse für 20 min zur Provokation exponiert wurden.

Die Kontrollgruppe von 5 Mäusen wurde mit Placebo (PBS) behandelt.

An d60 wurde bei allen Mäusen die bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt.

<b>Anzahl der Mäuse</b>	<b>d0-d28</b>	<b>d42 und d53</b>	<b>d42-d46</b>	<b>d53-d59</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Antikörper (100 µg) (AK)</b>	<b>ASIT (A)</b>	<b>Challenge</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Antikörper (100 µg) (AK)</b>	<b>Placebo</b>	<b>Challenge</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Placebo</b>	<b>ASIT (A)</b>	<b>Challenge</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>	<b>Challenge</b>
<b>5 Mäuse</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>

**Tabelle 2: V1: Übersicht über Gruppeneinteilung und Injektionen**

Anzahl der Mäuse	d0-d28	d42 und d53	d42-d46	d53-d59
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Antikörper (200 µg) (AK)	ASIT (A)	Challenge
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Antikörper (100 µg) (AK)	ASIT (A)	Challenge
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Placebo	ASIT (A)	Challenge
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Placebo	Placebo	Challenge
5 Mäuse	Placebo	Placebo	Placebo	Challenge

Tabelle 3: V2 und V3: Übersicht über Gruppenaufteilung und Injektionen

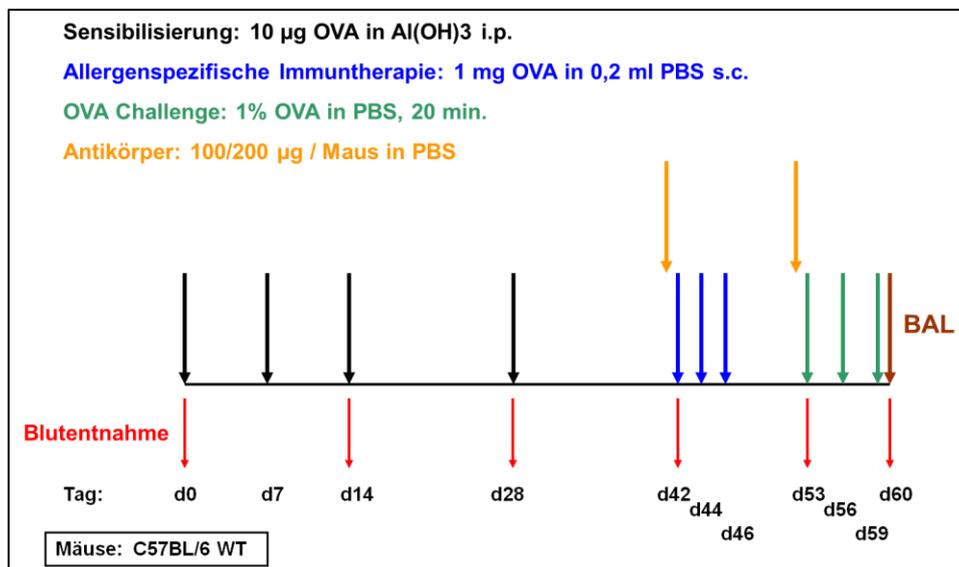


Abbildung 7: Protokoll Versuch 1-3

### 2.2.8 Zellzählung

Für jede Probe wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Zellzählungen über vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer bzw. des C-Chip (disposable hemocytometer) mit einem jeweiligen Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> (10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>) durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit Trypanblau verdünnt um einen besseren Kontrast zu erhalten und um tote Zellen (starke Farbaufnahme) kennzeichnen zu können. Dann wurden die verdünnten Proben auf die Neubauer Zählkammer bzw. den C-Chip (Einweg-Zählkammer) aufgebracht und die Zellen unter dem Mikroskop bei 20 bzw. 32 facher Vergrößerung gezählt.

Zur Berechnung der absoluten Zellzahl wurde zunächst der Mittelwert der gezählten Zellen berechnet und anschließend folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl (absolut)} = \frac{\text{Mittelwert (gezählt)}}{4 \text{ (Quadranten)}} \times 2 \times 10^4 \times \text{Gesamtvolumen der Suspension in ml}$$

wobei 2 dem Verdünnungsfaktor entspricht;  $10^4$  entspricht dem Volumen der Zählkammer.

### **2.2.9 Cytospin und Zelldifferenzierung**

Mit Hilfe einer Cytofuge (Cytospin3) wurden die Zellen dann auf Objektträger aufgebracht. Es wurden mindestens zwei Objektträger pro Probe erstellt. Die Einfüllhilfen wurden mit 150 µl Suspension befüllt, überschüssige Flüssigkeit wurde durch einen Lochfilter aufgenommen. Zentrifugiert wurde 10 min mit 400 rpm bei mittlerer Geschwindigkeit („medium“). Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Anschließend wurden die Objektträger mit Diff-Quick (MedionDiagnostics) gefärbt:

Zunächst wurden die Objektträger für 2 min in Fixierlösung gestellt, dann direkt für 2 min 45 sec in Färbelösung I (Eosin) und gleich anschließend für 3 min in Färbelösung II (Thiazin).

Schließlich wurden die Objektträger mit kaltem Wasser mehrfach abgespült und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Am nächsten Tag wurden mit Entellan bzw. Pertex Eindeckmittel die Deckgläschen angebracht und nach Trockenzeit unter dem Mikroskop mit 20-40 facher Vergrößerung verblindet angeschaut. Makrophagen, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten wurden anhand allgemeiner morphologischer Kriterien (Zellgröße, Kern-/Zytoplasmafarbe, Kernmorphologie) differenziert.

### **2.2.10 ELISA**

#### **2.2.10.1 Zytokin-ELISA**

Die Zytokine IL-5, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in der BAL-Flüssigkeit wurden mit den jeweiligen ELISA-Sets von BD Biosciences gemessen. Es handelt sich hierbei um Sandwich-ELISA, wobei ein Antikörper, der das zu detektierende Antigen bindet, an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) adsorbiert wird. Anschließend wird ein mit einem Enzym gekoppelter sekundärer Antikörper zugegeben. Durch Hinzufügen eines colorimetrisch nachweisbaren Substrats kann die Antigenkonzentration anhand der Farbreaktion bestimmt werden.

Zunächst wurde beim Coating der Capture Antikörper über hydrophobe Wechselwirkungen an den Boden der Wells (= Vertiefungen der Mikrotiterplatte) angeheftet. Dazu wurde der Capture Antikörper 1:250 im jeweiligen Coating-Puffer verdünnt und 50 µl pro Well pipettiert.

Die Platten wurden mit einer Abdeckfolie abgedeckt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Platten 3-mal mit Wasch-Puffer gewaschen, sorgfältig ausgeklopft und anschließend mit 100 µl Assay Diluent pro Well für eine Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur geblockt. Damit wurden unspezifische Bindungen verhindert.

Nach weiterem Waschen und Ausklopfen wurden Standard, Proben und Blanks, je 50 µl pro Well, aufgetragen.

Von dem Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit sich halbierenden Konzentrationen, wie im Protokoll des Herstellers und in Tabelle 4 beschrieben, hergestellt.

Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt und in Doppelwerten gemessen.

Nach einer Inkubation von 2 Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur und fünfmaligem Waschen der Platten, wurde der Detection Antikörper und das Enzyme Reagent jeweils 1:250 in Assay Diluent verdünnt, von der Verdünnung wurden je 50 µl pro Well zugegeben und 1 Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Platten 8-mal gewaschen, dann das Substrat hinzugefügt. Dazu wurde pro Platte zu 5,45 ml Citrat-Puffer 2,55 µl kaltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 55 µl gelöstes TMB zugegeben. Davon wurde sofort 50 µl pro Well pipettiert und die Platte im Dunkeln ca. 7 - 12 min inkubiert bis sich eine Differenz in der Blaufärbung der Blanks und dem kleinsten Standard zeigte.

Abgestoppt wurde die Reaktion mit 25 µl einer 2M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well, wobei beim Pipettieren die gleiche Reihenfolge wie beim Pipettieren des Substrates eingehalten wurde. Die Platten wurden im ELISA-Reader bei 450 nm gelesen.

Das Protokoll des IL-13 ELISAs unterschied sich von den anderen Zytokin-ELISA zunächst hinsichtlich der Verdünnungen der Antikörper. Der Capture Antikörper wurde 1:500 auf 4 µg/ml, der Detection Antikörper 1:250 auf 0,1 µg/ml und die Streptavidin-HRP 1:2500 verdünnt. Etwaige Abweichungen des Lot-spezifischen Data Sheets wurden beachtet.

Des Weiteren wurde der Detection Antikörper sofort zu den Proben gegeben, 2 Stunden inkubiert und dann erst die HRP zugegeben.

Die Proben wurden 1:2 in Assay Diluent verdünnt.

Alle weiteren Arbeitsschritte stimmten mit dem obigen Zytokin-ELISA überein.

<b>ELISA</b>	<b>Standard-Konzentrationen</b>	<b>Anzahl der Standards</b>
IL-5	1000- 7,8 pg/ml	8
IL-10	2000-15,6 pg/ml	8
IFN $\gamma$	2000-15,6 pg/ml	8
TNF $\alpha$	1000- 7,8 pg/ml	8
IL-13	1000 - 3,9 pg/ml	9
OVA-spezifisches IgG1	250- 0,49 ng/ml	10
OVA-spezifisches IgE	1000-1,95 ng/ml	10
Total-IgE	250- 0,98 ng/ml	9

Tabelle 4: Standardkonzentrationen der verschiedenen ELISA

### 2.2.10.2 Ig-ELISA

Die Antikörper-Titer OVA-spezifisches IgG1, OVA-spezifisches IgE und Total-IgE wurden aus den Serumproben von d0, d28, d53, d60 bestimmt. Angewendet wurde die Methode des Indirekten ELISAs, wobei ein Antigen an die Mikrotiterplatte adsorbiert wird, das von dem zu detektierenden Antikörper gebunden wird. Über ein an einen sekundären Antikörper gebundenes chromogenes Substrat, kann die Konzentration des Antikörpers bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Total-IgE-Antikörper wurde, wie bei den Zytokin-ELISA, die Methode des Sandwich-ELISA angewandt.

#### 2.2.10.2.1 OVA-spezifisches IgG1 und OVA-spezifisches IgE

Das Coating erfolgte mit OVA Grade V in der Konzentration 0,1  $\mu\text{g}$  OVA pro Well (OVA-spezifisches IgG1) bzw. 1  $\mu\text{g}$  OVA pro Well (OVA-spezifisches IgE) in Coating-Puffer wobei 100  $\mu\text{l}$  der OVA-Lösung pro Well pipettiert wurden. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur, mit einer Abdeckfolie abgedeckt, wurden die Platten 3-mal gewaschen und sorgfältig ausgeklopft und anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  3% BSA pro Well für zwei Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur geblockt. Es folgten weitere drei Waschdurchgänge bevor je 50  $\mu\text{l}$  des Standard (siehe Tabelle 4), der Proben (Verdünnungen in Tabelle 5 beschrieben) und Blanks als Doppelwerte pipettiert wurden.

Nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden bei 4°C und anschließendem viermaligen Waschen wurde der sekundäre Antikörper 1:400 in BSA-Puffer verdünnt und davon 50  $\mu\text{l}$  pro Well aufgetragen. Die Platten wurden erneut zwei Stunden inkubiert und viermal gewaschen. Die Streptavidin-Peroxidase wurde 1:1000 in BSA-Puffer verdünnt, 50  $\mu\text{l}$  pro Well pipettiert und die Platten 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Platten 8-mal gewaschen, dann das Substrat zugegeben. Dazu wurde pro Platte zu 10,9 ml Citrat-Puffer 5,1  $\mu\text{l}$  kaltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 110  $\mu\text{l}$  gelöstes TMB zugegeben. Davon wurde sofort 100  $\mu\text{l}$  pro Well pipettiert und die Platte im Dunkeln ca.

5 min inkubiert bis sich eine Differenz in der Blaufärbung der Blanks und dem kleinsten Standard zeigte.

Abgestoppt wurde die Reaktion mit 50 µl einer 2M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well, wobei beim Pipettieren der Stopplösung die gleiche Reihenfolge wie beim Pipettieren des Substrates eingehalten wurde. Die Platten wurden im ELISA-Reader bei 450 nm gelesen.

#### *2.2.10.2.2 Total-IgE*

Der Coating-Antikörper wurde in Coating-Puffer auf 10 µg/ml verdünnt, 50 µl pro Well pipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert. Die Platten wurden dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen, ausgeklopft, zwei Stunden bei Raumtemperatur abgedeckt mit 100 µl pro Well Blocking-Puffer (3% BSA) geblockt und hinterher wiederum dreimal gewaschen.

Je 50 µl pro Well des Standards (siehe Tabelle 4), der Proben (Verdünnungen in Tabelle 5 beschrieben) und der Blanks wurden als Doppelwerte aufgetragen, die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurde der sekundäre Antikörper 1:400 in BSA-Puffer verdünnt und davon 50 µl pro Well aufgetragen. Die Platten wurden erneut zwei Stunden inkubiert und dreimal gewaschen.

Die Streptavidin-Peroxidase wurde 1:1000 in BSA-Puffer verdünnt, 50 µl pro Well pipettiert und die Platten 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Platten 8-mal gewaschen, dann das Substrat zugegeben. Dazu wurde pro Platte zu 5,45 ml Citrat-Puffer 2,55 µl kaltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 55 µl gelöstes TMB zugegeben. Davon wurde sofort 50 µl pro Well pipettiert und die Platte im Dunkeln ca. 10 min inkubiert bis sich eine Differenz in der Blaufärbung der Blanks und dem kleinsten Standard zeigte.

Abgestoppt wurde die Reaktion mit 50 µl einer 2M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well, wobei beim Pipettieren der Stopplösung die gleiche Reihenfolge wie beim Pipettieren des Substrates eingehalten wurde. Die abgestoppten Platten wurden im ELISA-Reader bei 450 nm gelesen.

Tag	Verdünnungen (in 3% BSA)		
<b>ELISA OVA-spezifisches IgG1</b>			
d0	1:100	1:200	1:10 <sup>3</sup>
d28	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>
d53, d60	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>
d53, d60 (bei Bedarf)	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>
<b>ELISA OVA-spezifisches IgE</b>			
d0, d28, d53, d60	1:10		
<b>ELISA Total-IgE</b>			
d0	1:10		
d28, d53, d60	1:40	1:100	

Tabelle 5: Verdünnungen der Proben der Ig-ELISA

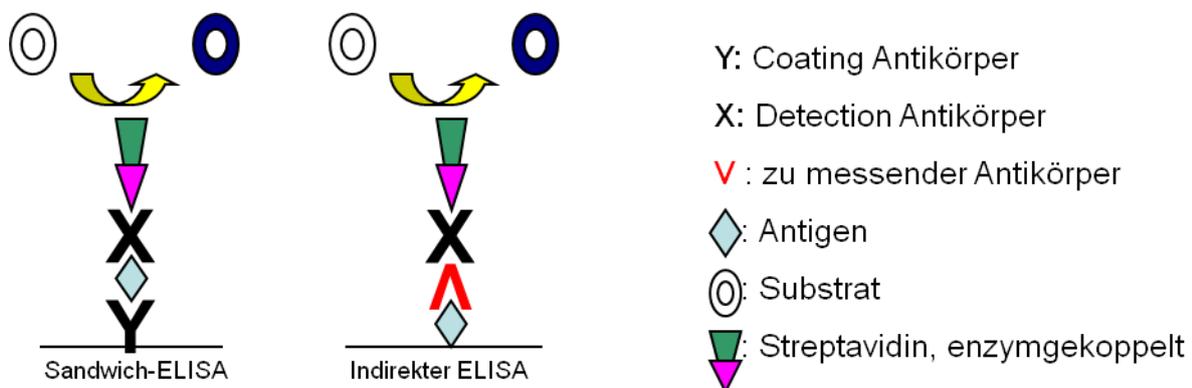


Abbildung 8: Mechanismen des Sandwich- und Indirekten ELISA

### 2.2.10.3 Auswertung

Die ELISA wurden mit Hilfe des Programms Ascent Software Version 2.6 ausgewertet.

### 2.2.11 Histologie

Nach der BAL wurden die Lungen der Hälfte der Tiere entnommen und in 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, um die Proteolyse des Gewebes zu verhindern. Anschließend wurden die Lungen mit dem Skalpell in 5 Teile geschnitten, diese in Histosetten gegeben und über Nacht automatisch im Entwässerungsautomaten entwässert. Die Entwässerung wurde vom Institut für Pathologie des Helmholtzzentrums München durchgeführt. Sie erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe, in der Folge wurden die Lungen in Xylol und anschließend in Paraffin gegeben. Im Einbettautomaten wurden die Gewebestücke mit der Schnittfläche nach außen in Paraffin gebettet und nach Abkühlung am Mikrotom in 4 µm dünne Schnitte geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte aus dem Wasserbad auf Objektträger

aufgezogen. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Objektträger zunächst bei 67°C für 28 min inkubiert, um das Paraffin aufweichen zu lassen. Anschließend wurden sie für ca. 20 min in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol 4x, 100% Ethanol 2x, 96% Ethanol 2x und 70% Ethanol 1x, anschließend Aqua dest., je 2 min) entparaffiniert.

Für die HE-Färbung wurden die Objektträger dreimal in Hämalaun getaucht, folgend zweimal in Aqua dest., einmal in Eosin Y, dann je dreimal in 100% Ethanol und Xylol. Anschließend wurden die Objektträger mit Eindeckmittel und Deckgläsern eingedeckt.

Die Proben wurden unter dem Mikroskop ausgewertet, bei der HE-Färbung stellen sich die Kerne blau und das Zytoplasma rot dar.

Für die PAS-Reaktion wurden die Objektträger zunächst für 5 min in Perjodsäure gegeben, in Aqua dest. getaucht, für 15 min mit Schiff'schem Reagenz inkubiert, anschließend für 10 min unter laufendem warmen Wasser abgespült. Darauf erfolgte eine fünfminütige Färbung in Hämalaun, anschließend eine ebenfalls fünfminütige Spülung unter laufendem kaltem Wasser. Die Färbung wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 96% Ethanol) entwässert und in Xylol fixiert.

Die Präparate wurden unter dem Mikroskop ausgewertet, bei der PAS-Färbung stellen sich die Kerne blau, das Zytoplasma leicht rosa und Mukus pink dar.

### **2.2.12 LAL-Test**

Zum Ausschluss einer Kontamination des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers mit Endotoxinen wurde ein LAL-Test durchgeführt. Dieser wurde vom ZAUM, Zentrum für Allergie und Umwelt, übernommen und erfolgte gemäß dem Protokoll von Lonza für den Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000. Hierbei wurde zunächst das E.coli-Endotoxin mit 1 ml LAL-Wasser gelöst. Bei einer erreichten Konzentration von 25 EU/ml wurde mit LAL-Wasser 1:25 verdünnt. Zum Erreichen der 4 Standardkonzentrationen wurde jeweils mit 1:2 weiterverdünnt. Das Chromogenic Substrat wurde in 6,5 ml LAL-Wasser gelöst und im Inkubator auf 37°C vorgewärmt. Das LAL-Substrat wurde erst kurz vor Gebrauch in 1,4 ml LAL-Wasser gelöst und ebenfalls auf 37°C vorgewärmt. Je 50  $\mu$ l der Proben und Standards wurden auf die sterile Platte pipettiert, diese wurde anschließend 1 min bei 37°C auf der Heizplatte inkubiert. In der Folge wurden 50  $\mu$ l LAL in die Wells der ersten Reihe der Platte gegeben, im Abstand von jeweils genau 15 sec in die folgenden Reihen. Nach 16 min wurden 100  $\mu$ l des Substrats in jedes Well pipettiert, auch jeweils im Abstand von 15 sec pro Reihe. Die Platte wurde hierbei konstant bei 37°C auf der Heizplatte inkubiert. Nach 6 min wurden jeweils 100  $\mu$ l des Stoppreagenz (10% SDS) im Abstand von 15 sec dazugegeben. Die Messung erfolgte bei 405 nm.

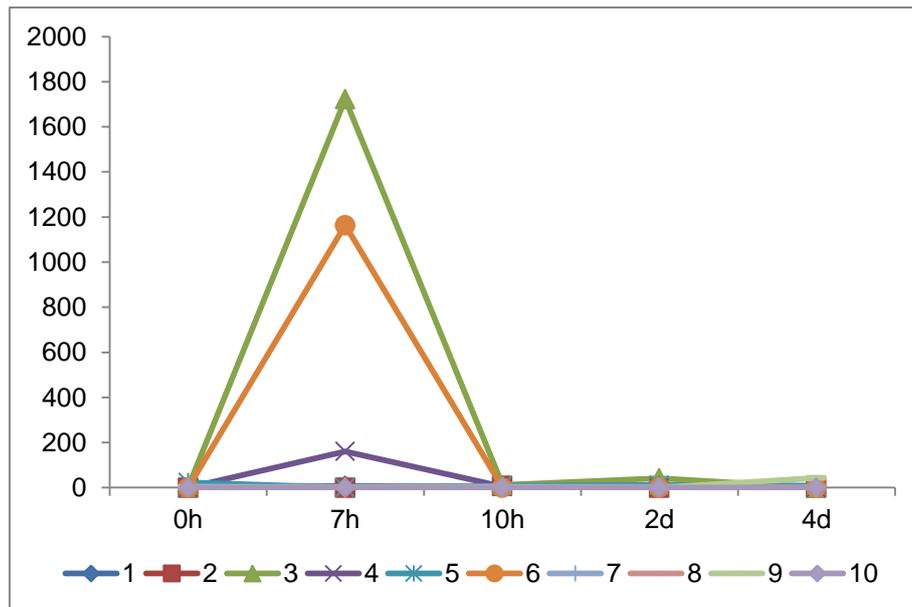
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuch

Um den Einfluss von TNF $\alpha$  auf die allergenspezifische Immuntherapie zu untersuchen, wurde im Tierversuch zur allergenspezifischen Immuntherapie TNF $\alpha$  mit Hilfe eines Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers geblockt. Um die Menge des Antikörpers zu bestimmen, der nötig ist, um TNF $\alpha$  ausreichend zu blocken, wurde zunächst ein Vorversuch mit insgesamt 10 Mäusen durchgeführt. Den Mäusen wurden verschiedene Dosen eines Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers (50  $\mu$ g [Maus 5 und 6], 100  $\mu$ g [Maus 7 und 8], 250  $\mu$ g [Maus 9 und 10]) bzw. Placebo (PBS) [Maus 1 bis 4] intraperitoneal verabreicht. Sechs Stunden später wurden 10  $\mu$ g LPS pro Maus intraperitoneal verabreicht (außer Maus 1 und 2), um die Bildung von TNF $\alpha$  zu induzieren. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuches, nach sieben und zehn Stunden, sowie zwei und vier Tage später. Aus den Serumproben erfolgte die Bestimmung der TNF $\alpha$ -Spiegel mit Hilfe des TNF $\alpha$ -ELISAs. Bei Verwendung von 50  $\mu$ g des monoklonalen Antikörpers konnte noch ein deutlicher Anstieg des TNF $\alpha$  nach Injektion von LPS festgestellt werden, wohingegen bei Gabe von 100  $\mu$ g jenes Antikörpers keine Erhöhung des TNF $\alpha$ -Spiegels nachweisbar war. So wurde für den ersten Versuch 100  $\mu$ g Antikörper pro Maus verwendet, um TNF $\alpha$  zu blocken.

<b>Anzahl der Mäuse</b>	<b>Injektion Versuchsbeginn</b>	<b>Injektion nach 6 Stunden</b>
<b>2 Mäuse (Nr. 1,2)</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>
<b>2 Mäuse (Nr. 3,4)</b>	<b>Placebo</b>	<b>10 <math>\mu</math>g LPS</b>
<b>2 Mäuse (Nr. 5,6)</b>	<b>50 <math>\mu</math>g Anti-TNF<math>\alpha</math>- Antikörper</b>	<b>10 <math>\mu</math>g LPS</b>
<b>2 Mäuse (Nr.7,8)</b>	<b>100 <math>\mu</math>g Anti-TNF<math>\alpha</math>- Antikörper</b>	<b>10 <math>\mu</math>g LPS</b>
<b>2 Mäuse (Nr. 9,10)</b>	<b>250 <math>\mu</math>g Anti-TNF<math>\alpha</math>- Antikörper</b>	<b>10 <math>\mu</math>g LPS</b>

Tabelle 6: Übersicht über den Versuchsablauf, Vorversuch



**Abbildung 9: Mittelwerte TNF $\alpha$  im Serum, in pg/ml, Vorversuch nach Gabe von verschiedenen Dosen des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers und anschließender Gabe von LPS**  
**Maus 1 und 2: Placebo**  
**Maus 3 und 4: Placebo und LPS**  
**Maus 5 und 6: 50  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und LPS**  
**Maus 7 und 8: 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und LPS**  
**Maus 9 und 10: 250  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und LPS**

### 3.2 Versuch 1 (V1)

Das Versuchsprotokoll wurde von Joost L. M. Vissers et al. übernommen und dabei leicht abgewandelt (Vissers et al. 2004).

Die Mäuse wurden mittels viermaliger intraperitonealer Injektion mit jeweils 10  $\mu$ g OVA (Ovalbumin Klasse V) adsorbiert an Aluminiumhydroxid (Imject Alum) in PBS an d0, d7, d14 und d28 sensibilisiert.

Zwei Wochen nach der letzten Sensibilisierung wurden die Mäuse in vier Gruppen à zehn Mäuse geteilt: die erste Gruppe [S/AK100/A] erhielt Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und wurde immuntherapiert, die zweite Gruppe [S/AK100] erhielt Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, wurde aber nicht immuntherapiert. Die dritte Gruppe [S/A] wurde immuntherapiert, erhielt aber keinen Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, die vierte Gruppe [S] erhielt weder Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper noch allergenspezifische Immuntherapie. Die Versuchsanordnung der Versuche V2 und V3 wurde leicht verändert, die genaue Übersicht findet sich in Tabelle 7 (V1) und Tabelle 8 (V2 und V3).

Die allergenspezifische Immuntherapie fand dreimal in zweitägigem Abstand an Tag d42, d44 und d46 statt. 1 mg OVA (Ovalbumin Klasse V) in 0,2 ml PBS wurde subkutan in die Nackenfalte injiziert.

Von dem Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper wurde einmal vier Stunden vor der ersten allergenspezifischen Immuntherapie und einmal vier Stunden vor der ersten Challenge 100  $\mu$ g (bzw. 200  $\mu$ g in bestimmten Tiergruppen bei V2 und V3) im Volumen von jeweils 0,2 ml (Verdünnung mit PBS) intraperitoneal gespritzt.

Die Challenge für die Tiere aller vier Gruppen wurde an d53, d56 und d59 durchgeführt, wobei 1% OVA in PBS vernebelt wurde und die Mäuse für 20 min exponiert wurden.

Die Kontrollgruppe [Kontrolle] von 5 Mäusen wurde mit Placebo (PBS) behandelt.

An d60 wurde bei allen Mäusen die bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt.

Je eine Maus aus den Gruppen [S/AK100/A] und [S/AK100] starben während des Versuches, sodass diese in der Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten.

Analysiert wurden die Zellen aus dem BAL-Fluid. Es wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und es erfolgte die Differenzierung von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, und Lymphozyten unter dem Lichtmikroskop. Des Weiteren wurden die Zytokine im BAL-Fluid mit Hilfe von ELISA bestimmt, so IL-5, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Im Serum wurden mittels ELISA die Immunglobuline OVA-spezifisches IgG1, OVA-spezifisches IgE und Gesamt-IgE gemessen.

<b>Anzahl der Mäuse</b>	<b>d 0-28</b>	<b>d 42 und 53</b>	<b>d 42-46</b>	<b>d 53 -59</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Antikörper (100 <math>\mu</math>g) (Ak)</b>	<b>ASIT (A)</b>	<b>Challenge</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Antikörper (100 <math>\mu</math>g) (Ak)</b>	<b>Placebo</b>	<b>Challenge</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Placebo</b>	<b>ASIT (A)</b>	<b>Challenge</b>
<b>10 Mäuse</b>	<b>Sensibilisierung (S)</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>	<b>Challenge</b>
<b>5 Mäuse</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>	<b>Placebo</b>

**Tabelle 7: Übersicht über den Versuchsablauf, Versuch 1**  
**Auflistung der verschiedenen Gruppen der Mäuse und der Behandlung im Zeitverlauf**  
siehe auch Tabelle 2

### 3.2.1 Gesamtzellzahl und Zelldifferenzierung aus der BAL- Flüssigkeit

Die Zellen aus der BAL-Flüssigkeit wurden mit Hilfe einer Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop analysiert.

#### 3.2.1.1 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl aus der BAL der sensibilisierten Mäuse unterschied sich erwartungsgemäß signifikant von der der Mäuse, die zusätzlich immuntherapiert wurden ( $p=0.00067$ ). Die mittlere Zellzahl bei den sensibilisierten Mäusen lag um ca. fünf Millionen (Mittelwert Gruppe [S] 4761000 Zellen, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 5199722 Zellen). Durch die allergenspezifische Immuntherapie konnte die Gesamtzellzahl in beiden Gruppen deutlich gesenkt werden, unter Anwesenheit von TNF $\alpha$  (Mittelwert Gruppe [S/A] 210167 Zellen) deutlich stärker als unter Abwesenheit von TNF $\alpha$  (Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 593074 Zellen).

In der Kontrollgruppe wurde ein Mittelwert von 69000 Zellen gezählt.

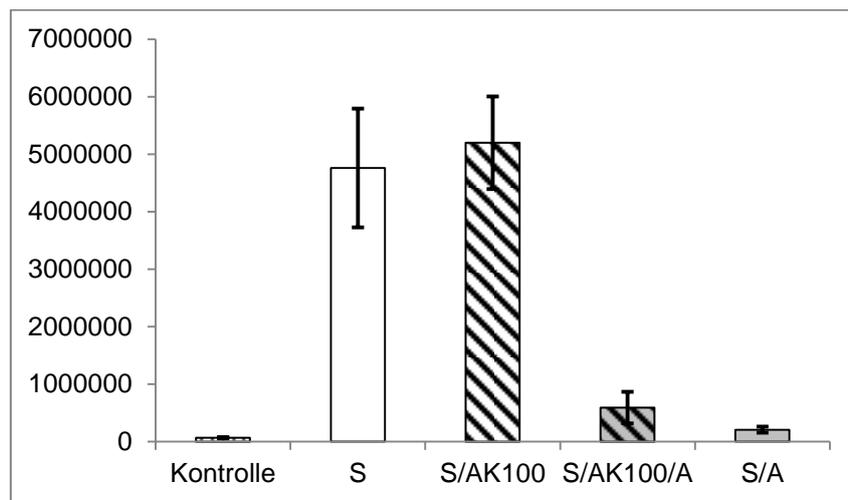


Abbildung 10: Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.1.2 Makrophagen

Der mittlere prozentuale Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl war in den nur sensibilisierten Tiergruppen deutlich geringer (Mittelwert Gruppe [S] 9,76%, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 8,57%) als in den zusätzlich immuntherapierten Tiergruppen. In Anwesenheit von TNF $\alpha$  lag der prozentuale Anteil der Makrophagen höher (Mittelwert Gruppe [S/A] 58,7%) als in Abwesenheit von TNF $\alpha$  (Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 37,1%).

In der Kontrollgruppe lag der prozentuale Anteil der Makrophagen bei 93,1%.

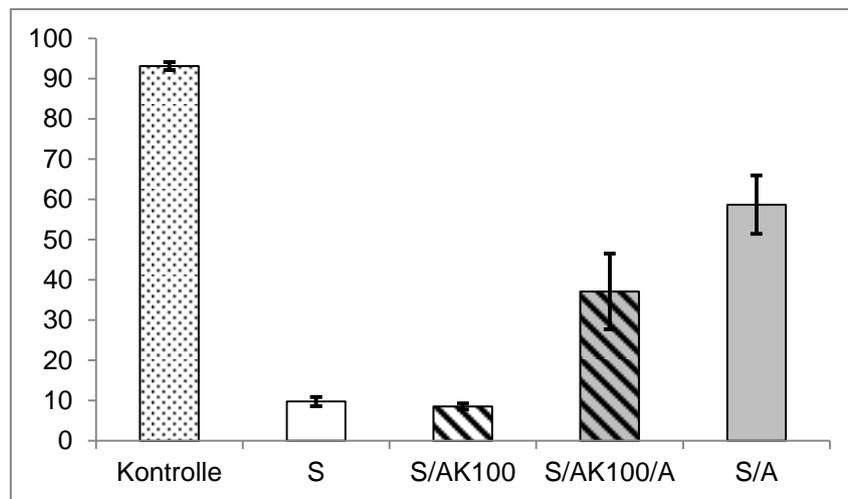


Abbildung 11: prozentualer Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.1.3 Eosinophile Granulozyten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert Kontrollgruppe 1,23%) stieg der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten in den rein sensibilisierten Gruppen auf über 70% (Mittelwert Gruppe [S] 77,7%, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 82,6%). Durch die allergenspezifische Immuntherapie konnte der Anteil der eosinophilen Granulozyten wieder klar gesenkt werden, jedoch in der TNF $\alpha$ -geblockten Gruppe weniger stark (Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 46,4%) versus Mittelwert Gruppe [S/A] 27,3%).

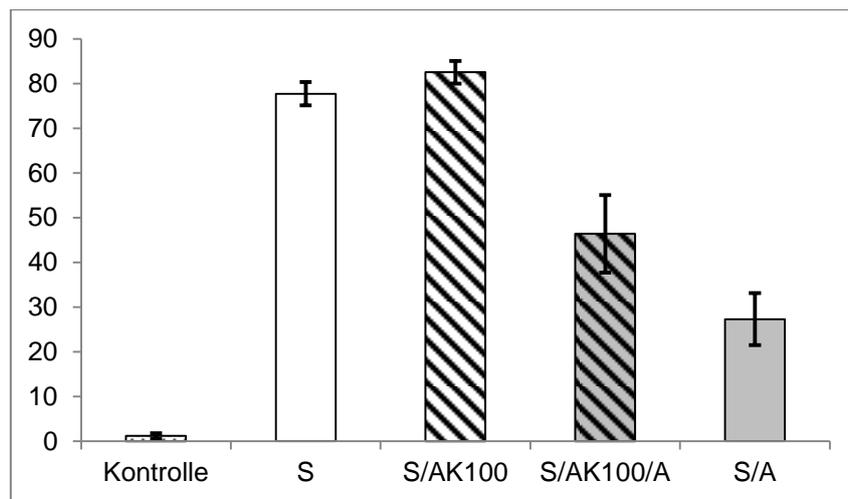


Abbildung 12: prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.1.4 Neutrophile Granulozyten

In der Kontrollgruppe lag der mittlere prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten bei 0,78%. In der nur sensibilisierten Gruppe [S] wurden 8,33% neutrophile Granulozyten gezählt, in der Gruppe [S/AK100] 5,05%, in der immuntherapierten Gruppe unter TNF $\alpha$ -Blockade (Gruppe [S/AK100/A]) 8,54% und in der immuntherapierten Gruppe ohne TNF $\alpha$ -Blockade (Gruppe [S/A]) 5,85%.

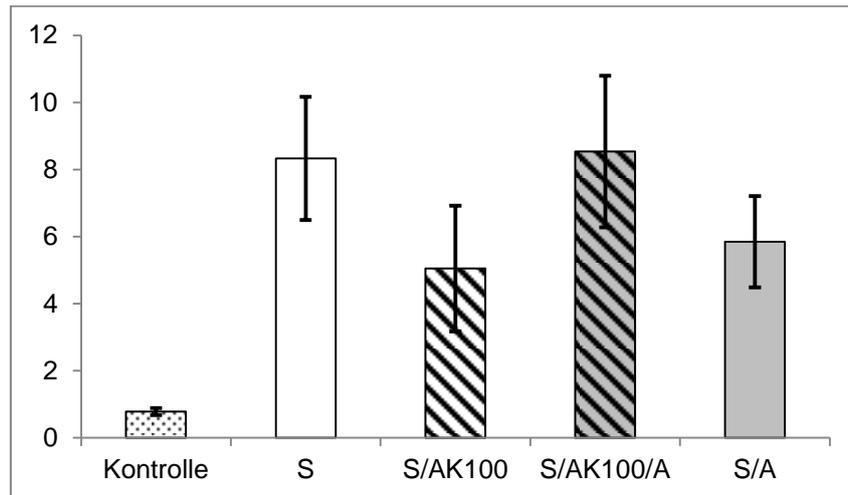


Abbildung 13: prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.1.5 Lymphozyten

Der prozentuale Anteil der Lymphozyten unterschied sich in den nur sensibilisierten Gruppen nicht klar von der Kontrollgruppe (Mittelwert Kontrollgruppe 4,86%, Mittelwert Gruppe [S] 4,18%, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 3,83%). Durch die allergenspezifische Immuntherapie konnte ein leichter prozentualer Anstieg vermerkt werden, wobei sich die Gruppen mit und ohne Antikörper-Injektion geringfügig unterschieden (Mittelwert [S/AK100/A] 7,94%, Mittelwert [S/A] 8,16%).

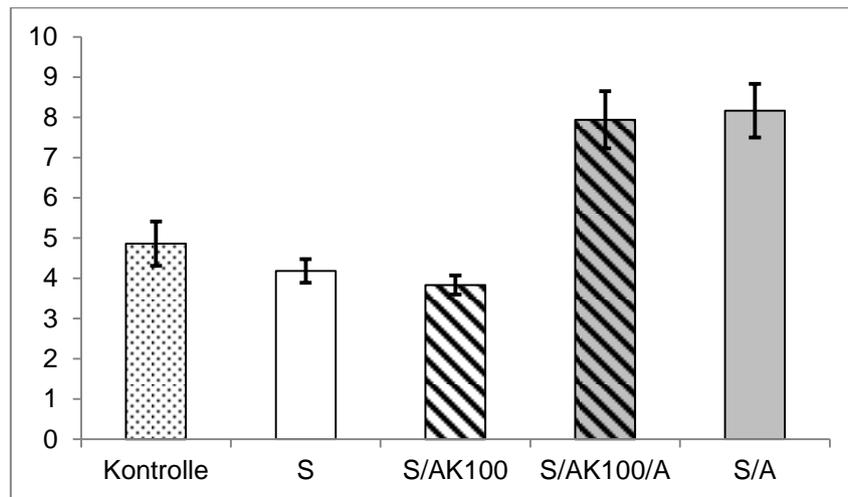


Abbildung 14: prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1

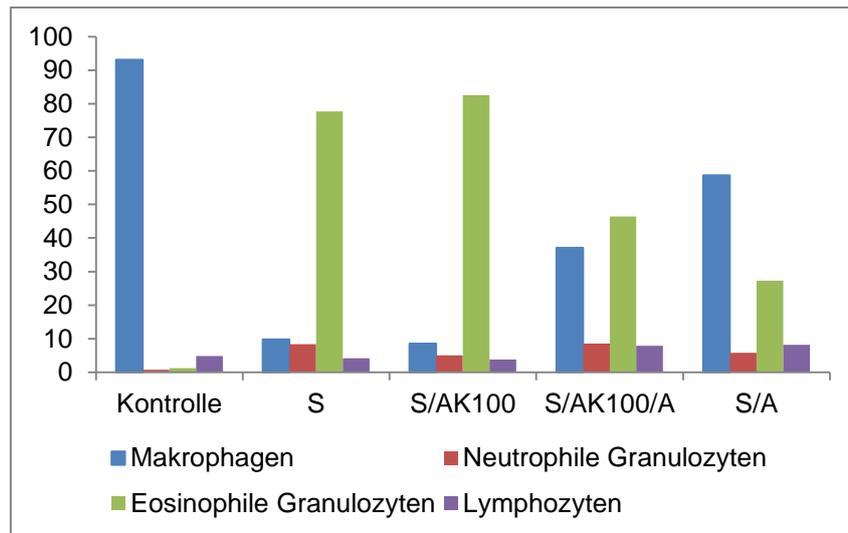
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

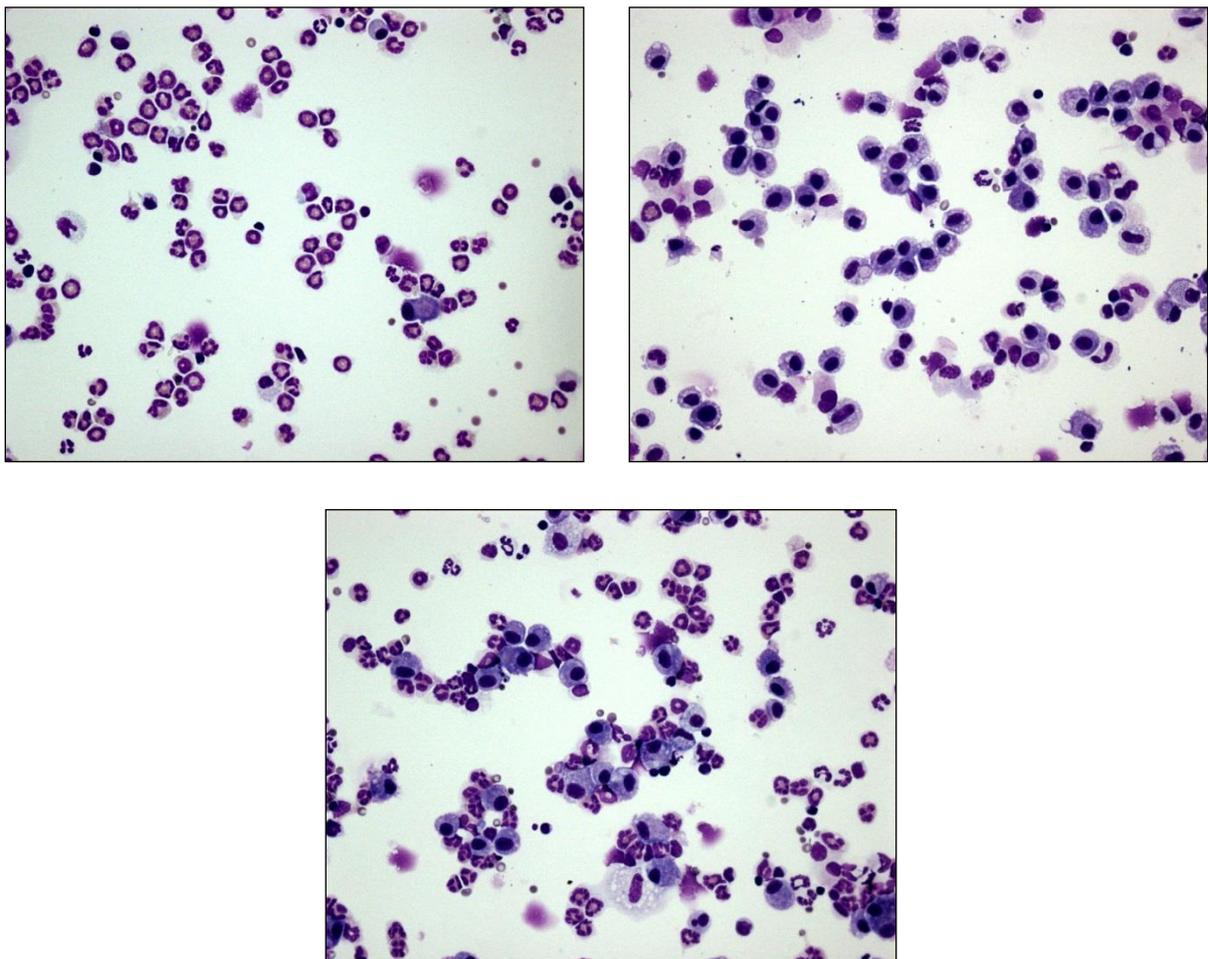
Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT



**Abbildung 15: Übersicht über den prozentualen Anteil der verschiedenen Zellarten im BAL-Fluid in den verschiedenen Gruppen, V1**  
**Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten**



**Abbildung 16: Zellen im BAL-Fluid; Eosin/Thiazin-Färbung, V1**  
**oben links: nach Sensibilisierung: hauptsächlich eosinophile Granulozyten,**  
**oben rechts: nach ASIT: überwiegend Makrophagen,**  
**unten: nach ASIT unter TNF $\alpha$ -Blockade: sowohl Makrophagen als auch eosinophile Granulozyten**

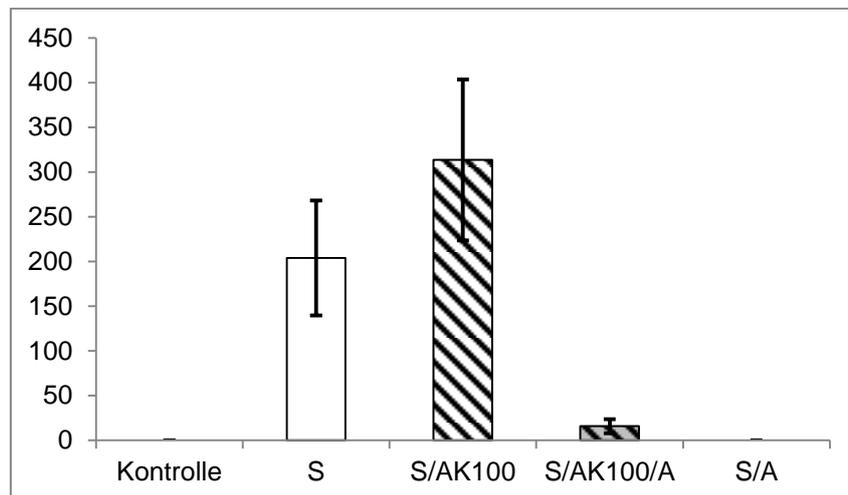
### 3.2.2 Zytokine aus der BAL-Flüssigkeit

Die Zytokine aus der BAL-Flüssigkeit wurden aus den Überständen nach Zentrifugation mit Hilfe von ELISA detektiert.

#### 3.2.2.1 IL-13

In der Kontrollgruppe war in der BAL-F IL-13 im ELISA nicht nachweisbar.

In den Gruppen ohne ASIT stieg IL-13 stark an (Mittelwert Gruppe [S] 204 pg/ml, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 314 pg/ml). Die Gruppen mit ASIT wiesen wiederum nur sehr geringe Werte von IL-13 auf, so lag der Mittelwert der TNF $\alpha$ -geblockten Gruppe bei 16 pg/ml, bei der Gruppe ohne Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper ließ sich der Wert sogar unter die Nachweisgrenze des ELISA senken.



**Abbildung 17: Konzentration von IL-13 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.2.2 $IFN\gamma$

Die Werte von  $IFN\gamma$  waren niedrig in den nur sensibilisierten Gruppen (Gruppe [S] nicht nachweisbar, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 5 pg/ml), durch die ASIT stiegen die Werte an: in Abwesenheit von  $TNF\alpha$  (Gruppe [S/AK100/A]) auf einen Mittelwert von 12 pg/ml, in Anwesenheit von  $TNF\alpha$  (Gruppe [S/A]) noch weiter auf einen Mittelwert von 15 pg/ml.

Der Mittelwert in der Kontrollgruppe lag bei 9 pg/ml.

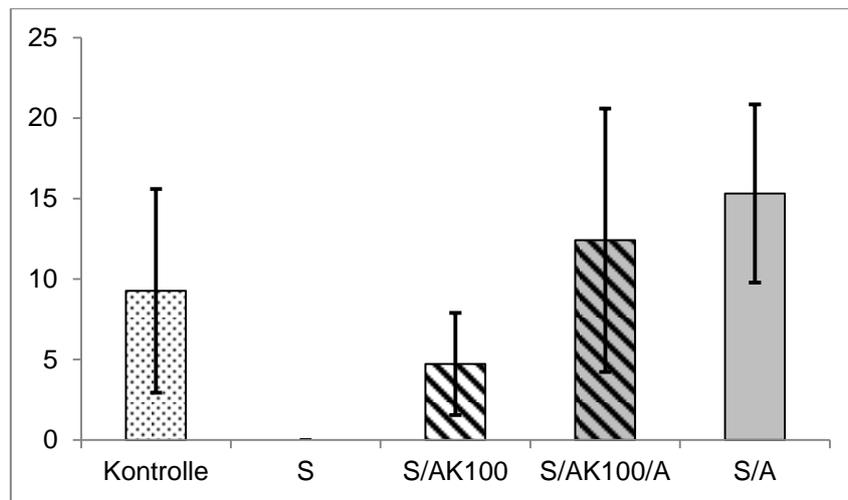


Abbildung 18: Konzentration von  $IFN\gamma$  im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti- $TNF\alpha$ -Antikörper, Placebo

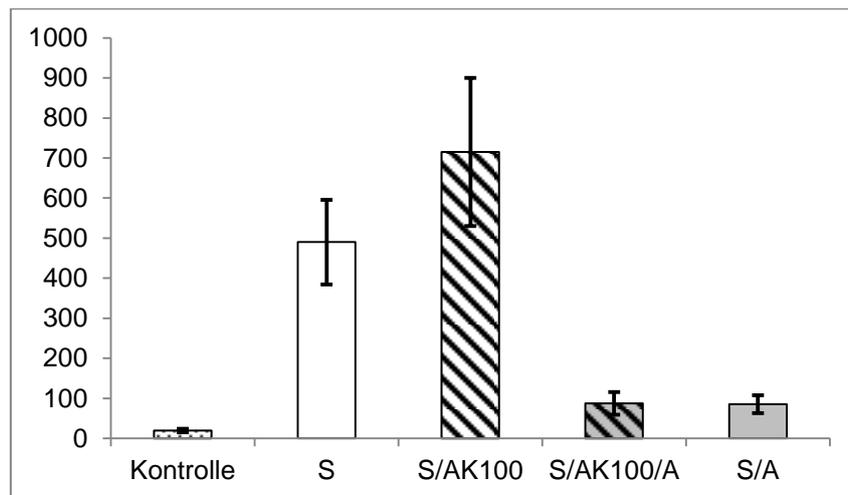
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti- $TNF\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.2.3 IL-5

Der Nachweis von IL-5 war besonders hoch in den nur sensibilisierten Gruppen (Mittelwert Gruppe [S] 490 pg/ml; Gruppe [S/AK100] 715 pg/ml). Die Werte fielen durch die ASIT in Anwesenheit von TNF $\alpha$  auf durchschnittlich 85 pg/ml in Gruppe [S/A], in der Abwesenheit von TNF $\alpha$  auf durchschnittlich 88 pg/ml in Gruppe [S/AK100/A].

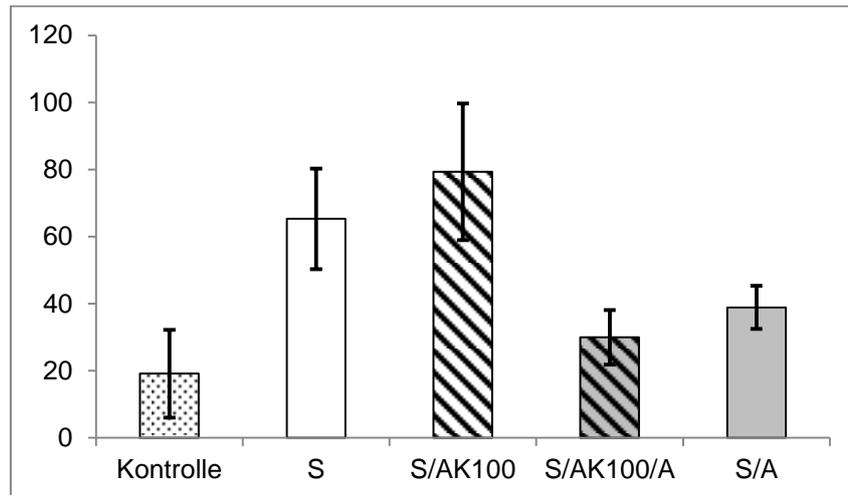
In der Kontrollgruppe lag der durchschnittliche IL-5-Wert bei 20 pg/ml.



**Abbildung 19: Konzentration von IL-5 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.2.4 IL-10

Der Mittelwert von IL-10 stieg durch die Sensibilisierung von 19 pg/ml in der Kontrollgruppe auf 65 pg/ml in Gruppe [S] und auf 79 pg/ml in Gruppe [S/AK100]. In den immuntherapierten Gruppen war der Mittelwert deutlich geringer mit 39 pg/ml in der Gruppe [S/A] unter Anwesenheit von TNF $\alpha$  und noch niedriger unter Abwesenheit von TNF $\alpha$  in der Gruppe [S/AK100/A] mit 30 pg/ml.



**Abbildung 20: Konzentration von IL-10 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.2.5 IL-5/IL-10

Das Verhältnis von IL-5/IL-10 verschiebt sich durch die ASIT in Richtung IL-10. Unter TNF $\alpha$ -Blockade verschiebt sich das Verhältnis jedoch nicht so stark. Nach Sensibilisierung lag das Verhältnis bei 7,54; unter ASIT sank das Verhältnis auf 2,18 und unter ASIT und Anti-TNF $\alpha$ -Antikörperbehandlung lag das Verhältnis von IL-5/IL-10 bei 2,93.

### 3.2.3 Immunglobulinbestimmung aus dem Serum

Den Mäusen wurde im Laufe des Versuches mehrmals Blut entnommen. Im Serum der Versuchstage d0, d28, d53 und d60 wurden mit Hilfe von ELISA OVA-spezifische IgG1-Antikörper, OVA-spezifische IgE-Antikörper und Gesamt-IgE-Antikörper gemessen und im zeitlichen Verlauf bewertet.

### **3.2.3.1 OVA-spezifische IgG1- Antikörper**

Am Tag d0 waren die gemessenen Mittelwerte der OVA-spezifischen IgG1-Antikörper nahe null (Gruppe [S] 7 ng/ml, Gruppe [S/A] 21 ng/ml) beziehungsweise nicht detektierbar (in der Kontrollgruppe sowie den Gruppen [S/AK100] und [S/AK100/A]).

Am Tag d28 kam es zu einem Anstieg der Werte in allen sensibilisierten Gruppen: Mittelwert Gruppe [S] 83200 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/AK100] 77343 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/A] 77360 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 79500 ng/ml, während der Mittelwert der Kontrollgruppe nur bei 2480 ng/ml lag.

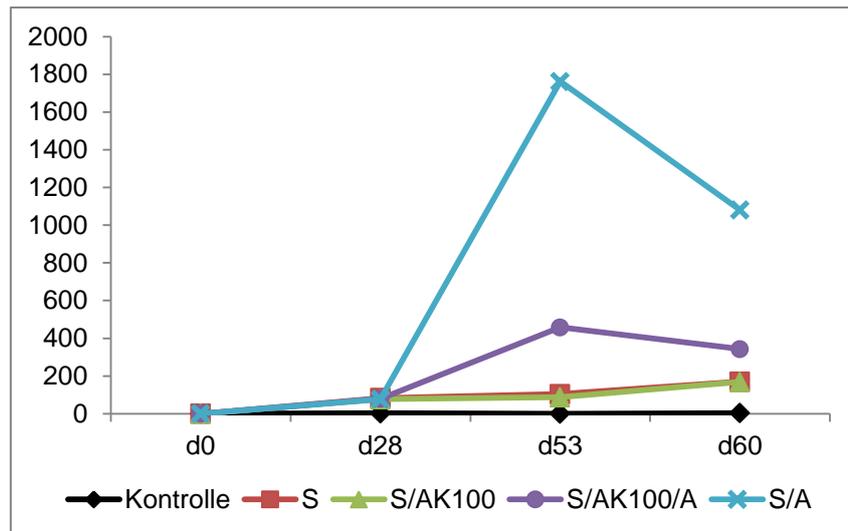
Am Tag d53, nach Abschluss der ASIT, kam es zu einem signifikanten Anstieg der OVA-spezifischen IgG1-Antikörper in der Gruppe [S/A], also bei ASIT in Anwesenheit von TNF $\alpha$  im Vergleich zu der TNF $\alpha$ -geblockten Gruppe [S/AK100/A] (Mittelwert Gruppe [S/A] 1742000 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 458000 ng/ml,  $p= 0,0013$ ).

In den Gruppen ohne ASIT gab es nur einen geringen Anstieg der Antikörper bis Tag d53 (Mittelwert Gruppe [S] 103900 ng/ml, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 87022 ng/ml).

In der Kontrollgruppe waren keine OVA-spezifischen IgG1- Antikörper nachweisbar.

Nach der *Challenge* am Tag d60 kam es zu einem deutlichen Sinken der OVA-spezifischen IgG1-Antikörper in den Gruppen mit ASIT, wobei die Werte der Gruppe [S/A] weiterhin klar über denen der mit Antikörper behandelten Gruppe [S/AK100/A] lagen (Mittelwert Gruppe [S/A] 1080200 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 343222 ng/ml). Die Werte der nicht immuntherapierten Gruppen [S] und [S/AK100] blieben im Vergleich zu den Vormessungen relativ ähnlich (Mittelwert Gruppe [S] 170010 ng/ml, Mittelwert Gruppe [S/AK100] 168389 ng/ml).

In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei 3400 ng/ml.



**Abbildung 21: Konzentration OVA-spezifischer IgG1-Antikörper im Serum in µg/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V1**

**Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo**

**Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo**

**Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, Placebo**

**Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT**

### 3.2.3.2 Gesamt-IgE- Antikörper

Am Tag d0 lagen die Mittelwerte der Gesamt-IgE-Antikörper zwischen 20 und 80 ng/ml als Ausgangswert (Mittelwert Gruppe [S] 49 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/AK100] 27 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/A] 75 ng/ml; Mittelwert Gruppe [S/AK100/A] 30 ng/ml; Mittelwert Kontrollgruppe 37 ng/ml).

Am Tag d28 konnten durch die Sensibilisierung in allen Gruppen ein Anstieg der Antikörper beobachtet werden. So lag der Mittelwert der Gruppe [S] bei 1105 ng/ml; der Mittelwert der Gruppe [S/AK100] bei 831 ng/ml; der Mittelwert der Gruppe [S/A] bei 953 ng/ml; der Mittelwert der Gruppe [S/AK100/A] bei 664 ng/ml.

Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei 374 ng/ml.

Am Tag d53, nach der allergenspezifischen Immuntherapie, war ein starker Anstieg in den Werten der Gruppe [S/A], also der Gruppe mit ASIT auf 5503 ng/ml zu verzeichnen, ein mäßigerer Anstieg vor allem in der Gruppe [S/AK100/A] (ASIT in Abwesenheit von TNFα) auf 2874 ng/ml, sowie den Gruppen [S] (Mittelwert 2316 ng/ml) und [S/AK100] (Mittelwert 1991 ng/ml).

Die Kontrollgruppe zeigte einen Mittelwert von 563 ng/ml.

Am Tag d60 und somit nach Ende der Challenge gab es einen starken Anstieg der Werte in den nicht immuntherapierten Gruppen [S] (Mittelwert 5236 ng/ml) und [S/AK100] (Mittelwert

6632 ng/ml), während ein Sinken der Werte in den immuntherapierten Gruppen [S/A] (Mittelwert 2680 ng/ml) und [S/AK100/A] (Mittelwert 1933 ng/ml) zu verzeichnen war.

Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei 675 ng/ml.

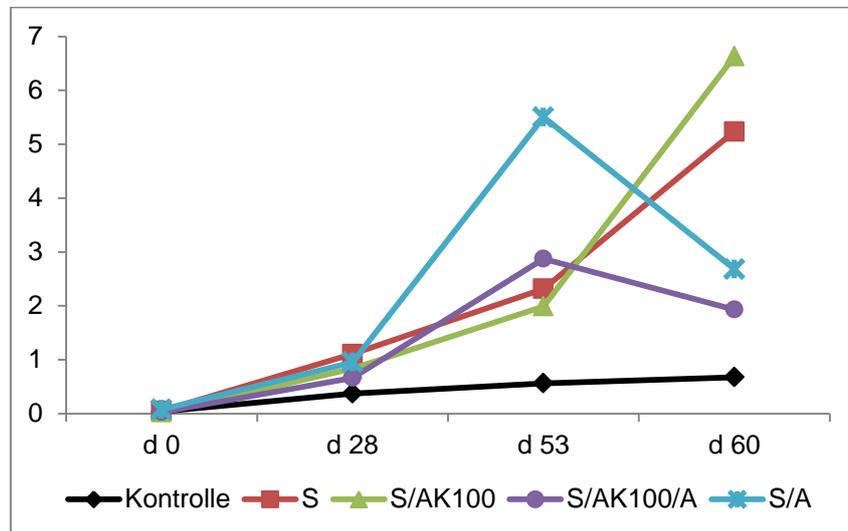


Abbildung 22: Konzentration der Gesamt-IgE-Antikörper im Serum in µg/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.3.3 OVA-spezifische IgE- Antikörper

Zu Beginn des Versuches (d0) (Mittelwert Gruppe [S] 5 ng/ml, Gruppe [S/A] 5 ng/ml, Gruppe [S/AK100/A] 16 ng/ml, Gruppe [S/AK100] 28 ng/ml und Kontrollgruppe 22 ng/ml), sowie nach der Sensibilisierungsphase (d28) (Mittelwert Gruppe [S] 9 ng/ml, Gruppe [S/A] 14 ng/ml, Gruppe [S/AK100/A] 14 ng/ml, Gruppe [S/AK100] 24 ng/ml und Kontrollgruppe 9 ng/ml) waren in allen Gruppen nur sehr geringe Spiegel der OVA-spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar.

Nach der ASIT, am Tag d53, stiegen die Werte leicht an: Mittelwert Gruppe [S] 64 ng/ml, Gruppe [S/A] 51 ng/ml, Gruppe [S/AK100/A] 39 ng/ml, Gruppe [S/AK100] 145 ng/ml. In der Kontrollgruppe waren die OVA-spezifischen IgE-Antikörper nicht nachweisbar.

Am Tag d60, nach der Challenge, war ein starker Anstieg der Mittelwerte in den nicht immuntherapierten Gruppen [S/AK100] auf 742 ng/ml und [S] auf 607 ng/ml zu verzeichnen. Die Werte in den immuntherapierten Gruppen [S/A] (137 ng/ml) und [S/AK100/A] (67 ng/ml) stiegen im Gegensatz dazu nur geringfügig an.

In der Kontrollgruppe lag der Wert unterhalb der Nachweisgrenze.

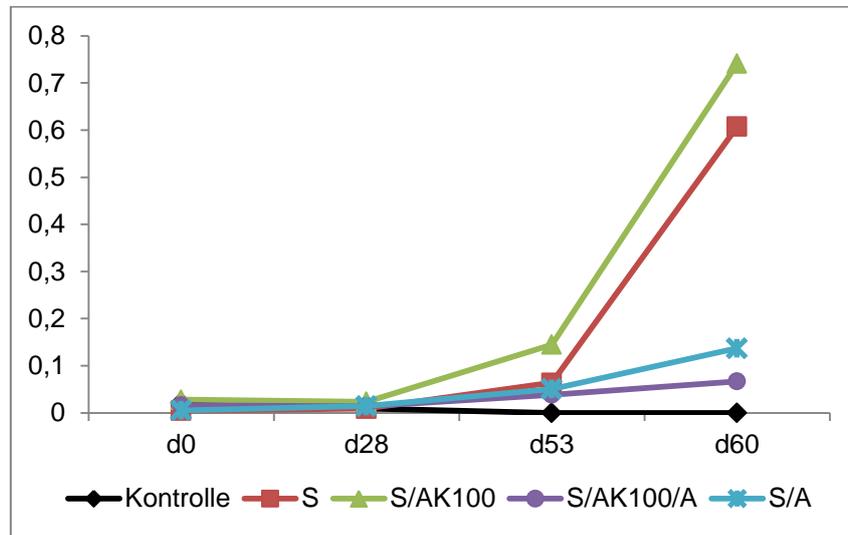


Abbildung 23: Konzentration OVA-spezifischer IgE-Antikörper im Serum in  $\mu\text{g/ml}$ , Mittelwert im Zeitverlauf, V1

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von  $100 \mu\text{g}$  Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo

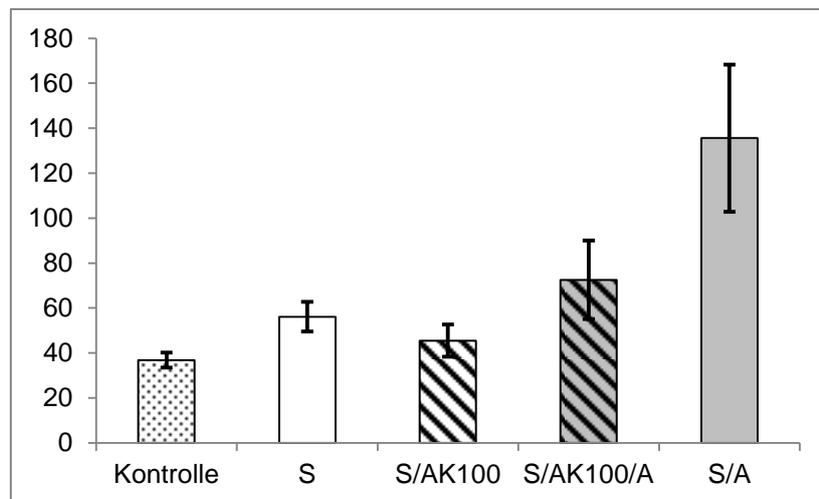
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von  $100 \mu\text{g}$  Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.4 TNF $\alpha$

Um die Wirkungsweise des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers, also das zuverlässige Blocken von TNF $\alpha$ , zu überprüfen, wurde der TNF $\alpha$ -Spiegel in den BAL-Überständen analysiert.

Man sieht, dass in den Gruppen [S], [S/AK100], und der Kontrollgruppe der mittlere TNF $\alpha$ -Spiegel unter 60 pg/ml liegt. In der Gruppe [S/A] nach ASIT liegt er jedoch bei 136 pg/ml, in der Vergleichsgruppe mit Antikörpergabe [S/AK100/A] konnte der Wert auf 73 pg/ml gesenkt werden.

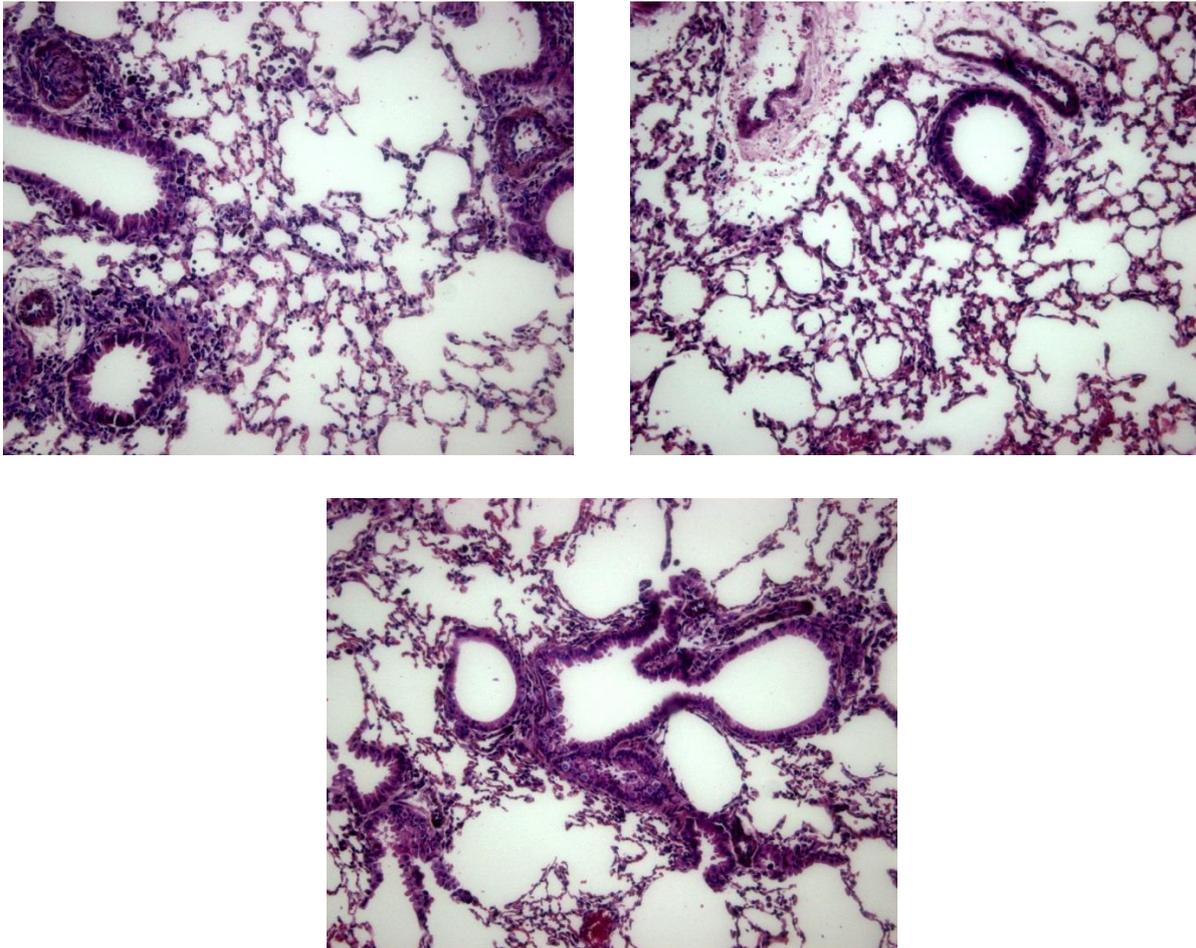


**Abbildung 24: Konzentration von TNF $\alpha$  im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.2.5 Histologie

Das Lungengewebe wurde in Formaldehyd fixiert, anschließend geschnitten und gefärbt. Es erfolgte eine HE- sowie eine PAS-Färbung.

In der HE-Färbung zeigten sich in der rein sensibilisierten Gruppe peribronchiale inflammatorische Infiltrate, nach ASIT waren diese kaum zu beobachten. Nach ASIT unter  $\text{TNF}\alpha$ -Blockade sind einige entzündliche Infiltrate sichtbar, jedoch weniger als in der rein sensibilisierten Gruppe.



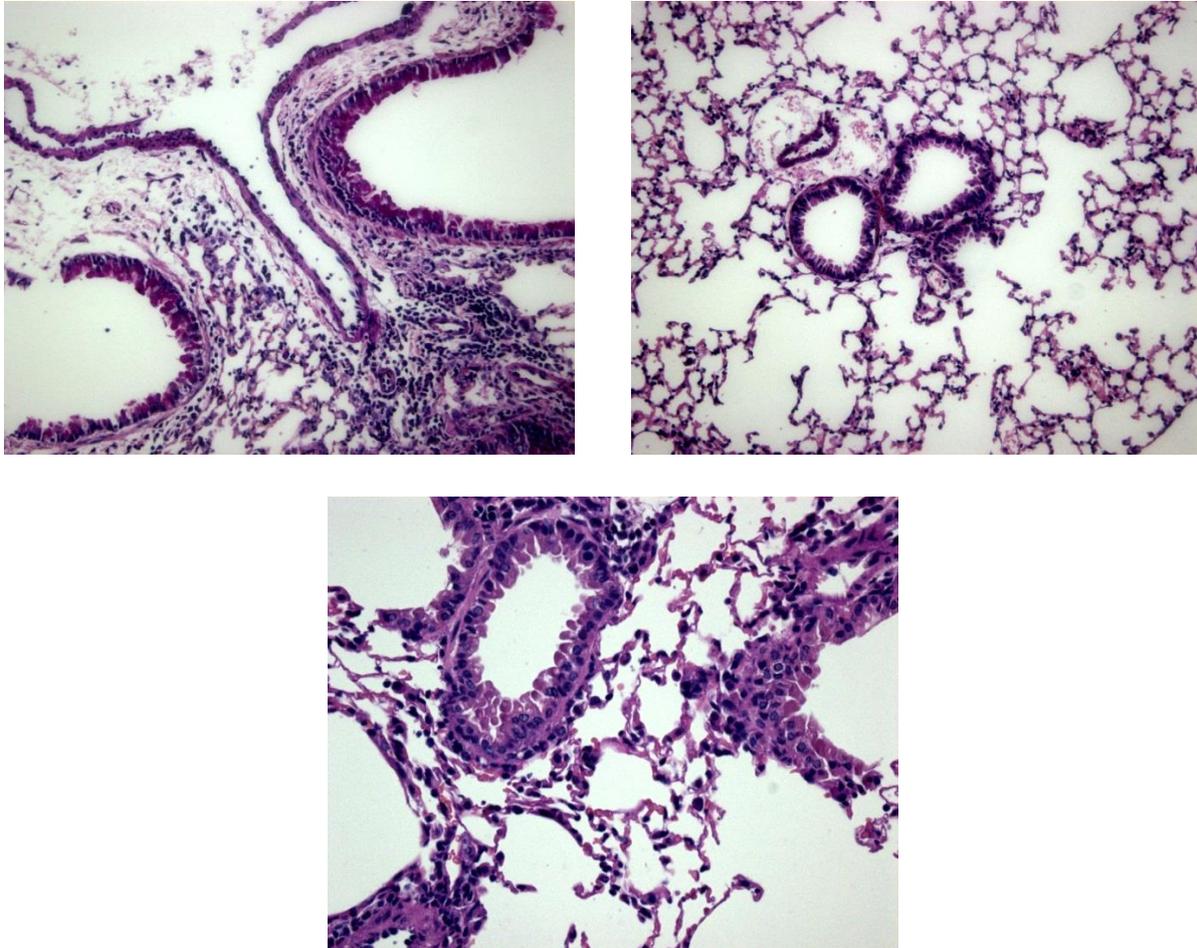
**Abbildung 25: HE-Färbung Lungengewebe; V1**

**oben links: nach Sensibilisierung: ausgeprägte peribronchiale Infiltrate**

**oben rechts: nach ASIT: wenig peribronchiale Infiltrate**

**unten: nach ASIT unter  $\text{TNF}\alpha$ -Blockade: im Vergleich zu dem Bild nach Sensibilisierung weniger, im Vergleich zu dem Bild nach ASIT mehr peribronchiale Infiltrate**

In der PAS-Färbung zeigte sich in der rein sensibilisierten Gruppe verstärkte Mukusproduktion in den Bronchien, nach ASIT war diese kaum zu beobachten. Nach ASIT unter TNF $\alpha$ -Blockade ist eine verstärkte Mukusproduktion sichtbar, jedoch weniger als in der rein sensibilisierten Gruppe.



**Abbildung 26: PAS-Färbung Lungengewebe; V1**

**oben links: nach Sensibilisierung: ausgeprägte Mukusproduktion**

**oben rechts: nach ASIT: wenig Mukusproduktion**

**unten nach ASIT unter TNF $\alpha$ -Blockade: im Vergleich zu dem Bild nach Sensibilisierung weniger, im Vergleich zu dem Bild nach ASIT mehr Mukusproduktion**

### **3.2.6 Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Mittelwerte der Gruppe [S/AK100/A] insgesamt zwischen den Werten der Gruppe [S/AK100] bzw. [S] und [S/A] liegen.

### 3.3 Versuch 2 (V2)

In V2 wurde, zur besseren Darstellung der Wirkung des Antikörpers, eine Gruppe Mäuse mit 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und eine weitere mit der zweifachen Dosis (200 µg) Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelt.

Der genaue Versuchsaufbau wird in Tabelle 8 beschrieben.

Anzahl der Mäuse	d 0-28	d 42 und 53	d 42-46	d 53 -59
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Antikörper (200 µg) (AK)	ASIT (A)	Challenge
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Antikörper (100 µg) (AK)	ASIT (A)	Challenge
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Placebo	ASIT (A)	Challenge
10 Mäuse	Sensibilisierung (S)	Placebo	Placebo	Challenge
5 Mäuse	Placebo	Placebo	Placebo	Challenge

**Tabelle 8: Übersicht über den Versuchsablauf, Versuch 2 und 3**  
**Auflistung der verschiedenen Gruppen der Mäuse und der Behandlung im Zeitverlauf**  
 siehe auch Tabelle 3

Analysiert wurden die Zellen aus dem BAL-Fluid. Es wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und es erfolgte die Differenzierung von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, und Lymphozyten unter dem Lichtmikroskop. Des Weiteren wurden die Zytokine im BAL-Fluid mit Hilfe von ELISA bestimmt, so IL-5, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Im Serum wurden mittels ELISA die Immunglobuline OVA-spezifisches IgG1, OVA-spezifisches IgE und Gesamt-IgE gemessen.

In V2 ließen sich die Ergebnisse von V1 nicht bestätigen, die Werte der mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppen lagen nicht, wie bei V1, zwischen denen der nur sensibilisierten Gruppe und denen der Gruppe, die ohne Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper immuntherapiert wurde. Bezüglich der Gesamtzellzahl lagen die Mittelwerte der mit 200 µg Antikörper behandelten Gruppe noch niedriger als die Werte der nur sensibilisierten Gruppe und der Gruppe, die ohne TNF $\alpha$ -Blockade immuntherapiert wurde. Der prozentuale Anteil an Lymphozyten und Makrophagen stieg unter TNF $\alpha$ -Blockade bei Immuntherapie noch stärker an als in der Gruppe mit Immuntherapie ohne TNF $\alpha$ -Blockade, die eosinophilen Granulozyten fielen im Vergleich noch stärker ab. Die Zytokine IL-13 und IL-5 sanken unter Immuntherapie und TNF $\alpha$ -Blockade noch stärker ab als unter Immuntherapie ohne TNF $\alpha$ -Blockade. Das Verhältnis von IL-5/IL-10 verschob sich durch die ASIT in Richtung IL-10.

Unter TNF $\alpha$ -Blockade verschob sich das Verhältnis stärker. Die OVA-spezifischen IgG1-Antikörper stiegen in der mit 200  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten und immuntherapierten Gruppe noch stärker an als in der Gruppe der Tiere, welche in Anwesenheit von TNF $\alpha$  immuntherapiert wurde. Bei der Bestimmung der TNF $\alpha$ -Spiegel zeigten sich die Werte in den Gruppen, welche mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelt wurden, nicht viel niedriger als in den nicht mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppen, in der Gruppe mit der verdoppelten Dosis Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper war der Wert sogar höher als in der Gruppe, welche mit der geringeren Dosis Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelt wurde.

Da die Ergebnisse deutlich von denen des ersten Versuchs differieren und die TNF $\alpha$ -Werte durch Anwendung des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers nicht wie in V1 gesenkt wurden, wurde von einem Funktionsverlust des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers ausgegangen. So erfolgten Funktionstests des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers und eine Wiederholung des zweiten Versuchs im gleichen Setting als V3. Aufgrund der Redundanz der Ergebnisse wird hier auf die genaue Darstellung der Ergebnisse des zweiten Versuchs (V2) verzichtet.

### **3.4 Test der Funktion des Antikörpers**

#### **3.4.1 Test auf Verunreinigung mit LPS**

Mit Hilfe des LAL-Assays wurde sichergestellt, dass der verwendete Antikörper frei von Verunreinigungen durch LPS war. Im Test konnte kein LPS in der Antikörper-Suspension nachgewiesen werden.

#### **3.4.2 Test der Block-Funktion im ELISA**

Im ELISA wurde die Funktion des Antikörpers getestet. Dazu wurde der Recombinant mouse TNF $\alpha$ -Antikörper, der als Standard im TNF $\alpha$ -ELISA verwendet wird, in der Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper-Suspension beziehungsweise Assay Diluent in jeweils gleicher Konzentration gelöst und anschließend die Konzentration von freiem TNF $\alpha$  im TNF $\alpha$ -ELISA gemessen.

Der TNF $\alpha$  wurde in der Antikörper-Suspension fast vollständig blockiert, es konnten nur noch 28 pg/ml an TNF $\alpha$  nachgewiesen werden. In der Probe mit TNF $\alpha$  in Assay Diluent konnten jedoch 1440 pg/ml TNF $\alpha$  gemessen werden.

So konnte auch gezeigt werden, dass die Komplexe aus Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und von diesem gebundenen TNF $\alpha$  keine falsch positiven Werte im ELISA durch Interferenz hervorriefen.

### 3.4.3 In-vivo-Versuch

Die Funktionsfähigkeit des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers wurde nochmals in vivo getestet. Zwei Mäusen (Maus 1 und 2) wurde 200  $\mu$ g des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers und 6 Stunden später 10  $\mu$ g LPS intraperitoneal gespritzt. Zwei weitere Mäuse (Maus 3 und 4) erhielten nur 10  $\mu$ g LPS und Placebo (PBS). Die Kontrollgruppe (zwei Mäuse, Maus 5 und 6) wurde nur mit Placebo (PBS) behandelt. Die Blutentnahmen erfolgten zu Beginn des Versuches, nach sieben und zehn Stunden, sowie zwei, vier und sechs Tage später. Aus den Serumproben erfolgte die Bestimmung der TNF $\alpha$ -Spiegel mit Hilfe des TNF $\alpha$ -ELISAs. Bei Maus 3 konnte am Zeitpunkt 0h keine Probe gewonnen werden.

Unter Gabe von LPS kam es zu einem deutlichen Anstieg der TNF $\alpha$ -Werte (Maus 3 1510 pg/ml, Maus 4 1627 pg/ml), der aber durch die Gabe von Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper verhindert werden konnte (Maus 1,2,5,6 Wert jeweils unter 50 pg/ml).

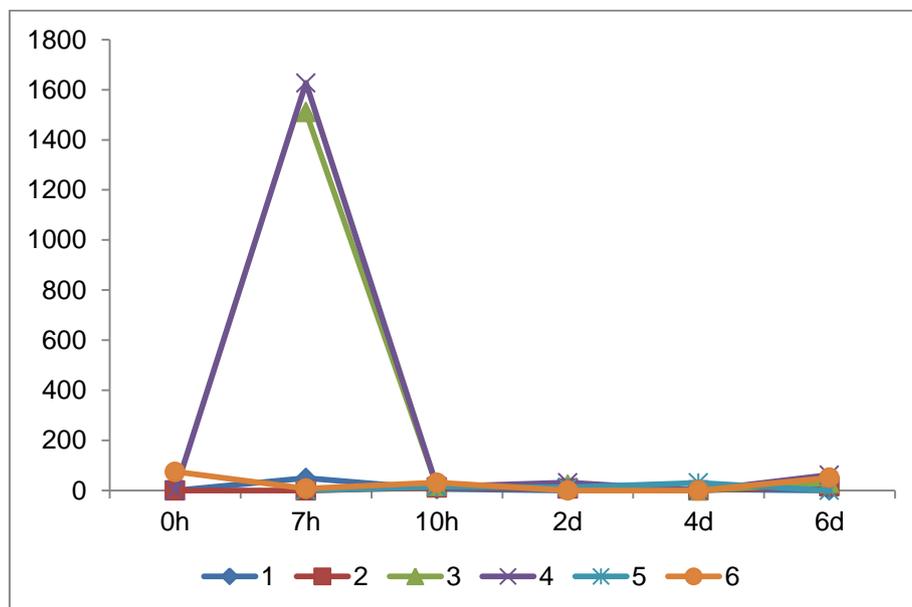


Abbildung 27: Mittelwerte TNF $\alpha$  im Serum in pg/ml, Versuch zur Funktionstestung des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers

nach Gabe von Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper und anschließender Gabe von LPS

Maus 1 und 2: 200  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, LPS

Maus 3 und 4: Placebo und LPS

Maus 5 und 6: Placebo

### 3.4.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Funktionstestung des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers konnte kein Funktionsverlust nachgewiesen werden.

### **3.5 Versuch 3 (V3)**

Der Versuchsaufbau entspricht V2 und wird in Tabelle 8 beschrieben. Analysiert wurden die Zellen aus dem BAL-Fluid. Es wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und es erfolgte die Differenzierung von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, und Lymphozyten unter dem Lichtmikroskop. Des Weiteren wurden die Zytokine im BAL-Fluid mit Hilfe von ELISA bestimmt, so IL-5, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Im Serum wurden mittels ELISA die Immunglobuline OVA-spezifisches IgG1, OVA-spezifisches IgE und Gesamt-IgE gemessen.

Eine Maus aus der Gruppe [S/AK100/A] und zwei Mäuse aus der Gruppe [S/AK200/A] starben während des Versuches und konnten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

#### **3.5.1 Gesamtzellzahl und Zelldifferenzierung aus der BAL- Flüssigkeit**

Die Zellen aus der BAL-Flüssigkeit wurden mit Hilfe einer Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht, gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop analysiert.

### 3.5.1.1 Gesamtzellzahl

Der Mittelwert der Gesamtzellzahl lag in der Kontrollgruppe bei 60450 Zellen. Durch die Sensibilisierung stieg der Wert auf 2765300 Zellen (Gruppe [S]) an. Durch die ASIT fielen die Werte wieder ab. In der Gruppe [S/A] konnten durchschnittlich 323850 Zellen gezählt werden und in den Gruppen mit Blockierung durch den Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper 175430 Zellen in Gruppe [S/AK200/A] und 244222 Zellen in der Gruppe [S/AK100/A].

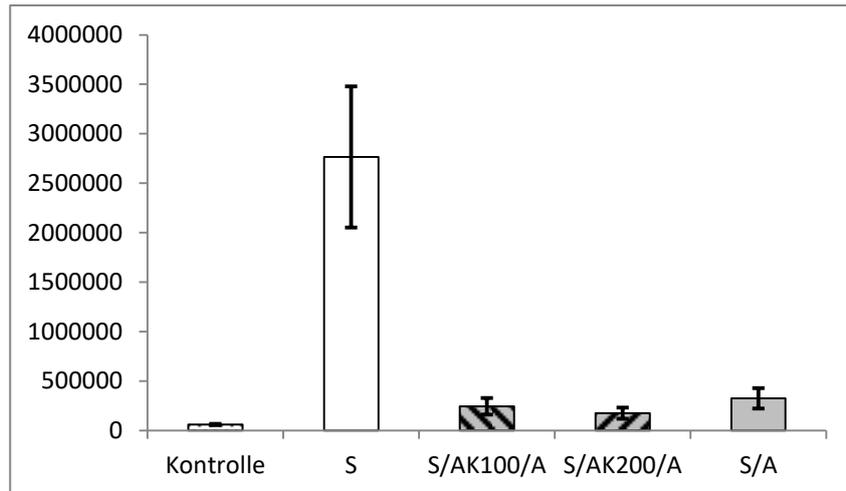


Abbildung 28: Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.1.2 Makrophagen

Der mittlere prozentuale Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl lag in der Kontrollgruppe bei 91,9%. Nach Sensibilisierung lag dieser Anteil im Mittel bei 13,2% (Gruppe [S]). Durch die allergenspezifische Immuntherapie stieg der prozentuale Anteil wieder an. In der Gruppe [S/A] lag er bei 35,7%, in der Gruppe [S/AK200/A] bei 46,1% und in der Gruppe [S/AK100/A] bei 44,9%.

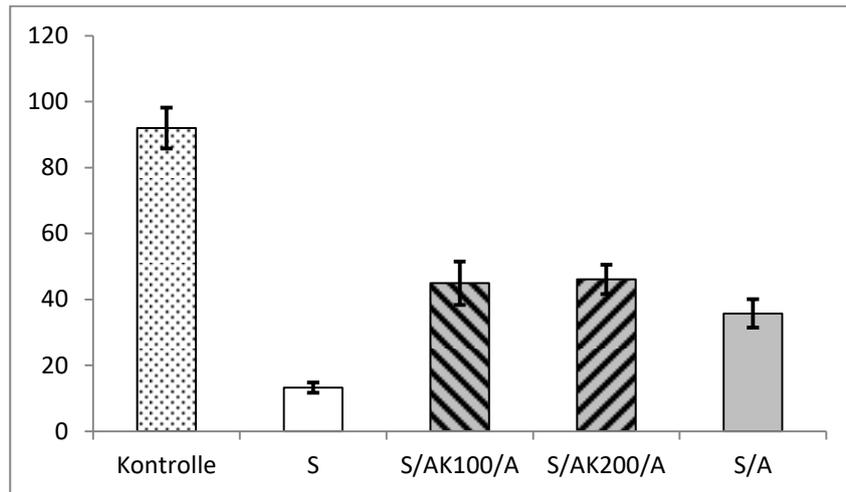


Abbildung 29: prozentualer Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT

Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.1.3 Eosinophile Granulozyten

Der mittlere prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten lag in der Kontrollgruppe bei 7%. Durch die Sensibilisierung stieg der Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl auf 80,7% (Gruppe [S]). Nach ASIT fiel der Anteil auf 58,7% in der Gruppe [S/A] und noch weiter in den mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppen: in der Gruppe [S/AK200/A] auf 49,2% und in der Gruppe [S/AK100/A] auf 49,9%.

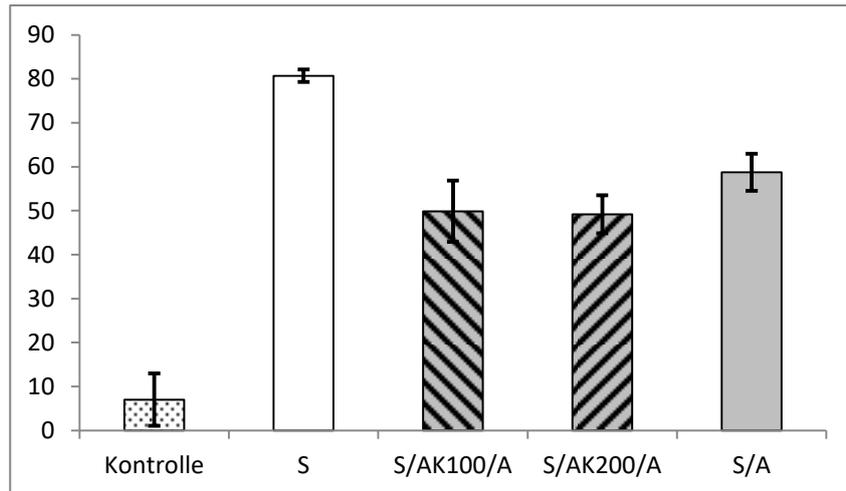


Abbildung 30: prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

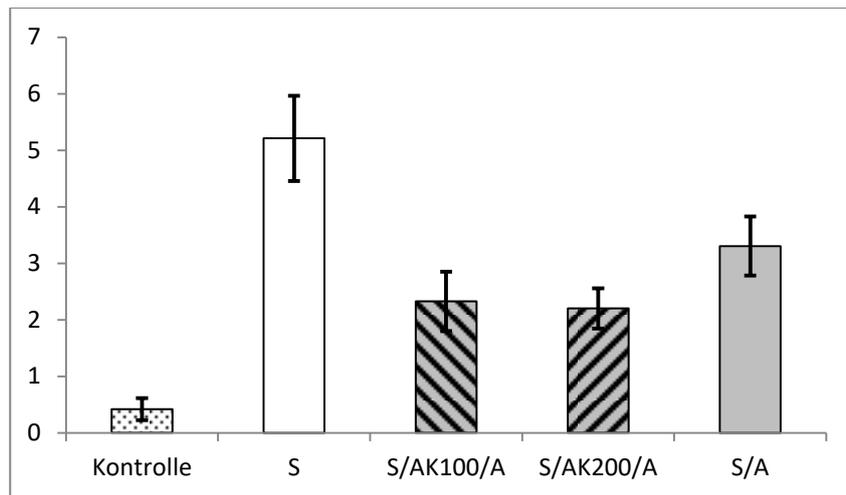
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.1.4 Neutrophile Granulozyten

In der Kontrollgruppe lag der mittlere prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten bei 0,42%. Nach Sensibilisierung lag der Anteil bei 5,21% in Gruppe [S], nach ASIT waren die Anteile niedriger. So fanden sich in der Gruppe [S/A] 3,31%, in der Gruppe [S/AK200/A] 2,20% und in der Gruppe [S/AK100/A] 2,33% neutrophile Granulozyten.



**Abbildung 31: prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3**

**Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo**

**Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo**

**Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT**

### 3.5.1.5 Lymphozyten

Der mittlere prozentuale Anteil der Lymphozyten in der Kontrollgruppe lag bei 0,63%. Nach Sensibilisierung waren 0,88% Lymphozyten detektierbar (Gruppe [S]). In den Gruppen, in denen eine ASIT stattfand, lag der prozentuale Anteil noch höher: in der Gruppe [S/A] waren 2,22%, in der Gruppe [S/AK200/A] 2,55% und in der Gruppe [S/AK100/A] 2,90% Lymphozyten nachweisbar.

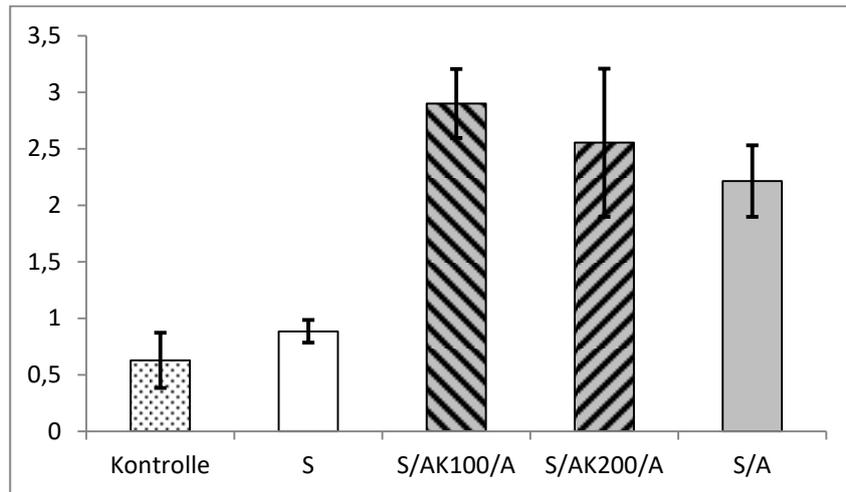


Abbildung 32: prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3

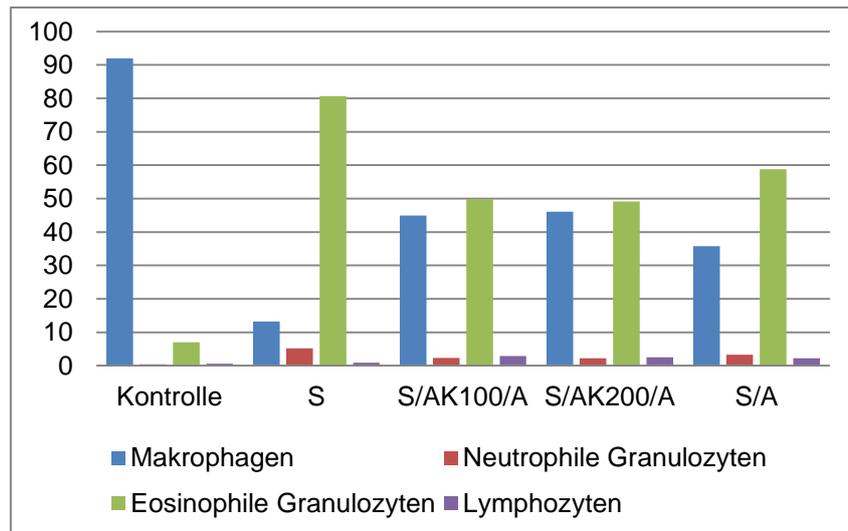
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT



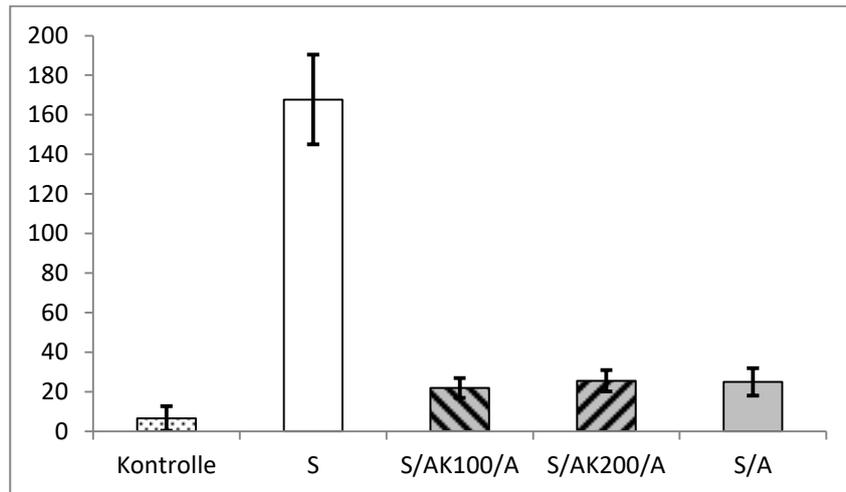
**Abbildung 33: Übersicht über den prozentualen Anteil der verschiedenen Zellarten im BAL-Fluid in den verschiedenen Gruppen, V3**  
**Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten**

### 3.5.2 Zytokine aus der BAL-Flüssigkeit

Die Zytokine aus der BAL-Flüssigkeit wurden aus den Überständen nach Zentrifugation mit Hilfe von ELISA detektiert.

### 3.5.2.1 IL-13

In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert des Zytokins IL-13 bei 7 pg/ml. Nach der Sensibilisierung lag der Wert bei 168 pg/ml in Gruppe [S]. In den Gruppen, die eine ASIT erhielten, sank der Wert anschließend wieder ab. In der Gruppe [S/A] waren 25 pg/ml an IL-13 zu finden, in der Gruppe [S/AK200/A] 25 pg/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] 22 pg/ml.



**Abbildung 34: Konzentration von IL-13 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.2.2 $IFN\gamma$

In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert von  $IFN\gamma$  bei 181 pg/ml. In der rein sensibilisierten Gruppe (Gruppe [S]) fanden sich durchschnittlich 84 pg/ml. Nach ASIT waren in der Gruppe [S/A] 96 pg/ml, in der Gruppe [S/AK200/A] 151 pg/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] 97 pg/ml an  $IFN\gamma$  detektierbar.

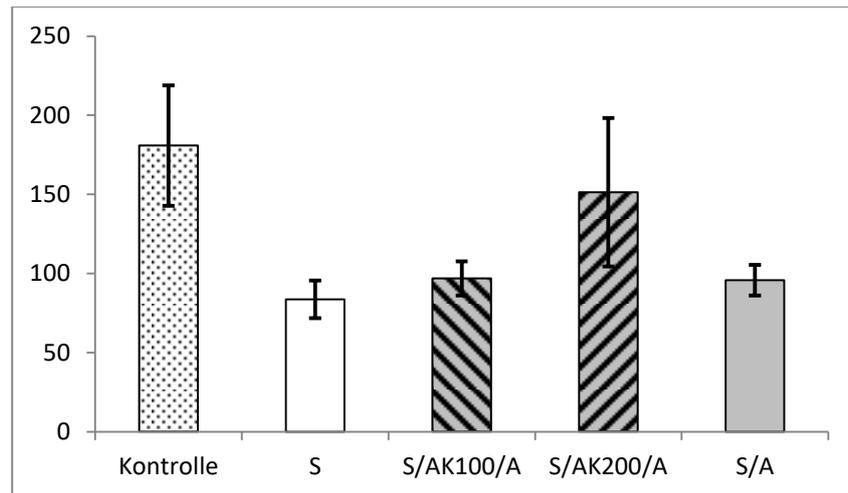


Abbildung 35: Konzentration von  $IFN\gamma$  im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3

Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo

Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo

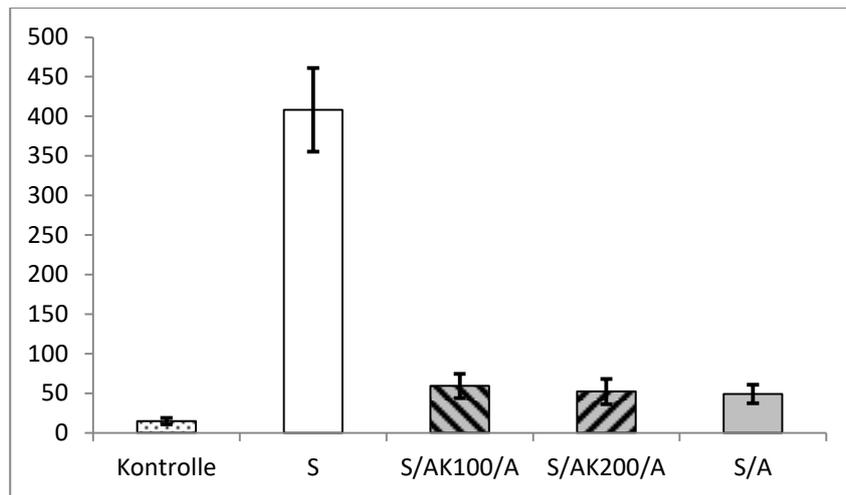
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT

Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.2.3 IL-5

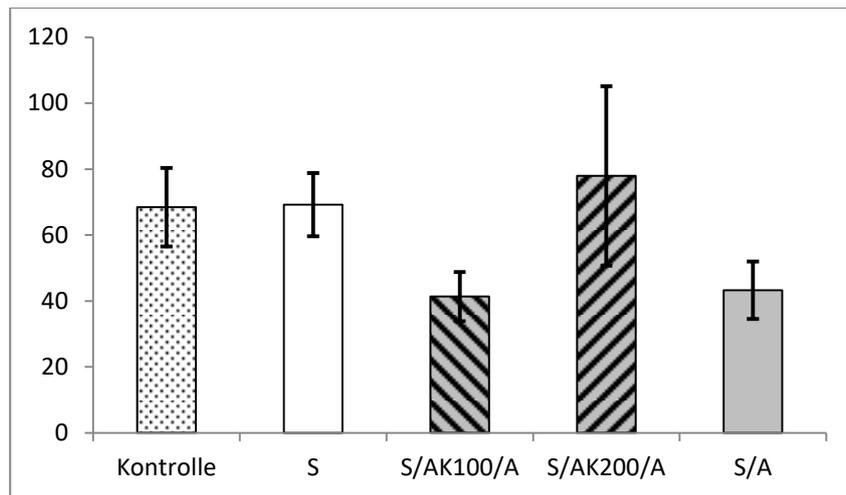
Von einem mittleren Ausgangswert von IL-5 von 15 pg/ml in der Kontrollgruppe stieg der Wert in der rein sensibilisierten Gruppe [S] auf 408 pg/ml. In den Gruppen nach ASIT war der Wert wieder vermindert: in der Gruppe [S/A] bei 49 pg/ml, in der Gruppe [S/AK200/A] bei 52 pg/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] lag er bei 59 pg/ml.



**Abbildung 36: Konzentration von IL-5 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.2.4 IL-10

In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert von IL-10 bei 68 pg/ml. In der rein sensibilisierten Gruppe lag der Mittelwert mit 69 pg/ml knapp darüber. In den Gruppen nach ASIT fanden sich in der Gruppe [S/A] 43 pg/ml, in der Gruppe [S/AK200/A] 78 pg/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] 41 pg/ml an IL-10.



**Abbildung 37: Konzentration von IL-10 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.2.5 IL-5/IL-10

Das Verhältnis von IL-5/IL-10 verschiebt sich durch die ASIT in Richtung IL-10. Unter TNF $\alpha$ -Blockade mit 200 µg Antikörper verschiebt sich das Verhältnis stärker, mit 100 µg Antikörper nicht ganz so stark. In der Gruppe [S] lag das Verhältnis bei 5,91 und sank durch ASIT auf 1,14 (Gruppe [S/A]). In den mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppen lag das Verhältnis bei 1,44 in der Gruppe [S/AK100/A] und bei 0,67 in der Gruppe [S/AK200/A].

### 3.5.3 Immunglobulinbestimmung aus dem Serum

Den Mäusen wurde im Laufe des Versuches mehrmals Blut entnommen. Im Serum der Versuchstage d0, d28, d53 und d60 wurden mit Hilfe von ELISA OVA-spezifische IgG1-Antikörper, OVA-spezifische IgE-Antikörper und Gesamt-IgE-Antikörper gemessen und im zeitlichen Verlauf bewertet.

### **3.5.3.1 OVA-spezifische IgG1- Antikörper**

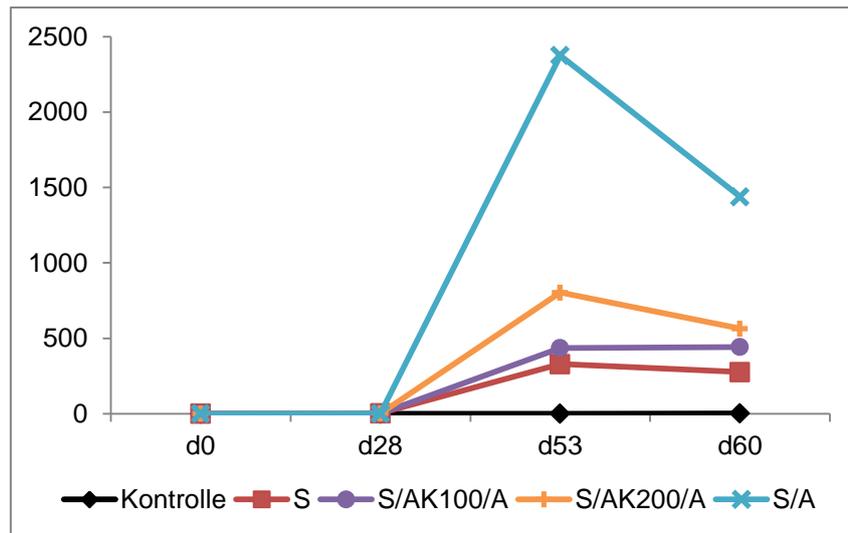
Am Tag 0 (d0) des Experiments waren im Mittel nur geringe Mengen des OVA-spezifischen IgG1-Antikörpers nachweisbar: In der Kontrollgruppe 35 ng/ml, in der Gruppe [S] 5 ng/ml, in der Gruppe [S/A] 5 ng/ml, in der Gruppe [S/AK200/A] 124 ng/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] 94 ng/ml.

Nach der Sensibilisierung am Tag 28 (d28) kam es in allen Gruppen, außer der Kontrollgruppe, zu einem Anstieg der Mittelwerte. In der Gruppe [S] fanden sich 2637 ng/ml an OVA-spezifischem IgG1, in der Gruppe [S/A] 1395 ng/ml, in der Gruppe [S/AK200/A] 2218 ng/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] 1866 ng/ml. In der Kontrollgruppe waren keine OVA-spezifischen IgG1-Antikörper nachweisbar.

Am Tag 53 (d53) kam es zu einem starken Anstieg des Mittelwertes in der Gruppe, die ohne Antikörper-Blockade immuntherapiert wurde (Gruppe [S/A]), auf 2375000 ng/ml. Die Gruppen nach Antikörpergabe und allergenspezifischer Immuntherapie stiegen jedoch mit ihren Werten deutlich weniger an (Gruppe [S/AK200/A] 803250 ng/ml und Gruppe [S/AK100/A] 435878 ng/ml), und lagen damit näher dem Wert in der rein sensibilisierten Gruppe mit 328900 ng/ml.

In der Kontrollgruppe waren keine OVA-spezifischen IgG1-Antikörper messbar.

Nach Challenge am Tag 60 (d60) fielen die Mittelwerte in der Gruppe [S/A] von 2375000 ng/ml auf 1437800 ng/ml deutlich ab. Weniger stark sanken die Werte in den Gruppen [S/AK200/A] (von 803250 ng/ml auf 564388 ng/ml) und [S] (von 328900 ng/ml auf 276667 ng/ml). In der Gruppe [S/AK100/A] kam es zu einem leichten Anstieg von 435878 ng/ml auf 442556 ng/ml. In der Kontrollgruppe waren 1789 ng/ml OVA-spezifisches IgG1 messbar.



**Abbildung 38: Konzentration OVA-spezifischer IgG1-Antikörper im Serum in µg/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V3**

**Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo**

**Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo**

**Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT**

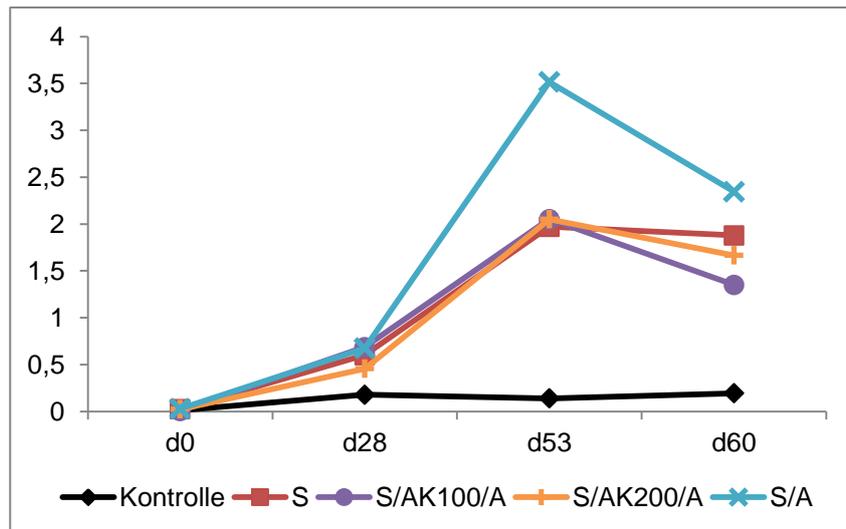
### 3.5.3.2 Gesamt-IgE- Antikörper

Am Tag 0 (d0) des Experimentes wurden die mittleren Ausgangswerte des Gesamt-IgE-Spiegels gemessen: in der Kontrollgruppe fanden sich durchschnittlich 13 ng/ml, in der Gruppe [S] 26 ng/ml, in der Gruppe [S/A] 28 ng/ml, in der Gruppe [S/AK200/A] 23 ng/ml und in der Gruppe [S/AK100/A] 5 ng/ml.

Nach der Sensibilisierung am Tag 28 (d28) stiegen die Mittelwerte in allen Gruppen an: Gruppe [S] auf 601 ng/ml, Gruppe [S/A] auf 675 ng/ml, Gruppe [S/AK200/A] auf 457 ng/ml und Gruppe [S/AK100/A] auf 686 ng/ml. Auch in der Kontrollgruppe kam es zu einem leichten Anstieg auf 179 ng/ml.

Am Tag 53 (d53) kam es in der Gruppe [S/A] zu einem Anstieg auf über 3000 ng/ml (3515 ng/ml), während die Werte in den anderen Gruppen nur auf durchschnittlich 2000 ng/ml stiegen (Gruppe [S/AK200/A] 2051 ng/ml, Gruppe [S/AK100/A] 2052 ng/ml, Gruppe [S] 1970 ng/ml). Der Wert in der Kontrollgruppe lag bei 139 ng/ml.

Nach Challenge am Tag 60 (d60) kam es in allen Gruppen zu einem Abfall der Mittelwerte. In Gruppe [S/A] waren 2346 ng/ml an Gesamt-IgE detektierbar, in der Gruppe [S/AK200/A] 1666 ng/ml, in der Gruppe [S/AK100/A] 1351 ng/ml und in der Gruppe [S] 1879 ng/ml. In der Kontrollgruppe fanden sich 194 ng/ml an Gesamt-IgE.



**Abbildung 39: Konzentration der Gesamt-IgE-Antikörper im Serum in µg/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V3**  
**Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo**  
**Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo**  
**Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT**  
**Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT**  
**Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT**

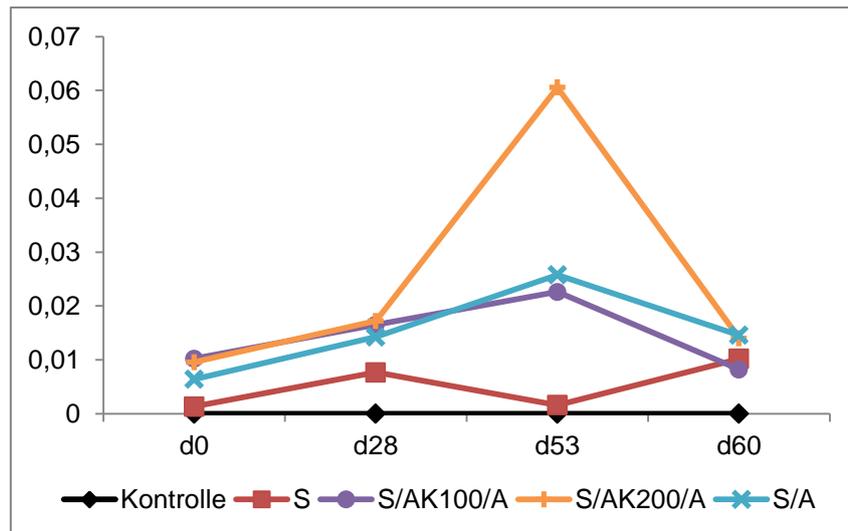
### 3.5.3.3 OVA-spezifische IgE- Antikörper

Am Tag d0 lagen die Mittelwerte der OVA-spezifischen IgE-Antikörper unter 11 ng/ml. (Gruppe [S] 1,3 ng/ml, Gruppe [S/AK100/A] 10 ng/ml, Gruppe [S/AK200/A] 9,6 ng/ml, Gruppe [S/A] 6,4 ng/ml und in der Kontrollgruppe lag der Wert unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA).

Am Tag d28 stiegen die Werte in allen sensibilisierten Gruppen an (Gruppe [S] 7,7 ng/ml, Gruppe [S/AK100/A] 17 ng/ml, Gruppe [S/AK200/A] 17 ng/ml und Gruppe [S/A] 14 ng/ml. In der Kontrollgruppe lag der Wert weiterhin unter der Nachweisgrenze.

Am Tag d53 stieg der Mittelwert der OVA-spezifischen IgE-Antikörper in der Gruppe [S/AK200/A] deutlich an auf 61 ng/ml, in den Gruppen [S/A] und [S/AK100/A] stieg er weniger stark auf 23 ng/ml ([S/AK100/A]) beziehungsweise 26 ng/ml ([S/A]). In Gruppe [S] sank der Wert auf 1,6 ng/ml und in der Kontrollgruppe waren immer noch keine OVA-spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar.

Am Tag d60 sanken die Werte der Gruppen, die eine ASIT erhalten hatten (Gruppe [S/A] 15 ng/ml, [S/AK100/A] 8 ng/ml, [S/AK200/A] 14 ng/ml). In Gruppe [S] stieg der Wert wieder auf 10 ng/ml und in der Kontrollgruppe waren auch weiterhin keine OVA-spezifischen IgE-Antikörper nachweisbar.



**Abbildung 40: Konzentration OVA-spezifischer IgE-Antikörper im Serum in µg/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V3**

**Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo**

**Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo**

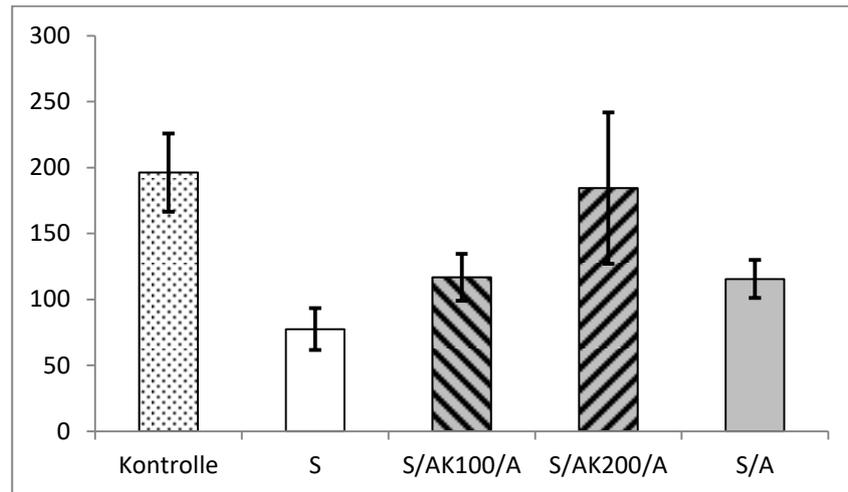
**Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200 µg Anti-TNFα-Antikörper, ASIT**

**Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT**

### 3.5.4 TNF $\alpha$

Der Mittelwert von TNF $\alpha$  in der Kontrollgruppe betrug 196 pg/ml. In der rein sensibilisierten Gruppe [S] lag der Wert bei 77 pg/ml. Durch ASIT stieg TNF $\alpha$  in Gruppe [S/A] auf 115 pg/ml. In den durch Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper geblockten Gruppen lag der TNF $\alpha$ -Wert trotz Antikörper noch höher, nämlich bei 117 pg/ml in Gruppe [S/AK100/A] und bei 184 pg/ml in der Gruppe [S/AK200/A].



**Abbildung 41: Konzentration von TNF $\alpha$  im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3**  
Kontrollgruppe: Behandelt mit Placebo  
Gruppe [S]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo  
Gruppe [S/AK100/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 100  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/AK200/A]: Sensibilisierung mit OVA, Gabe von 200  $\mu$ g Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, ASIT  
Gruppe [S/A]: Sensibilisierung mit OVA, Placebo, ASIT

### 3.5.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass, betreffend die Zytokine, die Werte der Gruppe [S/A] insgesamt meist zwischen den Werten der Gruppe [S] und den Gruppen [S/AK100/A] und [S/AK200/A] liegen. Bei den OVA-spezifischen IgG1-Antikörpern liegen die Werte der Gruppen [S/AK100/A] und [S/AK200/A] zwischen denen der Gruppe [S] und [S/A].

## 4 Diskussion

In diesen Versuchen wurde im Mausmodell mit C57BL/6-Mäusen der Einfluss von  $\text{TNF}\alpha$  auf die allergenspezifische Immuntherapie untersucht. Das Mausmodell der allergenspezifischen Immuntherapie wurde von Vissers et al. übernommen und modifiziert (Vissers et al. 2004).  $\text{TNF}\alpha$  wurde mit Hilfe eines Anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpers geblockt. Die Mäuse wurden mit OVA sensibilisiert, unter An- oder Abwesenheit von  $\text{TNF}\alpha$  mit OVA immuntherapiert und schließlich provoziert. Am Ende des Protokolls wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. In der bronchoalveolären Lavage wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellen anschließend unter dem Lichtmikroskop differenziert. Im Überstand der bronchoalveolären Lavage wurden mit Hilfe des ELISA die Zytokinspiegel gemessen. Die Lungen selbst wurden histologisch untersucht. Im Serum wurden die OVA-spezifischen IgG1- und IgE-Antikörper, sowie die Gesamt-IgE-Antikörper gemessen.

In der sensibilisierten Gruppe der Mäuse stieg die Gesamtzellzahl im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich an. In der Zelldifferenzierung zeigte sich ein hoher prozentualer Anteil an eosinophilen Granulozyten, während der prozentuale Anteil der Makrophagen eher gering war. Bei der Messung der Zytokine war, wie erwartet, eine Verschiebung zu  $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokinen zu verzeichnen. So stiegen IL-13 und IL-5 an, während  $\text{IFN}\gamma$  sank. Die IL-5/IL-10-Ratio als Zeichen der Verschiebung des Zytokingleichgewichts war deutlich höher als in den Vergleichsgruppen. Die OVA-spezifischen IgG1-Antikörper stiegen im Vergleich zur immuntherapierten Gruppe nur sehr mäßig an. Die Gesamt-IgE-Antikörper dagegen zeigten eine starke Erhöhung mit Maximum am Ende des Versuches. Diese Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Sensibilisierung an, da die typischen Pathomechanismen, die eine Sensibilisierung ausmachen, vorliegen.

In der Gruppe der sensibilisierten und anschließend immuntherapierten Tiere war im Vergleich dazu die Gesamtzellzahl drastisch niedriger und sank auf circa 1/23 des Wertes der rein sensibilisierten Gruppe. Die Zelldifferenzierung war beherrscht von Makrophagen, der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten war geringer. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten hingegen war höher. Das Zytokingleichgewicht verschob sich Richtung  $\text{T}_\text{H}1$ , so sank der Spiegel von IL-5 auf etwas mehr als 1/6 der Vergleichsgruppe und IL-13 unter die Nachweisgrenze des ELISA, während  $\text{IFN}\gamma$  anstieg. Die IL-5/IL-10-Ratio sank deutlich ab. Die OVA-spezifischen IgG1-Antikörper zeigten einen deutlichen Anstieg während der ASIT. Das Gesamt-IgE stieg zunächst an, um dann wieder deutlich zu sinken. Diese molekularen Veränderungen zeichnen eine erfolgreiche allergenspezifische Immuntherapie aus.

In der Gruppe der Mäuse, die sensibilisiert und unter TNF $\alpha$ -Deprivation immuntherapiert wurden, lagen die gemessenen Werte praktisch durchgehend zwischen denen der beiden Vergleichsgruppen. Die Gesamtzellzahl sank im Vergleich zur sensibilisierten Gruppe der Tiere durch die ASIT nicht so stark ab wie unter Anwesenheit von TNF $\alpha$ . Auch in der Zelldifferenzierung lag der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten über und der prozentuale Anteil der Makrophagen unter dem der Vergleichsgruppe mit ASIT in Anwesenheit von TNF $\alpha$ . Das Zytokingleichgewicht verschob sich unter Blockade von TNF $\alpha$  nicht so weit in Richtung T<sub>H</sub>1-bestimmter Immunantwort wie unter Anwesenheit von TNF $\alpha$ . So war sowohl der Anstieg des IFN $\gamma$  als auch das Absinken von IL-5 und IL-13 dezenter. Der Anstieg der OVA-spezifischen IgG1-Antikörper unterschied sich signifikant von der Vergleichsgruppe mit TNF $\alpha$ : der Anstieg war wesentlich flacher. Die OVA-spezifischen IgE-Antikörper zeigten, im Vergleich mit der Gruppe, die in Anwesenheit von TNF $\alpha$  immuntherapiert wurde, keinen so rasanten Anstieg und vor allem Abstieg. Die IL-5/IL-10-Ratio war zwar deutlich niedriger als unter reiner Sensibilisierung, aber über der der unter Anwesenheit von TNF $\alpha$  immuntherapierten Tiere. Diese in sich stimmigen Ergebnisse zeigen eine deutliche Tendenz dahingehend, dass unter Blockade von TNF $\alpha$  die Effizienz der ASIT beeinträchtigt ist.

In den zwei folgenden Versuchen im gleichen Mausmodell konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. So schien die ASIT unter TNF $\alpha$ -Blockade mindestens genauso gut zu funktionieren als unter Anwesenheit von TNF $\alpha$ .

Um der Frage nachzugehen, warum die Beobachtung des klinischen Falls einer Patientin unserer Klinik nur im ersten Versuch nachvollzogen werden konnte und nicht in den Folgeversuchen, wurde zunächst die Funktion des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers untersucht. Auffällig waren nämlich die TNF $\alpha$ -Spiegel in den verschiedenen Versuchen. Im ersten Versuch waren die TNF $\alpha$ -Werte in den Tieren, die nicht mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelt wurden, wie erwartet höher als in den mit Antikörper behandelten Tieren. Somit konnte eine funktionierende Blockade durch den Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper nachgewiesen werden. In den Folgeversuchen lagen jedoch die Werte von TNF $\alpha$  in den mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Tieren anstatt niedriger, gleich oder sogar höher als in den Tieren ohne Behandlung mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper. Das lässt den Schluss zu, dass die Blockade von TNF $\alpha$  durch den Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper nicht wirkungsvoll beziehungsweise ausreichend war.

Zur Funktionstestung des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers wurde zunächst ein ELISA durchgeführt. Der Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , der als Standard des ELISA verwendet wird, wurde mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper in verschiedenen Dosen versetzt. Der zugegebene Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper blockierte TNF $\alpha$  dosisabhängig. So konnte kein Funktionsverlust des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers nachgewiesen werden. Auch ein in-vivo-Test, bei dem, vergleichbar dem Vorversuch, die

TNF $\alpha$ -Produktion von Mäusen mit LPS stimuliert wurde, und unter Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpergaben unterbunden wurde, zeigte keinen Funktionsverlust des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers.

Um die Frage nach einer Verunreinigung des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers durch Antikörperblockierende oder TNF $\alpha$ -stimulierende Substanzen zu klären, wurde ein LAL-Test durchgeführt, der allerdings keine Verunreinigung durch LPS zeigte.

Ebenso stellten wir uns die Frage, ob die Halbwertszeit des Antikörpers ausreichend war, und der Antikörper somit seine Funktion während des Versuches ausreichend erfüllen konnte. In der Literatur fanden sich Angaben einer Halbwertszeit von verschiedenen Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern von 5-6 Tagen (Haak-Frendscho et al. 1994). Damit sollte die Phase der ASIT (im Versuchsprotokoll d42-d46 mit Injektion des Antikörpers an d42) und der Challenge (d53-d59 mit Injektion des Antikörpers an d53) hinreichend abgedeckt sein. Außerdem würde eine unzureichende Halbwertszeit und somit Verfügbarkeit des Antikörpers nicht die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dem ersten und den folgenden Versuchen erklären, zumal die Dosis des Antikörpers in den Folgeversuchen verdoppelt wurde.

Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper seine Funktion aufgrund einer nicht ausreichenden Verteilung nicht erfüllen konnte. Es besteht die Möglichkeit, dass der Antikörper durch die intraperitoneale Injektion nicht gleichmäßig im Körper verteilt wurde und die Zielorgane nicht in ausreichend hoher Dosierung erreicht hat.

Weiterhin auffällig waren die in den Versuchen 2 und 3 insgesamt deutlich höheren TNF $\alpha$ -Werte im Vergleich zu Versuch 1. Auch und besonders in den Kontrollgruppen waren die Werte des TNF $\alpha$  sehr hoch. Das könnte auf eine exogene Stimulierung des Immunsystems hinweisen.

Eine solche exogene Stimulierung könnte beispielsweise durch das für die Sensibilisierung verwendete Ovalbumin erfolgt sein. Für das handelsübliche Ovalbumin wurden bereits mehrfach Kontaminationen mit LPS nachgewiesen (Schütt und Steck 2007; Watanabe et al. 2003). Bei dem von uns verwendeten Ovalbumin liegen seitens der Firma keine Werte für eine solche Verunreinigung vor. Eine Kontamination mit Endotoxinen wurde von der Firma nicht getestet (Information Firma Sigma-Aldrich). Laut Literaturangaben wurden für dieses Ovalbumin LPS-Kontaminationen bis 456 pg/ml gemessen (Bewersdorff 2010). In den meisten Publikationen zum Mausmodell der Immuntherapie wurde handelsübliches Ovalbumin verwendet und doch eine erfolgreiche Immuntherapie durchgeführt. Allerdings mehren sich in der Literatur Hinweise auf einen Einfluss von LPS-kontaminiertem Ovalbumin auf die Ergebnisse der Immuntherapie, beziehungsweise auf Immunantworten im Allgemeinen (Lowe et al. 2015; Tsuchiya et al. 2012; Watanabe et al. 2003). Weiterhin wird LPS ein großer Einfluss auf das Immunsystem im Gesamten zugeschrieben. Eine niedrige

Dosis LPS scheint zu einer  $T_H2$ -Antwort des Immunsystems zu führen, während eine hohe Dosis LPS mit einer  $T_H1$ -Antwort und so einer vermehrten Toleranz einherzugehen scheint (Watanabe et al. 2003). Da LPS ein sehr potenter Aktivator von  $TNF\alpha$  ist, ist natürlich in einem Mausmodell zur Rolle von  $TNF\alpha$  bei der allergenspezifischen Immuntherapie eine Kontamination von Ovalbumin von sehr großer Relevanz (Janeway und Murphy 2009, S. 536; Oliver et al. 1993).

Unterstützt wird letztere These auch durch die in V3 insgesamt erhöhten  $IFN\gamma$ -Spiegel. In V1 lagen die Werte von  $IFN\gamma$  bei maximal 15 pg/ml. In V3 lagen die Mittelwerte des  $IFN\gamma$  in allen Gruppen über 80 pg/ml. Da LPS ebenfalls ein sehr potenter Induktor für  $IFN\gamma$  ist und  $IFN\gamma$  vor allem in der  $T_H1$ -vermittelten Immunantwort eine große Rolle spielt, kann durch vermehrt vorliegendes LPS im Ovalbumin der Versuch gestört worden sein (Lowe et al. 2015).

Zusammenfassend kann der Grund für die nicht ausreichende Blockade des  $TNF\alpha$  durch den Anti- $TNF\alpha$ -Antikörper nicht sicher benannt werden. Eine Verunreinigung kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es sollten hierzu Versuche mit einem anderen Modell in Betracht gezogen werden.

Die Annahme, dass das Fehlen von  $TNF\alpha$  die Effizienz einer allergenspezifischen Immuntherapie beeinträchtigt, ist nach momentanem Forschungsstand recht plausibel.

Durch Fehlen von  $TNF\alpha$  wird die Mikroarchitektur in lymphatischen Organen gestört, was auch funktionelle Folgen hat (Hehlhans und Pfeffer 2005).  $TNF\alpha$  hat wichtige immunmodulatorische Eigenschaften (Hehlhans und Pfeffer 2005). Des Weiteren ist  $TNF\alpha$  ein Zytokin, welches eine große Rolle in der  $T_H1$ -gewichteten Immunantwort spielt. Folglich verschiebt das Blockieren von  $TNF\alpha$  das Zytokinegleichgewicht eher in Richtung einer  $T_H2$ -Immunantwort und wirkt daher allergiefördernd (Hehlhans und Pfeffer 2005; Deetjen und Alzheimer 2005, S. 388ff).  $TNF\alpha$  aktiviert IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase), die wiederum immunsuppressive Eigenschaften hat (siehe auch Kapitel: 4.1.3). Ferner induziert  $TNF\alpha$  das TSG-6-Protein, ein antiinflammatorisches Zytokin (siehe auch Kapitel: 4.1.1). Viele Studien zeigen, dass  $TNF\alpha$  über  $TNFR2$  direkt  $T_{regs}$  aktivieren kann (siehe auch Kapitel: 4.1.5). Da die ASIT auf immunsuppressiven Mechanismen beruht, vor allem auf der Induktion von  $T_{regs}$ , ist eine Störung der Wirkungsweise der ASIT bei Fehlen von  $TNF\alpha$  denkbar.

#### **4.1.1 $TNF\alpha$ und TSG-6**

Die beiden Zytokine  $TNF\alpha$  und IL-1, die beide eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielen, lösen Signalwege aus, bei denen verschiedene Transkriptionsfaktoren und somit viele Gene aktiviert werden. Eines dieser Gene ist das TSG-6 (TNF-stimulated gene 6). Dieses Gen codiert für ein antiinflammatorisches Protein gleichen Namens. Es handelt sich hierbei um ein Polypeptid von 277 Aminosäuren mit einer Signalsequenz von 17

Aminosäuren (Wisniewski und Vilcek 1997). Das TSG-6-Protein hat eine Masse von 35 kDa und besitzt zwei spezielle Domänen. Einmal eine Hyaluronsäure-Bindestelle, die allen Hyaladherinen, also Hyaluronsäurebindeproteinen gemeinsam ist, und zum anderen eine C-terminale CUB (complement C1r/C1s, Uegf and bone morphogenic protein1)-Domäne. Diese Domäne findet sich bei vielen verschiedenen, meist extrazellulären oder membranassoziierten Proteinen.

Das TSG-6-Protein zeigt sich besonders bei Patienten mit (chronischen) Entzündungen und Autoimmunerkrankungen erhöht. Vor allem im Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, bakterieller Sepsis und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthritis (Rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis) finden sich erhöhte Werte des TSG-6-Proteins. Das TSG-6-Protein wird vor allem in mononukleären Zellen sowie in Chondrozyten und Zellen der Synovia gebildet (Wisniewski et al. 1996). Die stärksten Induktoren sind TNF $\alpha$  und IL-1, aber auch bakterielles LPS und mechanische Stimuli. Die Aktivierung des TSG-6 wird von den Transkriptionsfaktoren NF-IL-6 und AP1 (activator protein 1) reguliert.

Das TSG-6-Protein bildet temperaturabhängig einen stabilen kovalenten Komplex mit dem Plasmaprotein Ial (inter- $\alpha$ -inhibitor) (Wisniewski et al. 1994). Ial hat eine Masse von 225 kDa und ist eine Serinprotease mit inhibitorischen Eigenschaften, welche durch die Bindung mit dem TSG-6-Protein verstärkt werden. Unter anderem wird Plasmin inhibiert, ein proinflammatorisches Protein. Plasmin aktiviert Metalloproteinasen, die zur Gewebeerstörung durch Proteolyse führen. Das TSG-6-Protein hemmt also diese Gewebeerstörung und greift in das proteolytische Netzwerk ein. Die antiinflammatorischen Wirkungen von TSG-6-Protein wurden von Wisniewski et al. im Mausmodell gezeigt (Wisniewski et al. 1996). Außerdem hemmt das TSG-6-Protein die Migration von inflammatorischen Zellen, besonders neutrophilen Granulozyten, in das entzündete Gewebe. Mindrescu et al. (Mindrescu et al. 2005) fanden heraus, dass das TSG-6-Protein in Makrophagen die COX-2 (Cyclooxygenase 2) erhöht. Dadurch wird die Prostaglandinsynthese gesteigert, vor allem die des Prostaglandin D2 (PGD2). Dessen Metabolite PGJ2, vor allem 15-deoxy- $\Delta$ 12-14-PGJ2, können die Aktivität von Makrophagen und ihre Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen senken, über PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) wirken und direkt die proinflammatorischen Signalwege NF- $\kappa$ B und AP-1 hemmen (Mindrescu et al. 2005). Das TSG-6-Protein scheint im Rahmen einer Entzündung ein negatives Feedback zu induzieren und weist immunsuppressive Eigenschaften auf (Wisniewski et al. 1996). Bei einer Blockade von TNF $\alpha$  könnte durch die fehlende Induktion durch TNF $\alpha$  das TSG-6-Protein sinken und somit die für eine effiziente ASIT nötige Immunsuppression fehlen.

### **4.1.2 TNF $\alpha$ und TGF $\beta$**

TGF $\beta$  ist ein Zytokin mit immunsuppressiver Wirkung. Es wird von T<sub>regs</sub> gebildet, vor allem von T<sub>H</sub>3-Zellen und aktiviert gemeinsam mit IL-10 weitere regulatorische T-Zellen.

Sullivan et al. (Sullivan et al. 2005) zeigten, dass TNF $\alpha$  in Fibroblasten die Produktion von TGF $\beta$  induziert. TGF $\beta$  wurde hierzu im ELISA gemessen. Mit Hilfe von real-time-PCR konnte festgestellt werden, dass die mRNA des TGF $\beta$  unter TNF $\alpha$  um das Zwei- bis Vierfache anstieg. Auch erhöhte sich die Stabilität der mRNA des TGF $\beta$ . Unter Einfluss von TNF $\alpha$  stieg die Halbwertszeit der mRNA von vorher 15 auf 24 Stunden. Es zeigte sich, dass TNF $\alpha$  über die ERK (extracellular signal regulated kinase) wirkt, da Inhibitoren der ERK die Induktion von TGF $\beta$  verhindern (Sullivan et al. 2005).

In einer weiteren Studie bestätigten Sullivan et al. dass die Induktion von TGF $\beta$  zumindest teilweise über de novo Transkription erfolgt. Die prä-mRNA des TGF $\beta$ , also die noch nicht gespleißte RNA, stieg nach Stimulation mit TNF $\alpha$  stark an. Die Transkription von TGF $\beta$  wird unter anderem über AP-1 (activator protein 1) reguliert. Also wurden die Zellen vor Stimulation mit TNF $\alpha$  mit Curcumin, einem Inhibitor des AP-1, behandelt. In der Folge sank sowohl die prä-mRNA als auch die mRNA des TGF $\beta$ . Dies zeigt, dass AP-1 in der Induktion von TGF $\beta$  durch TNF $\alpha$  eine wichtige Rolle spielt (Sullivan et al. 2009).

Bei Blockade von TNF $\alpha$  kann es zu einer geringeren Produktion von TGF $\beta$  kommen, und somit die für eine effiziente ASIT nötige Immunsuppression eingeschränkt sein.

### **4.1.3 TNF $\alpha$ und IDO**

#### **4.1.3.1 IDO**

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein zytosolisches Enzym, welches eine Häm-Gruppe besitzt. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase besteht aus 403 Aminosäuren und weist eine Masse von ca. 40000 kDa auf (Taylor und Feng 1991). Sie katalysiert den ersten Schritt im Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Dieser Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Tryptophanmetabolismus. Hierbei wird aus Tryptophan N-Formylkynurenin gebildet. In der Folge entstehen über Kynurenin noch weitere Metaboliten, so die Kynureninsäure oder die Xanthurensäure (Taylor und Feng 1991; Johnson et al. 2009). Die IDO ist nicht in allen Zellen durchgehend aktiv, sie muss zunächst induziert werden. Die Gene der IDO (IDO1 und IDO2) liegen nahe beieinander auf Chromosom 8. In der Promotorregion finden sich Elemente namens ISRE (interferon stimulated response element) und GAS (interferon gamma activated sequence) über die die IDO induziert werden kann. Die Hauptproduzenten von IDO sind dendritische Zellen, es gibt aber auch Hinweise, dass auch Makrophagen, eosinophile Granulozyten und epitheliale sowie endotheliale Zellen IDO exprimieren können (Johnson et al. 2009).

#### **4.1.3.2 IDO Induktion**

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase kann durch verschiedene Signalwege induziert werden. Toll-like-Rezeptoren (TLR) befinden sich vor allem auf Makrophagen und sind für die Erkennung von pathogenen Molekülen verantwortlich. Es existieren verschiedene Unterformen der Toll-like-Rezeptoren, so erkennt der Toll-like-Rezeptor 4 Lipopolysaccharide, der Toll-like-Rezeptor 9 DNA-Bestandteile wie CpG. Durch Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren kommt es zu einem Anstieg der IDO. Hayashi et al. (Hayashi et al. 2004) zeigten eine Erhöhung der IDO in verschiedenen Geweben nach Gabe eines TLR 9-Liganden.

Auch wurde eine IDO-Induktion bei Virusinfektionen nachgewiesen. Die Aktivität der IDO stieg in Mäusen nach einer Infektion mit Influenza-Viren um das 120-fache an. Der zeitliche Verlauf der IDO deckte sich nicht mit dem zeitlichen Verlauf der Virusreplikation (Taylor und Feng 1991; Yoshida et al. 1979).

Die wichtigsten Zytokine, die die Produktion der IDO erhöhen, sind IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Sie können hierbei synergistisch wirken, TNF $\alpha$  kann aber auch IFN $\gamma$ -unabhängig für eine Induktion der IDO sorgen. IFN $\gamma$  stimuliert die IDO-Produktion über regulatorische Elemente in der Promotorregion der IDO-Gene. Es handelt sich hierbei um ISRE 1 und 2 (IFN-stimulated response elements) und GAS 1 bis 3 (interferon gamma activated sequences). Besonders ISRE 1 und 2 sowie GAS-2 und 3 wird eine Bedeutung bei der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Produktion zugeschrieben. ISRE 1 und 2 werden durch die Bindung von IRF-1 (IFN regulatory factor) und GAS durch die Bindung von Stat1 $\alpha$  (signal transducer and activator of transcription 1 $\alpha$ ) aktiviert (Robinson et al. 2003).

Robinson et al. stellten eine synergistische Wirkung von TNF $\alpha$  auf die dosisabhängige IFN $\gamma$ -induzierte Aktivität von IDO in Zellkultur mit HeLa-Zellen fest. In Real-time-PCR wurde auch die mRNA der IDO analysiert, mit dem Ergebnis, dass auch diese bei zusätzlicher TNF $\alpha$ -Gabe anstieg. Außerdem wurde die Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern untersucht. Dazu wurden ebenfalls HeLa-Zellen verwendet, die mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  oder nur mit einem von beiden Zytokinen inkubiert wurden. Die IRF-1- und die Stat1- Konzentration im Zellkern wurde gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass IFN $\gamma$  alleine sowohl die Konzentration von IRF-1 und Stat1 steigern konnte. Durch die zusätzliche Gabe von TNF $\alpha$  gelang es, die Konzentration von IRF-1 um mehr als das Zweifache und die Konzentration von aktiviertem Stat1 um das Fünffache zu erhöhen. Die Erhöhung des aktivierten Stat1 scheint jedoch einer vermehrten Phosphorylierung und nicht einer erhöhten Transkription zu verdanken zu sein. Auch die Bindung von Stat1 an GAS, beziehungsweise von IRF-1 an die ISREs, wird durch die Costimulation mit TNF $\alpha$  gesteigert. Um den molekularen Mechanismen der synergistischen Wirkung von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  auf die Spur zu kommen, wurde die Expression von IFNGR (IFN $\gamma$ -Rezeptor) auf der Zelloberfläche untersucht. Zellen

wurden mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  oder nur mit einem der beiden Zytokinen inkubiert. Als Ergebnis zeigte sich, dass bei gemeinsamer Inkubation mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ein starker Anstieg des IFNGR zu verzeichnen war, und somit der IFN $\gamma$ -Signalweg verstärkt wird (Robinson et al. 2003).

In einer weiteren Studie bestätigten Robinson et al. die synergistische Aktivierung von IDO durch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  und die Wirkung über ISRE und GAS. Dafür wurde vor allem die Auswirkung von Mutationen im ISRE oder GAS-Gen getestet und dabei eine fehlende Transkription festgestellt (Robinson et al. 2005).

Es wurde aber auch ein IFN $\gamma$ -unabhängiger Signalweg zur Induktion von IDO nachgewiesen. Fujigaki et al. (Fujigaki et al. 2006) untersuchten in Zellkultur mit THP-1-Zellen, einer monozytischen Zelllinie, die Wirkung von LPS und proinflammatorischen Zytokinen auf die IDO-Induktion. IDO wurde durch LPS induziert und unter Anwesenheit einer Kombination von proinflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$ ) kam es zu einer synergistischen Aktivierung von IDO. Weiterhin wurde gezeigt, dass Stat1 und IRF-1, die beiden Transkriptionsfaktoren des IFN $\gamma$ -vermittelten Signalweges, im Signalweg der IDO-Induktion durch LPS keine Rolle spielen, dieser Signalweg also Stat1- und IRF-1-unabhängig ist. Nach einer LPS-Stimulation stieg TNF $\alpha$  signifikant an, mit einem Maximum circa drei Stunden nach Stimulation. IFN $\gamma$  war nicht nachweisbar. Antikörper gegen TNF $\alpha$ , IL-6 und IL1 $\beta$  minderten die IDO-Induktion. Ferner zeigten Fujigaki et al. eine Beteiligung von p38 MAP-Kinase und NF- $\kappa$ B bei der IFN $\gamma$ -unabhängigen Aktivierung von IDO. Antikörper gegen p38 MAP-Kinase und NF- $\kappa$ B inhibierten die Aktivierung von IDO (Fujigaki et al. 2006).

Auch O'Connor et al. wiesen die Rolle von TNF $\alpha$  in der IDO-Aktivierung im Mausversuch nach. Nach Behandlung mit dem Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper Etanercept sank die mRNA der IDO im Gewebe (O'Connor et al. 2009).

Li et al. beschäftigten sich ebenfalls mit der Induktion von IDO durch TNF $\alpha$ . Auch sie zeigten die Induktion von IDO durch TNF $\alpha$  sowie die Minderung der IDO-Produktion durch Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper. Ebenso setzten sie Inhibitoren der p38 MAP-Kinase und des NF- $\kappa$ B ein und fanden eine inhibierte IDO-Expression. So zeigten auch Li et al., dass TNF $\alpha$  die IDO aktiviert, und dass p38 MAP-Kinase und NF- $\kappa$ B dabei eine bedeutende Rolle spielen (Li et al. 2011).

#### **4.1.3.3 IDO Funktionen**

Die IDO zeigt hauptsächlich immunsuppressive Eigenschaften. Diese bestehen zum einen in der Hemmung von Effektor-T-Zellen und zum anderen in der Induktion von regulatorischen T-Zellen. Es stellte sich lange die Frage, ob für diese immunsuppressiven Eigenschaften der

Mangel an Tryptophan durch Abbau durch dieIDO oder die Entstehung von Tryptophan-Metaboliten durch dieIDO verantwortlich ist.

Munn et al. zeigten die Relevanz des GCN2-(general control nonderepressible 2)-Signalwegs in der Proliferationshemmung und Anergie-Induktion von T-Zellen unterIDO-Einfluss. Ein Mangel an Aminosäuren im Stoffwechsel führt zur Zunahme der freien tRNA-Moleküle. Das wiederum aktiviert die GCN2-Kinase. Dadurch wird eine Stressantwort der Zelle eingeleitet, die ISR (integrated stress response), die den Arrest des Zellzyklus, Anergie und sogar die Apoptose einleiten kann (Munn et al. 2005).

Fallarino et al. wiesen nach, dass zytotoxische T-Zellen in Zellkultur mitIDO und DCs die  $\zeta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors weniger exprimieren, was auch mit einem Funktionsverlust der Zellen einhergeht. Nach Ausschalten des GCN2 Signalwegs konnte dieser Effekt nicht mehr hervorgerufen werden. Ebenso konnten Fallarino et al. zeigen, dass durch den Tryptophan-Katabolismus eine Umwandlung von  $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ -Zellen zu  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ -Zellen stattfand. Für diesen Schritt war sowohl TGF $\beta$ , als auch der GCN2-Signalweg notwendig (Fallarino et al. 2006).

Chen et al. (Chen et al. 2008a) zeigten, dassIDO für die Induktion von regulatorischen  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ -T-Zellen durch dendritische Zellen notwendig ist. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) können naive  $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen in regulatorische  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ -T-Zellen umformen. Bei Aktivierung exprimieren diese pDCs beträchtliche Mengen anIDO. Chen et al. untersuchten die Stimulation von pDCs durch TLR9-Liganden und fanden heraus, dass pDCs bei Aktivierung durch TLR9-Liganden ihreIDO-Produktion undIDO-Expression deutlich steigern. Um nachzuweisen, dassIDO in die  $T_{reg}$ -Generierung involviert ist, wurde dieIDO inhibiert. In Zellkultur, mit durch CpG (TLR9-Agonist) aktivierten pDCs und naiven  $CD4^+CD25^-T_{regs}$ , wurde derIDO-Inhibitor 1-methyl-D-Tryptophan zugegeben. Dadurch wurden im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant weniger  $CD4^+CD25^+T_{regs}$  generiert.

Auch die Funktion dieser geringeren Anzahl von  $CD4^+CD25^+T_{regs}$  wurde untersucht. Dazu wurde gemessen, inwieweit die durch pDCs induzierten  $T_{regs}$  die Proliferation von naiven  $CD4^+$ -T-Zellen beeinflussen können. Es zeigte sich, dass durch die Gabe von 1-methyl-D-Tryptophan auch die suppressive Funktion der induzierten  $T_{regs}$  und somit eine Inhibition oder Suppression der Proliferation von naiven  $CD4^+$ -T-Zellen stark eingeschränkt ist. In der Folge wurde bei einem weiteren Versuch gleichen Aufbaus Kynurenin zugegeben. Kynurenin ist der erste bedeutende Metabolit in dem vonIDO katalysierten Abbau von Tryptophan. Die Zugabe von Kynurenin konnte den Effekt desIDO-Antagonisten 1-methyl-D-Tryptophan

umgehen und führte wieder zur Produktion von  $T_{\text{regs}}$  mit normaler suppressiver Funktion (Chen et al. 2008a).

Hwang et al. beschäftigten sich mit dem Zusammenspiel von IDO,  $\text{TNF}\alpha$  und DCs. Kultiviert mit  $\text{TNF}\alpha$  exprimieren DCs viele Oberflächenmoleküle, so CD83, CD86 oder CD40. Bei Hemmung der IDO durch 1-MT (1-methyl-D-Tryptophan) konnte auch die Expression von CD83, CD86 oder CD40 gehemmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass IDO und  $\text{TNF}\alpha$  eine wichtige Rolle für die Aktivierung und chemotaktische Sensibilität der DCs spielen (Hwang et al. 2005).

Auch für die Tumorthherapie ist IDO von steigendem Interesse. Da der IDO immunsuppressive Funktionen nachgewiesen sind, wird vermutet, dass sie auch an der Immunevasion beteiligt ist und somit den Tumor durch Toleranzbildung vor dem Immunsystem schützt. Die Hemmung von IDO könnte somit zu einer effektiveren Therapie beitragen (Popov und Schultze 2008; Wang et al. 2009). Dementsprechende Medikamente werden aktuell in Studien getestet.

IDO verhindert außerdem durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften die Abstoßung des Feten durch den mütterlichen Organismus in der Schwangerschaft (Munn et al. 1998).

#### **4.1.3.4 IDO und Asthma**

Hayashi et al. (Hayashi et al. 2004) untersuchten im Mausmodell die Rolle der IDO bei Asthma. Zuerst zeigten sie, dass die Gabe eines TLR9-Liganden eine Erhöhung der IDO in verschiedenen Geweben zur Folge hat. Weiterhin wurden OVA-sensibilisierte Mäuse mit dem TLR9-Liganden ISS-ODN (synthetic immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide) behandelt, ein Teil der Mäuse zusätzlich mit dem IDO-Inhibitor M-trp (1-methyl-DL-Tryptophan). Für die Behandlung mit ISS-ODN wurde eine Reduktion der asthmatischen Reaktion festgestellt. Die Zahl der eosinophilen Granulozyten sowie die Serumwerte der Zytokine IL-5 und IL-13 sanken, die Hyperreaktivität der Atemwege ging ebenfalls zurück. Diese Effekte konnten durch die Gabe des IDO-Inhibitors M-trp verhindert werden. In einer  $T_{\text{H}2}$ -Zelllinie wurde eine erhöhte Rate an Zelltod durch Gabe von ISS-ODN induziert, während die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sanken. Auch diese Effekte waren reversibel durch die Gabe des IDO-Inhibitors M-trp.

#### **4.1.3.5 IDO und ASIT**

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase spielt eine wichtige Rolle in der Toleranzinduktion bei der allergenspezifischen Immuntherapie. Taher et al. (Taher et al. 2008) stellten den Beitrag der IDO zur allergenspezifischen Immuntherapie mit Hilfe eines Mausmodells zur Immuntherapie dar. Es wurden mit Ovalbumin sensibilisierte und provozierte BALB/c Mäuse verwendet, bei

denen die IDO mit Hilfe des IDO-Inhibitors 1-methyl-DL-Tryptophan blockiert wurde. Die Blockade der IDO während der allergenspezifischen Immuntherapie zeigte keinen Einfluss auf die Hyperreagibilität der Atemwege oder auf die OVA-spezifischen IgE-Antikörper im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe mit allergenspezifischer Immuntherapie und ohne IDO-Blockade. Weiter wurde die Eosinophilie in der bronchoalveolären Lavage und im Lungengewebe gemessen. Durch allergenspezifische Immuntherapie gelang es, die Eosinophilie zu senken, in den Gruppen, bei denen jedoch die IDO blockiert wurde, konnte die Suppression der Eosinophilie nicht aufrechterhalten werden. Auch die  $T_H2$ -Zytokine wurden in der bronchoalveolären Lavage gemessen. IL-3 und IL-13 wurden durch die allergenspezifische Immuntherapie signifikant gesenkt. Durch Blockade der IDO wurde diese Senkung verhindert.

Um herauszufinden, ob die IDO-abhängige Toleranzinduktion durch die Senkung des Tryptophan oder die Produktion von Tryptophanabbauprodukten, wie Kynurenin und seinen Metaboliten zustande kam, wurden weitere Versuche durchgeführt. Die Gabe von Tryptophan während der allergenspezifischen Immuntherapie konnte deren Effizienz nicht mindern. Jedoch die Gabe von Kynurenin und seinen Metaboliten 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure verstärkten die durch die allergenspezifische Immuntherapie hervorgerufene Senkung der Eosinophilie und der  $T_H2$ -Zytokine. Diese Studie zeigt, dass die durch die IDO produzierten Tryptophanmetabolite einen wichtigen Beitrag zur Senkung der Eosinophilie und der  $T_H2$ -Zytokine bei der Induktion der Toleranz unter Immuntherapie leisten (Taher et al. 2008).

#### **4.1.3.6 Zusammenfassung**

Die der Wirkung der ASIT zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig bekannt. Bisher wurde die Reduktion der Entzündung sowie die Verschiebung des  $T_H2$ -Zytokinmilieus in Richtung  $T_H1$ -Zytokinmilieu und die Induktion von allergenspezifischen IgG4-Antikörpern beschrieben. Am wichtigsten scheint jedoch die Aktivierung von  $T_{regs}$  und den zugehörigen Zytokinen IL-10 und TGF $\beta$  zu sein, die für die Hemmung der  $T_{effs}$  und die Induktion der Toleranz unabdinglich sind. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase ist ein potenter Inhibitor der  $T_{effs}$  und ein potenter Aktivator von  $T_{regs}$ . Dadurch kann sie für eine effiziente Toleranzinduktion bei der ASIT wichtig sein. TNF $\alpha$  wiederum ist ein Aktivator der IDO. Unter einer Anti-TNF $\alpha$ -Therapie fehlt die Stimulation der IDO durch TNF $\alpha$  und mag negative Einflüsse auf die Effizienz der ASIT haben.

#### **4.1.4 TNF $\alpha$ und die Antikörperbildung**

Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass ein Mangel an TNF $\alpha$  die Antikörperproduktion negativ beeinflusst und somit einen Einfluss auf die Effektivität der ASIT hat. Dieser Einfluss

wird über das Complement-System vermittelt. Complement-Faktoren werden im Rahmen von Immunantworten sezerniert und spielen eine Rolle bei der Chemotaxis, der Opsonierung und auch über den MAC (Membranangriffskomplex) bei der Zerstörung von Zielzellen (Deetjen und Alzheimer 2005, S. 384–387). Die Quelle der Complement-Faktoren sind zum größten Teil Hepatozyten, aber auch andere Quellen wurden beschrieben. So produzieren neben Monozyten und Makrophagen auch Leukozyten und Fibroblasten Complementfaktoren, vor allem den Faktor C3 (Terui et al. 1997). Auch epidermale Keratinozyten wurden als C3-Produktoren ausfindig gemacht (Basset-Seguín et al. 1990).

#### **4.1.4.1 *TNF $\alpha$ und C3***

Es wurde gezeigt, dass die C3-Produktion in vielen Zellen, so Hepatozyten und Fibroblasten durch TNF $\alpha$  gesteigert wird. Perlmutter et al. untersuchten die Wirkung von TNF $\alpha$  auf die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten. In der Zellkultur konnte nach Inkubation mit TNF $\alpha$  eine konzentrationsabhängige, bis zweieinhalbfache Steigerung des Complement-Faktors C3 hervorgerufen werden. Auch die mRNA für C3 war in den Zellen erhöht (Perlmutter et al. 1986). Katz et al. zeigten die Erhöhung von C3 in dermalen Fibroblasten durch TNF $\alpha$ . Durch eine Inkubation mit TNF $\alpha$  in Zellkultur konnte eine bis zu elffache Erhöhung der C3-Produktion in Fibroblasten nachgewiesen werden (Katz und Strunk 1989). Terui et al. zeigten in einer Keratinozytenzellkultur, dass auch in Keratinozyten die C3-Produktion durch TNF $\alpha$  und auch IFN $\gamma$  erhöht werden kann. Diese Steigerung erfolgte konzentrationsabhängig. Die Wirkung dieser proinflammatorischen Zytokine wird über die Proteinkinase C und Proteintyrosinkinase vermittelt. Weiterhin inkubierten Terui et al. Keratinozyten zuerst mit kleinen Mengen von IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$ , später wurden weitere Mengen des gleichen oder des jeweils anderen Zytokins zugegeben. Die Ergebnisse zeigten eine leichte Steigerung bei der Zugabe des gleichen Zytokins und eine beträchtliche Steigerung bei Gabe des jeweils anderen Zytokins. Daraus kann man auf eine synergistische Wirkweise der beiden Zytokine und auf eine Wirkweise über unterschiedliche Signalwege schließen (Terui et al. 1997).

#### **4.1.4.2 *C3 und die Antikörperproduktion***

Der Complement-Faktor C3 wiederum ist eine wesentliche Voraussetzung für eine effiziente Antikörperbildung beziehungsweise für die humorale Immunantwort. Verschoor et al. erforschten die Rolle von C3 in der Antikörperbildung in HSV1-infizierten chimären Mäusen. Eine HSV1-Infektion kann vor allem bei immuninkompetenten Personen schwere Komplikationen hervorrufen. Diese Komplikationen können durch suffiziente Antikörperbildung verhindert werden (Simmons und Nash 1985; Verschoor et al. 2001). Verschoor et al. infizierten WT- (Wild-Typ) und C3<sup>-/-</sup>-Mäuse (C3 Knock-out Mäuse) mit HSV1 intradermal. Die HSV1-IgG-Titer wurden gemessen. In den WT-Mäusen ließen sich die

klassischen Abläufe einer humoralen Immunantwort zeigen. In C3<sup>-/-</sup>-Mäusen war die primäre und sekundäre IgG-Antwort deutlich gestört. Anschließend wurden C3<sup>-/-</sup>-Mäusen Knochenmarkzellen von WT-Mäusen übertragen und die Mäuse dann mit HSV1 infiziert. Hier war die Antikörperbildung vergleichbar mit chimären WT-Mäusen, denen Knochenmark von WT-Mäusen übertragen wurde. Die Antikörperantworten von C3<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Knochenmarktransplantation und WT-oder C3<sup>-/-</sup>-Mäusen, die mit WT-Knochenmark behandelt wurden, unterschieden sich um das 13-16-fache. Der Beitrag von C3 zur Antikörperbildung wird von Verschoor et al. zusammengefasst: C3 bindet das Antigen und steigert somit die B-Zell-Antwort. Über den B-Zell-Corezeptor CD21/CD19/CD81 senken die C3/Antigen-Komplexe die Aktivierungsschwelle der B-Zellen. Außerdem wird das Überleben der aktiven B-Zellen gefördert. Weiterhin ist die complementvermittelte Bindung von Antigenen auf folliculäre dendritische Zellen von großer Bedeutung. Dadurch wird die lokale Konzentration des Antigens gesteigert und erleichtert so eine B-Zell-Antwort (Verschoor et al. 2001).

Ferner fanden Verschoor et al. heraus, dass, bei fehlender Produktion von C3 durch myeloide Zellen, die Aktivierung naiver B-Zellen gemindert ist. Bei Abwesenheit von myeloidem C3 sind außerdem die Areale der folliculären dendritischen Zellen in den Follikeln der peripheren Lymphknoten und die Zahl der folliculären dendritischen Zellen deutlich kleiner (Verschoor et al. 2003).

Für eine suffiziente Antikörperbildung ist also der klassische Complementweg und die kovalente Bindung an Antigene notwendig.

#### **4.1.4.3 Zusammenfassung**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TNF $\alpha$  in vielen Zellen die Produktion von C3 steigert. C3 wiederum ist essentiell für eine suffiziente Antikörperbildung. Eine Blockade von TNF $\alpha$  würde demnach über eine verminderte C3-Produktion zu einer insuffizienten Antikörperproduktion führen. Da in der allergenspezifischen Immuntherapie regelmäßig Anstiege von antigenspezifischen IgG-Antikörpern zu beobachten sind, wäre eine durch das Fehlen von TNF $\alpha$  gestörte Antikörperantwort eine mögliche Erklärung für das Misslingen der ASIT unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie.

#### **4.1.5 TNF $\alpha$ und T<sub>regs</sub>**

Eine weitere Erklärung für den Einfluss von TNF $\alpha$  auf die ASIT kann das Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung von TNF $\alpha$  und T<sub>regs</sub> sein. Die Aktivierung und Proliferation von T<sub>regs</sub> ist eine der molekularen Veränderungen, die bei einer erfolgreichen ASIT zu verzeichnen sind. Diese Beeinflussung von TNF $\alpha$  und T<sub>regs</sub> wird in der Literatur gegenwärtig kontrovers diskutiert.

Valencia et al. und Nagar et al. fanden eine hemmende Wirkung von TNF $\alpha$  auf T<sub>regs</sub>.

Valencia et al. inkubierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>-Zellen mit TNF $\alpha$  und untersuchten ihre suppressive Funktion. Sowohl die Zugabe von TNF $\alpha$  als auch eines agonistischen TNF $\alpha$ -Antikörpers führte zu einer fehlenden Proliferationshemmung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen. Diese Effekte waren konzentrationsabhängig. Außerdem wurde gezeigt, dass durch den Einfluss von TNF $\alpha$  sowohl die mRNA des FoxP3 als auch FoxP3 selbst sank. Durch Gabe des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers Infliximab konnte die Expression von FoxP3 wieder gesteigert werden und die suppressive Funktion der Zellen wiederhergestellt werden (Valencia et al. 2006).

Chen et al. (Chen und Oppenheim 2010) schrieben die verminderte Suppression der T<sub>effs</sub> eher einer Stimulation der T<sub>effs</sub> durch TNF $\alpha$  zu. Eine Aktivierung der T<sub>regs</sub> tritt erst unter längerer Exposition mit TNF $\alpha$  auf. Bei chronischen Entzündungen würde die höhere Expression von TNFR2 durch T<sub>regs</sub> im Vergleich mit T<sub>effs</sub> dafür sorgen, dass TNF $\alpha$  vermehrt Einfluss auf T<sub>regs</sub> hat. Chen et al. vermuten auch eine Beeinflussung der Wirkung von TNF $\alpha$  durch Zeit, Ort, Zytokinmilieu, Quelle des TNF $\alpha$  und Rezeptorzustand. Außerdem sei die Isolierung und Differenzierung der T<sub>regs</sub> in den verschiedenen Studien nicht identisch gewesen. Dadurch ließen sich die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien erklären (Chen und Oppenheim 2010; Chen et al. 2007).

Nagar et al. zeigten in ihrer Studie, dass durch TNF $\alpha$  der NF- $\kappa$ B-Signalweg vor allem in T<sub>regs</sub> induziert wurde. Ferner zeigten sie, dass durch Stimulation mit TNF $\alpha$  die Oberflächenmoleküle 4-1BB und OX40 um mehr als das Dreifache stiegen, durch Gabe eines Anti-TNFR2-Antikörpers wurde diese Expression wieder gesenkt. Auch untersuchten sie die Wirkung von TNF $\alpha$  auf T<sub>regs</sub>. In einer Cokultur von CD25<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup>-T-Zellen wurde zusätzlich TNF $\alpha$ , der Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper Infliximab oder beides zugesetzt. Die Proliferation der CD25<sup>+</sup>-Zellen wurde gemessen. Mit Hilfe von ELISA wurde auch die Funktion der T<sub>regs</sub> untersucht, die IFN $\gamma$ -Produktion der CD25<sup>-</sup>-Zellen zu inhibieren. Das Ergebnis zeigte, dass TNF $\alpha$  die Suppression durch T<sub>regs</sub> inhibierte, während unter Infliximab die Suppression völlig wiederhergestellt wurde (Nagar et al. 2010).

Chen et al. (Hamano et al. 2011) merkten zu dieser Studie an, dass man die Ergebnisse von Nagar et al. statt einer Funktionsminderung der T<sub>regs</sub> auch als Funktionssteigerung der T<sub>effs</sub> auf TCR-Stimulation oder TNFR2-Costimulation der T<sub>effs</sub> werten kann (Hamano et al. 2011; Chen et al. 2010). Auch sprechen sie die Möglichkeit an, dass Unterschiede in den Studien, bezüglich zum Beispiel Spezies, Methodik und vor allem Zeitrahmen für die widersprüchlichen Daten verantwortlich sein können (Hamano et al. 2011).

Biton et al. untersuchten in vivo in TNF $\alpha$  transgenic (TTg) Mäusen die Beeinflussung von TNF $\alpha$  und T<sub>regs</sub>. Sie zeigten, dass durch Behandlung mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper sowohl die Anzahl als auch die Funktion der T<sub>regs</sub> zunahm (Biton et al. 2011).

Chen und Oppenheim wandten in ihrem Kommentar zu diesem Artikel ein, dass humaner TNF $\alpha$  nicht den murinen TNFR2 binden könne und somit das oben genannte Mausmodell, das auf Überexpression von humanem TNF $\alpha$  beruht, die Wirkung von TNF $\alpha$  auf T<sub>regs</sub> nicht darstellen könne. Außerdem sei die Auswahl der T<sub>regs</sub> nicht ausreichend gewesen. Biton et al. hätten nur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen als T<sub>regs</sub> gewertet und isoliert und keine weiteren Marker zur besseren Differenzierung herangezogen (Chen und Oppenheim 2011a).

Im Gegensatz dazu zeigt der überwiegende Teil der aktuellen Literatur jedoch, dass TNF $\alpha$  eine stimulierende Wirkung auf T<sub>regs</sub> hat und somit neben seinen mannigfachen proinflammatorischen Eigenschaften auch immunsuppressiv wirkt. 2005 fanden Sterns et al. heraus, dass bei TNF/TNFR-defizienten Mäusen die sepsisinduzierte Immunsuppression ausblieb (Sterns et al. 2005). Verschiedene Autoren beschrieben eine verstärkt ausgeprägte Entzündung in TNF $\alpha$ -defizienten Mäusen (Chen et al. 2007).

Chen et al. untersuchten die Wirkung von TNF $\alpha$  auf T<sub>regs</sub> und T<sub>effs</sub> in Abhängigkeit von Zeit und Dosis.

Zuerst wurde die Verteilung der TNF-Rezeptoren auf Immunzellen untersucht. TNFR1, der über eine Todesdomäne verfügt, konnte nur in geringen Mengen auf T-Zellen nachgewiesen werden. TNFR2, welcher besonders die Zellproliferation und das Zellüberleben vermittelt, konnte auf CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Maussplenozyten in recht hohen Mengen nachgewiesen werden. Durch Aktivierung der T-Zellen über TCR-Stimulation konnte diese Expression noch gesteigert werden. Die Expression von TNFR2 war auf T<sub>regs</sub> mit 32% deutlich höher als auf T<sub>effs</sub> mit 8%. Splenozyten von TNFR2-defizienten Mäusen zeichneten sich durch eine geringere Proliferationsrate aus (Chen et al. 2007).

Weiterhin untersuchten Chen et al. den Effekt von TNF $\alpha$  auf T<sub>effs</sub> und T<sub>regs</sub> in Kokultur in Abhängigkeit von der Zeit. Bei einer relativ kurzen Expositionszeit (48h) gegenüber TNF $\alpha$  (0.5-10 ng/ml) war eine gesteigerte Proliferationsrate der T<sub>effs</sub> zu vermerken und eine Reduktion der Inhibition der T<sub>effs</sub> durch T<sub>regs</sub>. Bei einer längeren Exposition von TNF $\alpha$  (72h) konnte die inhibitorische Wirkung durch T<sub>regs</sub> auf T<sub>effs</sub> wieder nachgewiesen werden. Auch die Anergie der T<sub>regs</sub> auf TCR-Stimulation wurde durch TNF $\alpha$  überwunden. In Zellkultur wurde ebenfalls der Effekt von TNF $\alpha$  auf die Expression von CD25 und FoxP3 gemessen. Die Exposition von T<sub>regs</sub> gegenüber TNF $\alpha$  zeigte im Vergleich zu Medium eine erhöhte FoxP3 Expression und eine erhöhte immunsuppressive Funktion der T<sub>regs</sub> (Chen et al. 2007).

Außerdem wirkt TNF $\alpha$  synergistisch mit IL-2 auf T<sub>regs</sub>. Dieser Effekt ist zeit- und dosisabhängig. IL-2 steigerte den Anteil der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>T-Zellpopulation um das Zweifache. Durch Zugabe von TNF $\alpha$  stieg der Anteil der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen um das Vierfache. Auch die Expression von CD25 stieg an. Im Gegensatz dazu

konnte keine Proliferationssteigerung von  $T_{\text{effs}}$  durch IL-2 und/oder TNF $\alpha$  verzeichnet werden. Auch die durch IL-2 induzierte Aktivierung von Stat5 wurde durch TNF $\alpha$  gesteigert. Die inhibitorische Funktion der  $T_{\text{regs}}$  wurde ebenfalls in Cokultur untersucht. IL-2 konnte die immunsuppressive Funktion der  $T_{\text{regs}}$  deutlich erhöhen. Durch Zugabe von TNF $\alpha$  wurde die Funktion der  $T_{\text{regs}}$  nochmals signifikant gesteigert (Chen et al. 2007).

Ferner wurden auch die  $T_{\text{regs}}$  in TNFR2-defizienten Mäusen untersucht. Zunächst waren in diesen Mäusen die Funktion und die Anzahl der  $T_{\text{regs}}$  normal. Durch CLP (Cecal ligation and puncture) wurde eine Sepsis induziert. In WT-Mäusen stieg die Anzahl der  $T_{\text{regs}}$ , was auf eine postseptische Immunsuppression hinweist. In den TNFR2-defizienten Mäusen jedoch war kein nennenswerter Anstieg der  $T_{\text{regs}}$  zu finden (Chen et al. 2007).

Diese Studie legt also den Schluss nahe, dass TNF $\alpha$  zu Beginn einer Entzündung proinflammatorische Wirkungen hat, aber in späteren Entzündungsphasen immunsuppressiv wirkt. Diese These wird unterstützt durch Beispiele aus der Literatur, in denen zum Beispiel Mäuse auf ein Pathogen schnell mit Entzündung und Hepatosplenomegalie reagieren, während TNF $^{-/-}$ -Mäuse anfangs nur eine schwache Reaktion zeigten und später schwere, nicht begrenzte Entzündungsreaktionen aufwiesen (Marino et al. 1997).

Die Bedeutung und genaue Funktion der TNFR2-exprimierenden  $T_{\text{regs}}$  zeigten Chen et al. TNFR2 wird zumeist von  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen exprimiert, aber auch  $CD4^+CD25^-$ -Zellen können (seltener) TNFR2 exprimieren. Unter den  $CD4^+$ Splenozyten finden sich 3,6%  $CD25^+TNFR2^+$ -Zellen, 6,1%  $CD25^+TNFR2^-$ -Zellen und 2,8%  $CD25^-TNFR2^+$ -Zellen. Vor allem aktivierte und Memory- $T_{\text{regs}}$  exprimieren TNFR2, naive  $T_{\text{regs}}$  sind meist TNFR2-negativ. Hier ist TNFR2 ein wesentlich besserer Marker zur Unterscheidung der Funktion der  $T_{\text{regs}}$  als CD25. Auch die FoxP3-Expression ist in  $CD4^+CD25^+TNFR2^+$ -Zellen höher als in  $CD4^+CD25^+TNFR2^-$ -Zellen. Unter den  $CD4^+CD25^-TNFR2^-$ -Zellen waren 1% FoxP3 $^+$ , von den  $CD4^+CD25^-TNFR2^+$ -Zellen waren es 25-40%. Bei C57BL/6 Mäusen waren 80% der  $CD8^+CD4^+CD25^+$ -Zellen im Thymus TNFR2-positiv. In den sekundären lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten, Milz und Peyer-Plaques, exprimierten 30-40% der Zellen TNFR2 $^+$ , im peripheren Blut unter 10% (Chen et al. 2008b).

In Cokultur wurde die suppressive Funktion der verschiedenen Untergruppen von  $T_{\text{regs}}$  untersucht.  $CD4^+CD25^+TNFR2^+$ -Zellen zeigten sich als sehr potente Suppressoren und konnten die Replikation von  $T_{\text{effs}}$  hemmen. Allerdings zeigten die  $CD4^+CD25^+TNFR2^-$ -Zellen, die immerhin 60% der  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ -Zellen ausmachen, nur eine geringe suppressive Funktion. Jedoch die eigentlich nicht zu den  $T_{\text{regs}}$  zählenden  $CD4^+CD25^-TNFR2^+$ -Zellen wirkten suppressiver als  $CD4^+CD25^+TNFR2^-$ -Zellen. Auch in BALB/c Mäusen war die suppressive Funktion der TNFR2 $^+$ -Zellen bis auf das Zehnfache höher als die der TNFR2 $^-$ -

Zellen. Es zeigte sich, dass TNFR2 ein besserer Marker für die suppressive Funktion der  $T_{\text{regs}}$  ist als CD103 oder CD25. Zudem wird TNFR2 nicht nur auf murinen  $T_{\text{regs}}$ , sondern auch auf humanen  $T_{\text{regs}}$  exprimiert. CTLA-4 korreliert gut mit TNFR2, da über 80% der TNFR2<sup>+</sup>-Zellen auch CTLA-4 exprimieren (Chen et al. 2008b). Die beste Selektion der suppressivsten  $T_{\text{regs}}$  erreicht man durch eine Kombination der Oberflächenmarker TNFR2 und FoxP3 oder TNFR2 und CD25 (Chen und Oppenheim 2011b).

Es wurden auch in vivo Versuche zur Wirkung von TNF $\alpha$  auf  $T_{\text{regs}}$  durchgeführt. Wu et al. untersuchten die Wirkung von intraperitoneal verabreichtem TNF $\alpha$  auf  $T_{\text{regs}}$ . Bei neugeborenen NOD Mäusen zeigt sich eine Reduktion der Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in der Milz. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in der Milz bei jungen, erwachsenen Mäusen an. Dieser Unterschied wurde dadurch erklärt, dass  $T_{\text{regs}}$  in neugeborenen Mäusen noch nicht ihre volle Funktion und Verteilung im Körper aufgenommen haben. So werden vor allem  $T_{\text{effs}}$  durch TNF $\alpha$  aktiviert. In erwachsenen Mäusen sind die  $T_{\text{regs}}$  dann schon voll funktionsfähig, und werden durch die höhere Expression von TNFR2 durch TNF $\alpha$  stärker aktiviert als  $T_{\text{effs}}$  (Chen und Oppenheim 2010; Wu et al. 2002).

Chen et al. (Chen und Oppenheim 2010) zeigten in ihren Studien, dass Pertussistoxin in Mäusen die Anzahl der  $T_{\text{regs}}$  und die TGF $\beta$ -induzierte FoxP3 Expression minderte. In IL-6<sup>-/-</sup>-Mäusen jedoch war eine gegenteilige Beobachtung zu machen. Dafür mussten also andere Zytokine als IL-6 verantwortlich sein. Den Autoren gelang es, TNF $\alpha$  als dieses andere Zytokin zu identifizieren (Chen und Oppenheim 2010).

Hamano et al. untersuchten die Wirkung von TNF $\alpha$  auf die Expression von TNFR2 auf der Zelloberfläche von  $T_{\text{regs}}$ .  $T_{\text{regs}}$ , die mit TNF $\alpha$ /IL-2 für zwölf Stunden behandelt wurden, regulierten ihre Genexpression nach oben. Die davon betroffenen Gene waren unter anderem Gene, die für Moleküle der TNFR-Superfamilie codieren, so TNFR2, OX40, Fas, 4-1BB und GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein). Diese wurden um mehr als das Zweifache hochreguliert. Über PCR wurde die mRNA gemessen. Diese mRNA der Mitglieder der TNFR Superfamilie wurde im Vergleich zu unstimulierten  $T_{\text{regs}}$  durch die Inkubation mit IL-2 und TNF $\alpha$  um mehr als das Vierfache gesteigert. Folglich änderte sich auch die Oberflächenexpression dieser Moleküle. TNFR2 wurde um mehr als das Zweifache hochreguliert, diese Hochregulierung war von der Dosis des TNF $\alpha$  abhängig. Die Expression von OX40 wurde ebenfalls um mehr als das Zweifache gesteigert und die Expression von 4-1BB um das über Sechsfache im Vergleich mit unstimulierten  $T_{\text{regs}}$ . Da eine Zugabe von IL-2 und TNF $\alpha$  auch zu einer vermehrten Expression der Aktivierungsmarker CD44 und CD69 auf  $T_{\text{regs}}$  führt, kann man auf eine Aktivierung von  $T_{\text{regs}}$  durch die genannten Zytokine

schließen. Die Expression der Oberflächenmoleküle der TNFR-Superfamilie änderte sich also durch Stimulation mit TNF $\alpha$  und IL-2 (Hamano et al. 2011).

Die Vermutung, dass TNF $\alpha$  TNFR2<sup>-</sup> in TNFR2<sup>+</sup>-Zellen verändern könnte, wurde ebenfalls von Hamano et al. überprüft. TNFR2<sup>-</sup>-Zellen wurden also mit IL-2 und TNF $\alpha$  behandelt. IL-2 alleine rief bereits eine Expression von TNFR2 hervor, TNF $\alpha$  bewirkte aber noch eine weit höhere Expression (Hamano et al. 2011).

Um die IL-2 unabhängige Wirkung von TNF $\alpha$  auf T<sub>regs</sub> zu testen, kultivierten Hamano et al. die T<sub>regs</sub> mit einer Zytokinkombination aus TNF $\alpha$  und IL-7. Mit Hilfe von Anti-IL-2-Antikörpern wurde sichergestellt, dass die Ergebnisse des Versuchs nicht über IL-2 vermittelt werden und somit IL-2 unabhängig sind. Mit alleiniger Stimulation durch IL-7 proliferierten nur 6% der T<sub>regs</sub>. Bei zusätzlicher Gabe von TNF $\alpha$  kam es zu 37,8% Proliferation bei FoxP3<sup>+</sup>-Zellen. Bei den FoxP3<sup>-</sup>-Zellen waren es 10,8%. Also stimuliert TNF $\alpha$  besonders T<sub>regs</sub>. TNF $\alpha$  in Verbindung mit IL-7 bewirkte eine dosisabhängige Steigerung der FoxP3-Expression und der TNFR2-Expression und trug so zu einer Aktivierung der T<sub>regs</sub> bei. Eine Erhöhung der TNFR2-Expression konnte auch durch eine alleinige Stimulation durch TNF $\alpha$  über 24 Stunden ausgelöst werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass TNF $\alpha$  in Zusammenspiel mit IL-15 ebenfalls T<sub>regs</sub> aktiviert (Hamano et al. 2011).

Die Bedeutung der Oberflächenmoleküle 4-1BB und OX40 wurde ebenfalls getestet. Durch Gabe von agonistischen Antikörpern gegen 4-1BB und OX40 wurde der anerge Status der T<sub>regs</sub> überwunden und die Proliferation induziert. Diese Antikörper wirken auch synergistisch in Kombination mit TNF $\alpha$  auf die Proliferation von T<sub>regs</sub> (Hamano et al. 2011).

In einem in vivo Versuch untersuchten die Autoren die Wirkung von LPS auf T<sub>regs</sub> und die Vermittlung über TNF $\alpha$ . Durch in vivo Injektion von LPS kam es zu einer zwei- bis dreifachen Steigerung der FoxP3<sup>+</sup>-Zellen. Die Oberflächenmoleküle TNFR2, 4-1BB und OX40 stiegen ebenfalls an. Bei Injektion eines Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers vor LPS-Gabe wurde die Expansion sowie die Expression der Oberflächenmoleküle heruntergeregelt (Hamano et al. 2011).

Da die Expression von TNFR2 auch auf CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>-Zellen nachgewiesen wurde, untersuchten Chen et al. (Chen et al. 2010) die Eigenschaften dieser Zellen und ihre Reaktion auf Stimulation durch TNF $\alpha$ . Es zeigte sich, dass diese Zellen bei hoher TNFR2-Expression resistenter gegenüber der Suppression durch T<sub>regs</sub> sind als Zellen mit fehlender oder geringerer TNFR2-Expression. Weiterhin wurden CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> Tumorzellen verwendet und ihre Resistenz gegenüber T<sub>regs</sub> getestet. Diesen Tumorzellen gelang es, der Suppression durch T<sub>regs</sub>, die aus Lymphknoten entnommen waren, zu entkommen. Wurden jedoch T<sub>regs</sub> aus Tumorgewebe entnommen, die wesentlich höhere Raten an TNFR2 exprimierten, konnten diese die CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>-Zellen hemmen. Dies zeigt also, dass TNF $\alpha$  bei CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>-

Zellen Resistenz gegenüber der Suppression der  $T_{\text{regs}}$  erzeugt, die durch eine ausreichend hohe Expression von TNFR2 auf  $T_{\text{regs}}$  wieder überwunden werden kann. Also ist die Stärke der TNFR2-Expression bei  $T_{\text{regs}}$  entscheidend für ihre suppressive Funktion (Chen et al. 2010).

Allgemeine Hinweise auf die immunsuppressive Wirkung von TNF $\alpha$  im klinischen Bereich liefern die Studien von Jakob et al. Wiederholte Injektionen von TNF $\alpha$  verhinderten die Entwicklung von Lupusnephritis und von Typ1 Diabetes bei NOD Mäusen (Jacob et al. 1990; Jacob und McDevitt 1988).

Auch die Anti-TNF $\alpha$ -Therapie, die beispielsweise bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sehr etabliert ist und für die meisten Patienten gute Therapieergebnisse zeigt, kann bei einigen Patienten auch negative Auswirkungen haben. Kollias et al. berichteten über die Entwicklung von Lupus und neuroinflammatorischen Erkrankungen unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie. Bei Patienten mit MS kam es zur Exazerbation ihrer Erkrankung (Kollias et al. 2002).

Chen et al. sahen die Wirkung der Anti-TNF $\alpha$ -Therapie hauptsächlich in der Verminderung der Costimulation der  $T_{\text{effs}}$  über TNFR2. Außerdem vermuteten sie einen Beitrag zum Therapieerfolg der Anti-TNF $\alpha$ -Therapie bei einer Komplexbildung zwischen TNF $\alpha$  und seinem Antikörper. Diese Komplexe könnten die biologische Aktivität des TNF $\alpha$  steigern und somit über TNFR2 zu einer erhöhten Aktivierung von  $T_{\text{regs}}$  führen (Chen und Oppenheim 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genaue Wirkung von TNF $\alpha$  auf  $T_{\text{regs}}$  immer noch nicht vollständig bekannt ist. Auch wenn einige Studien zeigten, dass TNF $\alpha$  die Funktion von  $T_{\text{regs}}$  nicht steigert oder sogar mindert, zeigten zahlreiche andere Studien eine Stimulation von  $T_{\text{regs}}$  durch TNF $\alpha$  und somit eine immunsuppressive Wirkung. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich durch verschiedenen Studienaufbau, verschiedene Zeitabläufe und Differenzierungskriterien erklären. So wurde zum Beispiel die Isolierung von  $T_{\text{regs}}$  in verschiedenen Studien von Chen et al. kritisiert. Die Isolierung nach CD25 reiche nicht aus, da CD25 auch durch aktivierte  $CD4^+$   $T_{\text{effs}}$  exprimiert werden kann (Chen und Oppenheim 2010). Die in den verschiedenen Studien gezeigte aktivierende Wirkung von TNF $\alpha$  auf  $T_{\text{regs}}$  mag einer der Gründe für eine unter TNF $\alpha$ -Blockade nicht so wirksame ASIT sein.

## 5 Zusammenfassung

In einem Tierversuch mit C57BL/6-Mäusen wurde mit Hilfe eines Modells der allergenspezifischen Immuntherapie die Rolle von TNF $\alpha$  in der allergenspezifischen Immuntherapie untersucht. Die Mäuse wurden an insgesamt vier Tagen mit OVA sensibilisiert, an insgesamt drei Tagen mit OVA immuntherapiert und ebenfalls an drei Tagen mit OVA provoziert. Ein Teil der Mäuse erhielt jeweils vor allergenspezifischer Immuntherapie und vor Provokation einen Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper intraperitoneal gespritzt. Am Ende des Versuchsprotokolls wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. In der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellen anschließend unter dem Lichtmikroskop differenziert. Im Überstand der bronchoalveolären Lavage wurden mit Hilfe des ELISA die Zytokinspiegel gemessen. Die Lungen selbst wurden histologisch untersucht. Im Serum wurden die OVA-spezifischen IgG1- und IgE-Antikörper, sowie die Gesamt-IgE-Antikörper bestimmt.

Im ersten Versuch zeigten sich deutliche Tendenzen, dass die Blockade von TNF $\alpha$  die Effizienz der ASIT mindert. Die Gesamtzellzahl im Vergleich mit nur sensibilisierten Tieren sank nach ASIT in den mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Tieren nicht so stark wie in den Tieren mit ASIT ohne Antikörperbehandlung. Bei der Beurteilung der eosinophilen Granulozyten und Makrophagen lagen die prozentualen Werte der jeweiligen Zellen in der Gruppe der mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Tiere nach ASIT zwischen denen der nur sensibilisierten Tiere und der Tiere mit ASIT ohne Antikörper: die eosinophilen Granulozyten konnten durch ASIT nicht so stark gesenkt werden, der prozentuale Anteil der Makrophagen stieg nicht so deutlich an. Bei den Zytokinen konnte man durch ASIT, wie erwartet, eine Verschiebung der T<sub>H</sub>2- zu T<sub>H</sub>1-Zytokinen verzeichnen. Jedoch konnte diese Verschiebung in der mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppe nach ASIT nicht in dem Maß erreicht werden, wie in der Gruppe mit ASIT ohne Antikörperbehandlung. IL-10, als immunsuppressives Zytokin, das für das Gelingen der ASIT eine wichtige Rolle spielt, war in der Gruppe der Tiere nach ASIT und Anti-TNF $\alpha$ -Antikörperbehandlung deutlich niedriger als in der Gruppe nach ASIT und ohne Antikörperbehandlung. Die Antikörper der Klasse IgG1 (vergleichbar beim Menschen der Antikörperklasse IgG4) zeigen den deutlichsten Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Anti-TNF $\alpha$ -Antikörperbehandlung nach ASIT: in der Gruppe ohne Antikörper stieg der Mittelwert der IgG1-Antikörper nach ASIT rasant an um danach wieder etwas abzufallen, während in der Gruppe mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörperbehandlung der Anstieg der IgG1-Antikörper nach ASIT nur mäßig war. Das Gesamt-IgE in der Gruppe ohne Anti-TNF $\alpha$ -Antikörperbehandlung stieg nach ASIT klar an, danach fiel es deutlich ab. In der Gruppe mit Antikörperbehandlung war der Anstieg und

Abfall der Antikörper nach ASIT sehr viel weniger steil. Diese in sich stimmigen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die ASIT unter TNF $\alpha$ -Blockade weniger effektiv ist.

In den folgenden zwei Versuchen konnte diese Tendenz nicht mehr nachgewiesen werden. Als Grund hierfür liegt eine unzureichende Blockade des TNF $\alpha$  durch den Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper nahe. Im Versuch 1 findet sich, wie erwartet, in den mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppen ein niedrigerer TNF $\alpha$ -Spiegel als in den Vergleichsgruppen. In der Gruppe ohne Antikörperbehandlung nach ASIT ist der TNF $\alpha$ -Spiegel am höchsten, was den Schluss zulässt, dass bei einer erfolgreichen ASIT TNF $\alpha$  benötigt wird. In den folgenden Versuchen überraschte zum einen ein deutlich höherer TNF $\alpha$ -Spiegel vor allem in den Kontrollgruppen als bei Versuch 1, zum anderen waren die Werte in den mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelten Gruppen gleich oder sogar deutlich höher als in den Vergleichsgruppen ohne TNF $\alpha$ -Blockade.

Daraus kann man schlussfolgern, dass der Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper seine Funktion nicht (ausreichend) erfüllt hat. Die anschließenden Funktionsprüfungen konnten keinen Funktionsverlust des Antikörpers nachweisen. Eine mögliche Erklärung wäre eine mangelhafte Verteilung des Antikörpers und somit eine unzureichende Wirkung, eine Verunreinigung des Antikörpers oder aber eine andere endogene Störvariable. Die unverhältnismäßig hohen TNF $\alpha$ -Spiegel vor allem in den Kontrollgruppen könnten auch auf eine exogene Stimulation des Immunsystems hinweisen. Hierbei ist besonders die mögliche Kontamination von zu Sensibilisierungszwecken verwendetem Ovalbumin durch LPS zu erwähnen.

Die Annahme, dass das Fehlen von TNF $\alpha$  die Effizienz einer allergenspezifischen Immuntherapie beeinträchtigt, ist nach momentanem Forschungsstand recht plausibel.

Durch Fehlen von TNF $\alpha$  wird die Mikroarchitektur in lymphatischen Organen gestört, was auch funktionelle Folgen hat. TNF $\alpha$  hat wichtige immunmodulatorische Eigenschaften. Des Weiteren ist TNF $\alpha$  ein Zytokin, welches eine große Rolle in der T<sub>H</sub>1-gewichteten Immunantwort spielt. Folglich verschiebt das Blockieren von TNF $\alpha$  das Zytokingleichgewicht eher in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort und wirkt daher allergiefördernd.

TNF $\alpha$  aktiviert einige immunsuppressiv wirkende Moleküle. So zum Beispiel das TSG-6-Protein, das antiinflammatorisch wirkt, die Zellmigration mindert, proinflammatorische Signalwege hemmt und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen senkt.

TNF $\alpha$  induziert ebenfalls TGF $\beta$ , ein Zytokin, das eine große Rolle in der Immunsuppression spielt. Es wird von T<sub>regs</sub> gebildet, vor allem von T<sub>H</sub>3-Zellen, und aktiviert gemeinsam mit IL-10 weitere regulatorische T-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass TNF $\alpha$  auch die Produktion des Complementfaktors C3 steigert. Der Complementfaktor C3 wiederum wird für eine suffiziente Antikörperbildung benötigt. Da in der ASIT regelmäßig Anstiege von antigenspezifischen IgG-Antikörpern zu beobachten sind, kann TNF $\alpha$  so einen Einfluss auf die Effizienz der ASIT haben.

TNF $\alpha$  wirkt ebenfalls als Aktivator der IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase). IDO hemmt Effektor-T-Zellen und induziert regulatorische T-Zellen. IDO aktiviert T<sub>regs</sub>, steigert ihre chemotaktische Sensibilität und kann sogar CD25<sup>-</sup>-T-Zellen in CD25<sup>+</sup>-T-Zellen überführen. Eine Studie zeigte eine Reduktion der allergischen Asthmareaktion durch Induktion von IDO. Eine weitere Studie untersuchte die Rolle von IDO bei der ASIT. Für eine effiziente ASIT war die Präsenz von IDO nötig, da unter Blockade von IDO die Eosinophilie und die T<sub>H</sub>2-Zytokine nicht gesenkt werden konnten.

Eine weitere Erklärung für den Einfluss von TNF $\alpha$  auf die ASIT kann das Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung von TNF $\alpha$  und T<sub>regs</sub> sein. Es wurde gezeigt, dass TNF $\alpha$  neben seinen mannigfachen proinflammatorischen Eigenschaften auch immunsuppressiv wirken kann. Bei TNF/TNFR defizienten Mäusen blieb die sepsisinduzierte Immunsuppression aus. Nach längerer Expositionszeit mit TNF $\alpha$  konnte eine erhöhte suppressive Funktion der T<sub>regs</sub> nachgewiesen werden, außerdem konnte durch TNF $\alpha$  der anerge Status der T<sub>regs</sub> überwunden werden. Ebenso verstärkte TNF $\alpha$  die Expression von FoxP3, einem Marker der T<sub>regs</sub>. TNF $\alpha$  steigerte weiterhin die Transkription und Oberflächenexpression von Mitgliedern der TNFR-Superfamilie, darunter TNFR2, 4-1BB und OX40. Durch Gabe von Agonisten von 4-1BB und OX40 konnte die Proliferation der T<sub>regs</sub> gesteigert und die Anergie überwunden werden.

TNF $\alpha$  hat somit immunregulatorische und immunsuppressive Eigenschaften. Außerdem wird es indirekt für eine suffiziente Antikörperbildung benötigt.

Kennzeichnend für eine effiziente allergenspezifische Immuntherapie ist die Induktion von Toleranz durch Immunsuppression. Daran beteiligt sind neben vielen weiteren Molekülen IL-10, TGF $\beta$  und vor allem regulatorische T-Zellen. Außerdem zeigt sich eine vermehrte Antikörperproduktion der Antikörperklasse IgG4. Somit scheint TNF $\alpha$  durch seine Wirkungsweise die molekularen Veränderungen bei ASIT zu unterstützen. Folglich ist bei einer Blockade von TNF $\alpha$  eine Störung der Wirkungsweise der ASIT denkbar.

Um die Rolle von TNF $\alpha$  in der allergenspezifischen Immuntherapie und seine exakte Wirkungsweise noch genauer zu erschließen, sind sicherlich weitere Studien notwendig.

Eine sichere Blockade von TNF $\alpha$  müsste dabei sichergestellt werden. Versuche mit einem anderen Modell sollten in Betracht gezogen werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

Akdis, CezmiA; Akdis, Mubeccel (2011): Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. In: *J Allergy Clin Immunol* 127 (1), S. 18-27; quiz 28-9. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.11.030.

Akdis, CezmiA; Jutel, Marek; Akdis, Mubeccel (2008): Regulatory effects of histamine and histamine receptor expression in human allergic immune responses. In: *Chem Immunol Allergy* 94, S. 67–82. DOI: 10.1159/000154858.

Akdis, Mubeccel; Akdis, CezmiA (2007): Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. In: *J Allergy Clin Immunol* 119 (4), S. 780–791. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.01.022.

Akkoc, Tunc; Akdis, Mubeccel; Akdis, CezmiA (2011): Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. In: *Allergy Asthma Immunol Res* 3 (1), S. 11–20. DOI: 10.4168/aaair.2011.3.1.11.

Asher, A.; Mule, J. J.; Reichert, C. M.; Shiloni, E.; Rosenberg, S. A. (1987): Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. In: *J Immunol* 138 (3), S. 963–974.

Balkwill, F. R. (1989): Tumour necrosis factor. In: *Br Med Bull* 45 (2), S. 389–400.

Basset-Seguin, N.; Caughman, S. W.; Yancey, K. B. (1990): A-431 cells and human keratinocytes synthesize and secrete the third component of complement. In: *J Invest Dermatol* 95 (6), S. 621–625.

Behrendt, Heidrun; Ring, Johannes (2012): Climate change, environment and allergy. In: *Chemical immunology and allergy* 96, S. 7–14. DOI: 10.1159/000331804.

Beutler, B.; Greenwald, D.; Hulmes, J. D.; Chang, M.; Pan, Y. C.; Mathison, J.; Ulevitch, R.; Cerami, A. (1985): Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. In: *Nature* 316 (6028), S. 552–554.

Bewersdorff, Mayte Gertraud (2010): Beeinflussung der Interaktion von Dendritischen Zellen und T Zellen durch Pollenbestandteile in der allergischen Immunantwort und Charakterisierung eines murinen Hyposensibilisierungsmodells. Online verfügbar unter <https://mediatum.ub.tum.de/doc/823200/823200.pdf>, zuletzt geprüft am 06.08.2016

Bidad, Katayoon; Nicknam, MohammadHossein; Farid, Reza (2011): A review of allergy and allergen specific immunotherapy. In: *Iran J Allergy Asthma Immunol* 10 (1), S. 1–9. DOI: 10.01/ijaai.19.

Biton, Jerome; Semerano, Luca; Delavallee, Laure; Lemeiter, Delphine; Laborie, Marion; Grouard-Vogel, Geraldine; Boissier, Marie-Christophe; Bessis, Natacha (2011): Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. In: *J Immunol* 186 (7), S. 3899–3910. DOI: 10.4049/jimmunol.1003372.

Boehme, M. W.J.; Gabrio, T.; Dierkesmann, R.; Felder-Kennel, A.; Flicker-Klein, A.; Joggerst, B.; Kersting, G.; Konig, M.; Link, B.; Maisner, V.; Wetzig, J.; Weidner, U.; Behrendt, H. (2009): Sensibilisierung gegen Ambrosiapollen--Eine Ursache für allergische Atemwegserkrankungen in Deutschland? In: *Dtsch Med Wochenschr* 134 (28-29), S. 1457–1463. DOI: 10.1055/s-0029-1225300.

Bousquet, J.; Anto, J.; Auffray, C.; Akdis, M.; Cambon-Thomsen, A.; Keil, T.; Haahtela, T.; Lambrecht, B. N.; Postma, D. S.; Sunyer, J.; Valenta, R.; Akdis, C. A.; Annesi-Maesano, I.; Arno, A.; Bachert, C.; Ballester, F.; Basagana, X.; Baumgartner, U.; Bindeslev-Jensen, C.; Brunekreef, B.; Carlsen, K. H.; Chatzi, L.; Crameri, R.; Eveno, E.; Forastiere, F.; Garcia-Aymerich, J.; Guerra, S.; Hammad, H.; Heinrich, J.; Hirsch, D.; Jacquemin, B.; Kauffmann, F.; Kerkhof, M.; Kogevinas, M.; Koppelman, G. H.; Kowalski, M. L.; Lau, S.; Lodrup-Carlsen,

- K. C.; Lopez-Botet, M.; Lotvall, J.; Lupinek, C.; Maier, D.; Makela, M. J.; Martinez, F. D.; Mestres, J.; Momas, I.; Nawijn, M. C.; Neubauer, A.; Oddie, S.; Palkonen, S.; Pin, I.; Pison, C.; Rance, F.; Reitamo, S.; Rial-Sebbag, E.; Salapatras, M.; Siroux, V.; Smagghe, D.; Torrent, M.; Toskala, E.; van, CauwenbergeP; van, OosterhoutAJM; Varraso, R.; von, HertenL; Wickman, M.; Wijmenga, C.; Worm, M.; Wright, J.; Zuberbier, T. (2011): MeDALL (Mechanisms of the Development of ALLergy): an integrated approach from phenotypes to systems medicine. In: *Allergy* 66 (5), S. 596–604. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02534.x.
- Bousquet, J.; Khaltayev, N.; Cruz, A. A.; Denburg, J.; Fokkens, W. J.; Togias, A.; Zuberbier, T.; Baena-Cagnani, C. E.; Canonica, G. W.; van, WeelC; Agache, I.; Ait-Khaled, N.; Bachert, C.; Blaiss, M. S.; Bonini, S.; Boulet, L-P; Bousquet, P-J; Camargos, P.; Carlsen, K-H; Chen, Y.; Custovic, A.; Dahl, R.; Demoly, P.; Douagui, H.; Durham, S. R.; van, WijkRGerth; Kalayci, O.; Kaliner, M. A.; Kim, Y-Y; Kowalski, M. L.; Kuna, P.; Le, L. T.T.; Lemiere, C.; Li, J.; Lockey, R. F.; Mavale-Manuel, S.; Meltzer, E. O.; Mohammad, Y.; Mullol, J.; Naclerio, R.; O'Hehir, R. E.; Ohta, K.; Ouedraogo, S.; Palkonen, S.; Papadopoulos, N.; Passalacqua, G.; Pawankar, R.; Popov, T. A.; Rabe, K. F.; Rosado-Pinto, J.; Scadding, G. K.; Simons, F. E.R.; Toskala, E.; Valovirta, E.; van, CauwenbergeP; Wang, D-Y; Wickman, M.; Yawn, B. P.; Yorgancioglu, A.; Yusuf, O. M.; Zar, H.; Annesi-Maesano, I.; Bateman, E. D.; Ben, KhederA; Boakye, D. A.; Bouchard, J.; Burney, P.; Busse, W. W.; Chan-Yeung, M.; Chavannes, N. H.; Chuchalin, A.; Dolen, W. K.; Emuzyte, R.; Grouse, L.; Humbert, M.; Jackson, C.; Johnston, S. L.; Keith, P. K.; Kemp, J. P.; Klossek, J-M; Larenas-Linnemann, D.; Lipworth, B.; Malo, J-L; Marshall, G. D.; Naspitz, C.; Nekam, K.; Niggemann, B.; Nizankowska-Mogilnicka, E.; Okamoto, Y.; Orru, M. P.; Potter, P.; Price, D.; Stoloff, S. W.; Vandenplas, O.; Viegi, G.; Williams, D. (2008): Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). In: *Allergy* 63 Suppl 86, S. 8–160. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
- Boyce, JoshuaA; Bochner, Bruce; Finkelman, FredD; Rothenberg, MarcE (2012): Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2011. In: *J Allergy Clin Immunol* 129 (2), S. 335–341. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.12.968.
- Burbach, G. J.; Heinzerling, L. M.; Rohnelt, C.; Bergmann, K-C; Behrendt, H.; Zuberbier, T. (2009): Ragweed sensitization in Europe - GA(2)LEN study suggests increasing prevalence. In: *Allergy* 64 (4), S. 664–665. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.01975.x.
- Calderon, M. A.; Alves, B.; Jacobson, M.; Hurwitz, B.; Sheikh, A.; Durham, S. (2007): Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. In: *Cochrane Database Syst Rev* (1), S. CD001936. DOI: 10.1002/14651858.CD001936.pub2.
- Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (9), S. 3666–3670.
- Cerami, A.; Beutler, B. (1988): The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. In: *Immunol Today* 9 (1), S. 28–31.
- Cezmi A. Akdis MD (2010): Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Online verfügbar unter [http://pdn.sciencedirect.com.eaccess.ub.tum.de/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=272425&\\_user=616147&\\_pii=S0091674910018506&\\_check=y&\\_origin=article&\\_zone=toolbar&\\_coVerDate=31-Jan-2011&view=c&originContentFamily=serial&wchp=dGLzVIS-zSkzS&md5=29c8e4c4ab056042893f02cbb9c4d1a2/1-s2.0-S0091674910018506-main.pdf](http://pdn.sciencedirect.com.eaccess.ub.tum.de/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272425&_user=616147&_pii=S0091674910018506&_check=y&_origin=article&_zone=toolbar&_coVerDate=31-Jan-2011&view=c&originContentFamily=serial&wchp=dGLzVIS-zSkzS&md5=29c8e4c4ab056042893f02cbb9c4d1a2/1-s2.0-S0091674910018506-main.pdf), zuletzt aktualisiert am 30.12.2010, zuletzt geprüft am 02.03.2012.
- Chen, Wei; Liang, Xueqing; Peterson, AmandaJ; Munn, DavidH; Blazar, BruceR (2008a): The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. In: *J Immunol* 181 (8), S. 5396–5404.
- Chen, Xin; Baumel, Monika; Mannel, DanielaN; Howard, OMZack; Oppenheim, JoostJ (2007): Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. In: *J Immunol* 179 (1), S. 154–161.

- Chen, Xin; Hamano, Ryoko; Subleski, JeffreyJ; Hurwitz, ArthurA; Howard, OMZack; Oppenheim, JoostJ (2010): Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells. In: *J Immunol* 185 (1), S. 174–182. DOI: 10.4049/jimmunol.0903548.
- Chen, Xin; Oppenheim, Joost J. (2011a): Comment on "Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis". In: *J Immunol* 187 (4), S. 1527; author reply 1527-8. DOI: 10.4049/jimmunol.1190029.
- Chen, Xin; Oppenheim, Joost J. (2011b): The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells. In: *Immunology* 133 (4), S. 426–433. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2011.03460.x.
- Chen, Xin; Oppenheim, JoostJ (2010): TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. In: *Curr Dir Autoimmun* 11, S. 119–134. DOI: 10.1159/000289201.
- Chen, Xin; Subleski, JeffreyJ; Kopf, Heather; Howard, OMZack; Mannel, DanielaN; Oppenheim, JoostJ (2008b): Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. In: *J Immunol* 180 (10), S. 6467–6471.
- Corren, Jonathan (2007): The connection between allergic rhinitis and bronchial asthma. In: *Curr Opin Pulm Med* 13 (1), S. 13–18. DOI: 10.1097/MCP.0b013e328010d0db.
- Corren, Jonathan; Manning, BeatriceE; Thompson, StephenF; Hennessy, Sean; Strom, BrianL (2004): Rhinitis therapy and the prevention of hospital care for asthma: a case-control study. In: *J Allergy Clin Immunol* 113 (3), S. 415–419. DOI: 10.1016/j.jaci.2003.11.034.
- Dayer, J. M.; Beutler, B.; Cerami, A. (1985): Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. In: *J Exp Med* 162 (6), S. 2163–2168.
- Deetjen, Peter; Alzheimer, Christian (2005): Physiologie. 4. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- DeKruyff, R. H.; Fang, Y.; Umetsu, D. T. (1998): Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. In: *J Immunol* 160 (5), S. 2231–2237.
- Dhabhar, FirdausS (2009): Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. In: *Neuroimmunomodulation* 16 (5), S. 300–317. DOI: 10.1159/000216188.
- Dinarello, C. A.; Cannon, J. G.; Wolff, S. M.; Bernheim, H. A.; Beutler, B.; Cerami, A.; Figari, I. S.; Palladino, MAJr; O'Connor, J. V. (1986): Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. In: *J Exp Med* 163 (6), S. 1433–1450.
- Durham, S. R.; Walker, S. M.; Varga, E. M.; Jacobson, M. R.; O'Brien, F.; Noble, W.; Till, S. J.; Hamid, Q. A.; Nouri-Aria, K. T. (1999): Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. In: *N Engl J Med* 341 (7), S. 468–475. DOI: 10.1056/NEJM199908123410702.
- Durham, StephenR; Emminger, Waltraud; Kapp, Alexander; Colombo, Giselda; de, MonchyJanGR; Rak, Sabina; Scadding, Glenisk; Andersen, JensS; Riis, Bente; Dahl, Ronald (2010): Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. In: *J Allergy Clin Immunol* 125 (1), S. 131-8.e1-7. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.10.035.
- Eck, M. J.; Sprang, S. R. (1989): The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. In: *J Biol Chem* 264 (29), S. 17595–17605.

- Englert, L.; May, S.; Kaul, S.; Vieths, S. (2012): Die Therapieallergene-Verordnung. Hintergrund und Auswirkungen. In: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 55 (3), S. 351–357. DOI: 10.1007/s00103-011-1434-7.
- Fallarino, Francesca; Grohmann, Ursula; You, Sylvaine; McGrath, BarbaraC; Cavener, DouglasR; Vacca, Carmine; Orabona, Ciriana; Bianchi, Roberta; Belladonna, MariaL; Volpi, Claudia; Santamaria, Pere; Fioretti, MariaC; Puccetti, Paolo (2006): The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. In: *J Immunol* 176 (11), S. 6752–6761.
- Faustman, Denise; Davis, Miriam (2010): TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. In: *Nat Rev Drug Discov* 9 (6), S. 482–493. DOI: 10.1038/nrd3030.
- Faustman, Denise L.; Davis, Miriam (2013): TNF Receptor 2 and Disease: Autoimmunity and Regenerative Medicine. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 478. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00478.
- Frew, AnthonyJ (2010): Allergen immunotherapy. In: *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2), S. S306-13. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.10.064.
- Fujigaki, Hidetsugu; Saito, Kuniaki; Fujigaki, Suwako; Takemura, Masao; Sudo, Kaori; Ishiguro, Hiroshi; Seishima, Mitsuru (2006): The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. In: *J Biochem* 139 (4), S. 655–662. DOI: 10.1093/jb/mvj072.
- Galli, StephenJ; Nakae, Susumu; Tsai, Mindy (2005): Mast cells in the development of adaptive immune responses. In: *Nat Immunol* 6 (2), S. 135–142. DOI: 10.1038/ni1158.
- Gilles, Stefanie; Fekete, Agnes; Zhang, Xin; Beck, Isabelle; Blume, Cornelia; Ring, Johannes; Schmidt-Weber, Carsten; Behrendt, Heidrun; Schmitt-Kopplin, Philippe; Traidl-Hoffmann, Claudia (2011): Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses. In: *J Allergy Clin Immunol* 127 (2), S. 454-461.e1-9. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.12.1082.
- Gilles, Stefanie; Traidl-Hoffmann, Claudia (2012): CD27 expression on allergen-specific T cells: a new surrogate for successful allergen-specific immunotherapy? In: *J Allergy Clin Immunol* 129 (2), S. 552–554. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.12.967.
- Gogishvili, Tea; Hahn, Christian; Meinhard, Julia; Hohaus, Andreas; Erb, Klaus; Sebald, Walter; Brocker, EvaB; Grunewald, SusanneM (2007): Inhibition of IL-4/IL-13 does not enhance the efficacy of allergen immunotherapy in murine allergic airway inflammation. In: *Int Arch Allergy Immunol* 142 (2), S. 165–174. DOI: 10.1159/000096610.
- Gonzalez-Espinosa, Claudia; Odom, Sandra; Olivera, Ana; Hobson, JPeyton; Martinez, MariaEugeniaCid; Oliveira-Dos-Santos, Antonio; Barra, Lillian; Spiegel, Sarah; Penninger, JosefM; Rivera, Juan (2003): Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. In: *J Exp Med* 197 (11), S. 1453–1465. DOI: 10.1084/jem.20021806.
- Grell, M.; Zimmermann, G.; Gottfried, E.; Chen, C. M.; Grunwald, U.; Huang, D. C.; Wu, LeeYH; Durkop, H.; Engelmann, H.; Scheurich, P.; Wajant, H.; Strasser, A. (1999): Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. In: *EMBO J* 18 (11), S. 3034–3043. DOI: 10.1093/emboj/18.11.3034.
- Grevers, Gerhard (Hg.) (2008): Taschenatlas Allergologie. Grundlagen, Diagnostik, Klinik. 2. Aufl. Stuttgart,, New York, NY: Thieme.
- Gri, Giorgia; Piconese, Silvia; Frossi, Barbara; Manfroi, Vanessa; Merluzzi, Sonia; Tripodo, Claudio; Viola, Antonella; Odom, Sandra; Rivera, Juan; Colombo, MarioP; Pucillo, CarloE (2008): CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic

- responses through OX40-OX40L interaction. In: *Immunity* 29 (5), S. 771–781. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.08.018.
- Haak-Frendscho, M.; Marsters, S. A.; Mordenti, J.; Brady, S.; Gillett, N. A.; Chen, S. A.; Ashkenazi, A. (1994): Inhibition of TNF by a TNF receptor immunoadhesin. Comparison to an anti-TNF monoclonal antibody. In: *J Immunol* 152 (3), S. 1347–1353.
- Hamano, Ryoko; Huang, Jiaqiang; Yoshimura, Teizo; Oppenheim, Joost J.; Chen, Xin (2011): TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. In: *Eur J Immunol* 41 (7), S. 2010–2020. DOI: 10.1002/eji.201041205.
- Hausteiner-Wiehle, Constanze; Grosber, Martine; Bubel, Esther; Groben, Sylvienne; Bornschein, Susanne; Lahmann, Claas; Eyer, Florian; Eberlein, Bernadette; Behrendt, Heidrun; Lowe, Bernd; Henningsen, Peter; Huber, Dorothea; Ring, Johannes; Darsow, Ulf (2011): Patient-doctor interaction, psychobehavioural characteristics and mental disorders in patients with suspected allergies: do they predict "medically unexplained symptoms"? In: *Acta Derm Venereol* 91 (6), S. 666–673. DOI: 10.2340/00015555-1147.
- Hayashi, Tomoko; Beck, Lucinda; Rossetto, Cyprian; Gong, Xing; Takikawa, Osamu; Takabayashi, Kenji; Broide, David H.; Carson, Dennis A.; Raz, Eyal (2004): Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *J Clin Invest* 114 (2), S. 270–279. DOI: 10.1172/JCI21275.
- Hehlgans, Thomas; Mannel, Daniela N (2002): The TNF-TNF receptor system. In: *Biol Chem* 383 (10), S. 1581–1585. DOI: 10.1515/BC.2002.178.
- Hehlgans, Thomas; Pfeffer, Klaus (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. In: *Immunology* 115 (1), S. 1–20. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
- Hermann-Kunz, E. (1999a): Häufigkeit allergischer Krankheiten in Ost- und Westdeutschland. In: *Gesundheitswesen* 61, S. S100-5.
- Hermann-Kunz, E. (1999b): Heuschnupfenprävalenz in Deutschland--Ost-West-Vergleich und zeitlicher Trend. In: *Gesundheitswesen* 61, S. S94-9.
- Hermann-Kunz, E. (2000): Allergische Krankheiten in Deutschland. Ergebnisse einer repräsentativen Studie. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* (43), S. 400–406, zuletzt geprüft am 23.06.2013.
- Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger; Geginat, Gernot (2005): Medizinische Mikrobiologie. 198 Tabellen ; [nach neuer AO - mit den Fächern: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene]. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Huber, Benedikt (2006): 100 Jahre Allergie: Clemens von Pirquet - sein Allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende Krankheitsverständnis. Teil 2: Der Pirquet'sche Allergiebegriff. In: *Wien Klin Wochenschr* 118 (23-24), S. 718–727. DOI: 10.1007/s00508-006-0712-0.
- Hwang, Shin Ling; Chung, Nancy Pei-Yee; Chan, Jacqueline Kwai-Yi; Lin, Chen-Lung Steve (2005): Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. In: *Cell Res* 15 (3), S. 167–175. DOI: 10.1038/sj.cr.7290282.
- Information Firma Sigma-Aldrich: Is Product No. A5503, Albumin from chicken egg white, endotoxin-tested? Online verfügbar unter [http://sigma-aldrich.custhelp.com/app/answers/detail/a\\_id/8/p/7,12/session/L3RpbWUvMTQ1NjIzOTYxM9zaWQvMUxsKIFPSm0%3D](http://sigma-aldrich.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/8/p/7,12/session/L3RpbWUvMTQ1NjIzOTYxM9zaWQvMUxsKIFPSm0%3D), zuletzt geprüft am 23.02.2016.
- Jacob, C. O.; Aiso, S.; Michie, S. A.; McDevitt, H. O.; Acha-Orbea, H. (1990): Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (3), S. 968–972.

- Jacob, C. O.; McDevitt, H. O. (1988): Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis. In: *Nature* 331 (6154), S. 356–358. DOI: 10.1038/331356a0.
- Jacobsen, L.; Niggemann, B.; Dreborg, S.; Ferdousi, H. A.; Halken, S.; Host, A.; Koivikko, A.; Norberg, L. A.; Valovirta, E.; Wahn, U.; Moller, C. (2007): Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. In: *Allergy* 62 (8), S. 943–948. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01451.x.
- Janeway, Charles; Murphy, Kenneth P. (2009): *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Jenerowicz, Dorota; Silny, Wojciech; Danczak-Pazdrowska, Aleksandra; Polanska, Adriana; Osmola-Mankowska, Agnieszka; Olek-Hrab, Karolina (2012): Environmental factors and allergic diseases. In: *Ann Agric Environ Med* 19 (3), S. 475–481.
- Johansen, P.; Senti, G.; Martinez, GomezJM; Storni, T.; von, BeustBR; Wuthrich, B.; Bot, A.; Kundig, T. M. (2005): Toll-like receptor ligands as adjuvants in allergen-specific immunotherapy. In: *Clin Exp Allergy* 35 (12), S. 1591–1598. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2005.02384.x.
- Johnson, Burles A. 3rd; Baban, Babak; Mellor, Andrew L. (2009): Targeting the immunoregulatory indoleamine 2,3 dioxygenase pathway in immunotherapy. In: *Immunotherapy* 1 (4), S. 645–661. DOI: 10.2217/IMT.09.21.
- Jutel, M.; Akdis, C. A. (2011): Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. In: *Allergy* 66 (6), S. 725–732. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02589.x.
- Jutel, M.; Akdis, M.; Blaser, K.; Akdis, C. A. (2006): Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. In: *Allergy* 61 (7), S. 796–807. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01175.x.
- Jutel, Marek; Akdis, Cezmi A. (2008): T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. In: *Chem Immunol Allergy* 94, S. 158–177. DOI: 10.1159/000155000.
- Katz, Y.; Strunk, R. C. (1989): IL-1 and tumor necrosis factor. Similarities and differences in stimulation of expression of alternative pathway of complement and IFN-beta 2/IL-6 genes in human fibroblasts. In: *J Immunol* 142 (11), S. 3862–3867.
- Kay, A. B. (2001): Allergy and allergic diseases. First of two parts. In: *N Engl J Med* 344 (1), S. 30–37. DOI: 10.1056/NEJM200101043440106.
- Keles, Sevgi; Karakoc-Aydiner, Elif; Ozen, Ahmet; Izgi, AyseGul; Tevetoglu, Ayzer; Akkoc, Tunc; Bahceciler, NerinN; Barlan, Isil (2011): A novel approach in allergen-specific immunotherapy: combination of sublingual and subcutaneous routes. In: *J Allergy Clin Immunol* 128 (4), S. 808-815.e7. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.04.033.
- Kleine-Tebbe, J.; Ackermann-Simon, J.; Hanf, G. (2012): Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen zwischen wissenschaftlichem Fortschritt und medizinischer Versorgungsrealität. In: *Bundesgesundheitsbl.* 55 (3), S. 343–350. DOI: 10.1007/s00103-011-1433-8.
- Kollias, George; Kontoyiannis, Dimitris; Douni, Eleni; Kassiotis, George (2002): The role of TNF/TNFR in organ-specific and systemic autoimmunity: implications for the design of optimized 'anti-TNF' therapies. In: *Curr Dir Autoimmun* 5, S. 30–50.
- Kopp, M. V.; Hamelmann, E.; Zielen, S.; Kamin, W.; Bergmann, K-C; Sieder, C.; Stenglein, S.; Seyfried, S.; Wahn, U. (2009): Combination of omalizumab and specific immunotherapy is superior to immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis and co-morbid seasonal allergic asthma. In: *Clin Exp Allergy* 39 (2), S. 271–279. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.03121.x.
- Kopp, MatthiasV (2011): Role of immunomodulators in allergen-specific immunotherapy. In: *Allergy* 66 (6), S. 792–797. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02553.x.

- Kunzmann, S.; Mantel, P-Y; Wohlfahrt, J. G.; Akdis, M.; Blaser, K.; Schmidt-Weber, C. B. (2003): Histamine enhances TGF-beta1-mediated suppression of Th2 responses. In: *FASEB J* 17 (9), S. 1089–1095. DOI: 10.1096/fj.02-1008com.
- Li, Wei; Katz, Barry P.; Spinola, Stanley M. (2011): Haemophilus ducreyi lipooligosaccharides induce expression of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase via type I interferons and tumor necrosis factor alpha in human dendritic cells. In: *Infect Immun* 79 (8), S. 3338–3347. DOI: 10.1128/IAI.05021-11.
- Lowe, A. P. P.; Thomas, R. S.; Nials, A. T.; Kidd, E. J.; Broadley, K. J.; Ford, W. R. (2015): LPS exacerbates functional and inflammatory responses to ovalbumin and decreases sensitivity to inhaled fluticasone propionate in a guinea pig model of asthma. In: *British journal of pharmacology* 172 (10), S. 2588–2603. DOI: 10.1111/bph.13080.
- Lüderitz-Püchel, U.; Keller-Stanislawski, B.; Hausteil, D. (2001): Neubewertung des Risikos von Test- und Therapieallergenen. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 44 (7), S. 709–718. DOI: 10.1007/s001030100201.
- Ma, Jian-Xin; Xia, Jun-Bo; Cheng, Xiao-Ming; Wang, Chang-Zheng (2010): 1,25-dihydroxyvitamin D pretreatment enhances the efficacy of allergen immunotherapy in a mouse allergic asthma model. In: *Chin Med J (Engl)* 123 (24), S. 3591–3596.
- Marino, M. W.; Dunn, A.; Grail, D.; Inglese, M.; Noguchi, Y.; Richards, E.; Jungbluth, A.; Wada, H.; Moore, M.; Williamson, B.; Basu, S.; Old, L. J. (1997): Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15), S. 8093–8098.
- Mindrescu, Catalin; Le, Junming; Wisniewski, Hans-Georg; Vilcek, Jan (2005): Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression by TSG-6 protein in macrophage cell line. In: *Biochem Biophys Res Commun* 330 (3), S. 737–745. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.03.040.
- Montoro, J.; Mullol, J.; Jauregui, I.; Davila, I.; Ferrer, M.; Bartra, J.; del CuvilloA; Sastre, J.; Valero, A. (2009): Stress and allergy. In: *J Investig Allergol Clin Immunol* 19 Suppl 1, S. 40–47.
- Moote, William; Kim, Harold (2011): Allergen-specific immunotherapy. In: *Allergy Asthma Clin Immunol* 7 Suppl 1, S. S5. DOI: 10.1186/1710-1492-7-S1-S5.
- Munn, D. H.; Zhou, M.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Conway, S. J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A. L. (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. In: *Science* 281 (5380), S. 1191–1193.
- Munn, DavidH; Sharma, MadhavD; Baban, Babak; Harding, HeatherP; Zhang, Yuhong; Ron, David; Mellor, AndrewL (2005): GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Immunity* 22 (5), S. 633–642. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.03.013.
- Nagar, Meital; Jacob-Hirsch, Jasmine; Vernitsky, Helly; Berkun, Yackov; Ben-Horin, Shomron; Amariglio, Ninette; Bank, Ilan; Kloog, Yoel; Rechavi, Gideon; Goldstein, Itamar (2010): TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA-regulatory T cells that modulates their suppressive function. In: *J Immunol* 184 (7), S. 3570–3581. DOI: 10.4049/jimmunol.0902070.
- O'Connor, Jason C.; Andre, Caroline; Wang, Yunxia; Lawson, Marcus A.; Szegedi, Sandra S.; Lestage, Jacques; Castanon, Nathalie; Kelley, Keith W.; Dantzer, Robert (2009): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. In: *J Neurosci* 29 (13), S. 4200–4209. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5032-08.2009.
- Oliver, J. C.; Bland, L. A.; Oettinger, C. W.; Arduino, M. J.; McAllister, S. K.; Agüero, S. M.; Favero, M. S. (1993): Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. In: *Lymphokine Cytokine Res* 12 (2), S. 115–120.

- Ostberg, J. R.; Taylor, S. L.; Baumann, H.; Repasky, E. A. (2000): Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response. In: *Journal of leukocyte biology* 68 (6), S. 815–820.
- Palomares, Oscar; Yaman, Gorkem; Azkur, AhmetK; Akkoc, Tunc; Akdis, Mubeccel; Akdis, CezmiA (2010): Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. In: *Eur J Immunol* 40 (5), S. 1232–1240. DOI: 10.1002/eji.200940045.
- Palombella, V. J.; Mendelsohn, J.; Vilcek, J. (1988): Mitogenic action of tumor necrosis factor in human fibroblasts: interaction with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. In: *J Cell Physiol* 135 (1), S. 23–31. DOI: 10.1002/jcp.1041350104.
- Perlmutter, D. H.; Dinarello, C. A.; Punsal, P. I.; Colten, H. R. (1986): Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. In: *J Clin Invest* 78 (5), S. 1349–1354. DOI: 10.1172/JCI112721.
- Pfeffer, K.; Matsuyama, T.; Kundig, T. M.; Wakeham, A.; Kishihara, K.; Shahinian, A.; Wiegmann, K.; Ohashi, P. S.; Kronke, M.; Mak, T. W. (1993): Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. In: *Cell* 73 (3), S. 457–467.
- Plewig, Gerd (2012): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. 6. überarbeitete und erw. Aufl. Berlin: Springer.
- Popov, Alexey; Schultze, Joachim L. (2008):IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. In: *J Mol Med (Berl)* 86 (2), S. 145–160. DOI: 10.1007/s00109-007-0262-6.
- Purello-D'Ambrosio, F.; Gangemi, S.; Merendino, R. A.; Isola, S.; Puccinelli, P.; Parmiani, S.; Ricciardi, L. (2001): Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. In: *Clin Exp Allergy* 31 (8), S. 1295–1302.
- Regenass, U.; Muller, M.; Curschellas, E.; Matter, A. (1987): Anti-tumor effects of tumor necrosis factor in combination with chemotherapeutic agents. In: *Int J Cancer* 39 (2), S. 266–273.
- Ring, J.; Kramer, U.; Schafer, T.; Behrendt, H. (2001): Why are allergies increasing? In: *Curr Opin Immunol* 13 (6), S. 701–708.
- Ring, Johannes (1988): Angewandte Allergologie. 2. Aufl. München: MMV Medizin Verlag.
- Ring, Johannes; Gutermuth, J. (2011): 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT). In: *Allergy* 66 (6), S. 713–724. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02541.x.
- Robinson, Cory M.; Hale, Phillip T.; Carlin, Joseph M. (2005): The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. In: *J Interferon Cytokine Res* 25 (1), S. 20–30. DOI: 10.1089/jir.2005.25.20.
- Robinson, CoryM; Shirey, KariAnn; Carlin, JosephM (2003): Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. In: *J Interferon Cytokine Res* 23 (8), S. 413–421. DOI: 10.1089/107999003322277829.
- Schütt, Maik; Steck, Stephanie (2007): Produktion von endotoxinfreiem Ovalbumin für die Asthmaforschung. In: *BIOspektrum* 13. Jahrgang (07), S. 762–763. Online verfügbar unter [http://www.biospektrum.de/blatt/d\\_bs\\_pdf&\\_id=932033](http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=932033), zuletzt geprüft am 23.02.2016.
- Senti, Gabriela; Johansen, Pal; Kundig, ThomasM (2009): Intralymphatic immunotherapy. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9 (6), S. 537–543. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3283310ff7.
- Simmons, A.; Nash, A. A. (1985): Role of antibody in primary and recurrent herpes simplex virus infection. In: *J Virol* 53 (3), S. 944–948.

- Sterns, Theo; Pollak, Nils; Echtenacher, Bernd; Mannel, Daniela N. (2005): Divergence of protection induced by bacterial products and sepsis-induced immune suppression. In: *Infect Immun* 73 (8), S. 4905–4912. DOI: 10.1128/IAI.73.8.4905-4912.2005.
- Stirling, R. G.; Chung, K. F. (2000): Future treatments of allergic diseases and asthma. In: *Br Med Bull* 56 (4), S. 1037–1053.
- Sullivan, Deborah E.; Ferris, MaryBeth; Nguyen, Hong; Abboud, Elizabeth; Brody, Arnold R. (2009): TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. In: *J Cell Mol Med* 13 (8B), S. 1866–1876. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00647.x.
- Sullivan, Deborah E.; Ferris, MaryBeth; Pociask, Derek; Brody, Arnold R. (2005): Tumor necrosis factor-alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase pathway. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 32 (4), S. 342–349. DOI: 10.1165/rcmb.2004-0288OC.
- Taher, YousefA; Piavaux, BenoitJA; Gras, Renee; van, EschBettyCAM; Hofman, GerardA; Bloksma, Nanne; Henricks, PaulAJ; van, OosterhoutAntoonJM (2008): Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. In: *J Allergy Clin Immunol* 121 (4), S. 983-91.e2. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.11.021.
- Taylor, M. W.; Feng, G. S. (1991): Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. In: *FASEB J* 5 (11), S. 2516–2522.
- Terui, T.; Ishii, K.; Ozawa, M.; Tabata, N.; Kato, T.; Tagami, H. (1997): C3 production of cultured human epidermal keratinocytes is enhanced by IFNgamma and TNFalpha through different pathways. In: *J Invest Dermatol* 108 (1), S. 62–67.
- Tsai, Yi-Giien; Yang, KuenderD; Niu, Dau-Ming; Chien, Jien-Wen; Lin, Ching-Yuang (2010): TLR2 agonists enhance CD8+Foxp3+ regulatory T cells and suppress Th2 immune responses during allergen immunotherapy. In: *J Immunol* 184 (12), S. 7229–7237. DOI: 10.4049/jimmunol.1000083.
- Tsuchiya, Kimitake; Siddiqui, Sana; Risse, Paul-Andre; Hirota, Nobuaki; Martin, James G. (2012): The presence of LPS in OVA inhalations affects airway inflammation and AHR but not remodeling in a rodent model of asthma. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 303 (1), S. L54-63. DOI: 10.1152/ajplung.00208.2011.
- Valencia, Xavier; Stephens, Geoffrey; Goldbach-Mansky, Raphaela; Wilson, Mildred; Shevach, Ethan M.; Lipsky, Peter E. (2006): TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. In: *Blood* 108 (1), S. 253–261. DOI: 10.1182/blood-2005-11-4567.
- Van, OosterhoutAJ; Van, EschB; Hofman, G.; Hofstra, C. L.; Van, Arkl; Nijkamp, F. P.; Kapsenberg, M. L.; Savelkoul, H. F.; Weller, F. R. (1998): Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 19 (4), S. 622–628.
- Verschoor, A.; Brockman, M. A.; Knipe, D. M.; Carroll, M. C. (2001): Cutting edge: myeloid complement C3 enhances the humoral response to peripheral viral infection. In: *J Immunol* 167 (5), S. 2446–2451.
- Verschoor, Admar; Brockman, MarkA; Gadjeva, Mihaela; Knipe, DavidM; Carroll, MichaelC (2003): Myeloid C3 determines induction of humoral responses to peripheral herpes simplex virus infection. In: *J Immunol* 171 (10), S. 5363–5371.
- Vietor, I.; Schwenger, P.; Li, W.; Schlessinger, J.; Vilcek, J. (1993): Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in human fibroblasts. In: *J Biol Chem* 268 (25), S. 18994–18999.

- Visser, JoostLM; van, EschBettyCAM; Hofman, GerardA; Kapsenberg, MartienL; Weller, FrankR; van, OosterhoutAntoonJM (2004): Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. In: *J Allergy Clin Immunol* 113 (6), S. 1204–1210. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.02.041.
- Vits, Sabine; Cesko, Elvir; Enck, Paul; Hillen, Uwe; Schadendorf, Dirk; Schedlowski, Manfred (2011): Behavioural conditioning as the mediator of placebo responses in the immune system. In: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 (1572), S. 1799–1807. DOI: 10.1098/rstb.2010.0392.
- Wanebo, H. J. (1989): Tumor necrosis factors. In: *Semin Surg Oncol* 5 (6), S. 402–413.
- Wang, Hui; Pan, Ke; Xia, Jian-Chuan (2009): Interaction of indoleamine-2,3-dioxygenase and CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immune escape. In: *Ai Zheng* 28 (2), S. 184–187.
- Watanabe, Junji; Miyazaki, Yasunari; Zimmerman, Guy A.; Albertine, Kurt H.; McIntyre, Thomas M. (2003): Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (43), S. 42361–42368. DOI: 10.1074/jbc.M307752200.
- Wedi, B.; Kapp, A. (2004): Spezifische Immuntherapie. Hyposensibilisierung mit Allergenen. In: *Hautarzt* 55 (4), S. 399-407; quiz 408-9. DOI: 10.1007/s00105-004-0704-9.
- Wisniewski, H. G.; Burgess, W. H.; Oppenheim, J. D.; Vilcek, J. (1994): TSG-6, an arthritis-associated hyaluronan binding protein, forms a stable complex with the serum protein inter-alpha-inhibitor. In: *Biochemistry* 33 (23), S. 7423–7429.
- Wisniewski, H. G.; Hua, J. C.; Poppers, D. M.; Naime, D.; Vilcek, J.; Cronstein, B. N. (1996): TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. In: *J Immunol* 156 (4), S. 1609–1615.
- Wisniewski, H. G.; Vilcek, J. (1997): TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 8 (2), S. 143–156.
- Worm, M.; Hompes, S. (2012): Das deutschsprachige Anaphylaxie-Register (3). Online verfügbar unter <http://www.springerlink.com.eaccess.ub.tum.de/content/83147k5l2142m375/fulltext.pdf>, zuletzt geprüft am 16.03.2012.
- Wu, Ava J.; Hua, Hong; Munson, Sibyl H.; McDevitt, Hugh O. (2002): Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (19), S. 12287–12292. DOI: 10.1073/pnas.172382999.
- Yoshida, R.; Urade, Y.; Tokuda, M.; Hayaishi, O. (1979): Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (8), S. 4084–4086.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der Typ I-Allergie .....	4
Abbildung 2: Vorteile (grün) und Nachteile (rot) der ASIT .....	16
Abbildung 3: Molekulare Effekte der ASIT .....	19
Abbildung 4: Zusammenfassung der wichtigsten Funktionen von TNF $\alpha$ .....	26
Abbildung 5: Signalweg der TNF-Rezeptoren.....	30
Abbildung 6: Protokoll Vorversuch.....	44
Abbildung 7: Protokoll Versuch 1-3.....	46
Abbildung 8: Mechanismen des Sandwich- und Indirekten ELISA.....	51
Abbildung 9: Mittelwerte TNF $\alpha$ im Serum, in pg/ml, Vorversuch .....	54
Abbildung 10: Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1.....	56
Abbildung 11: prozentualer Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1 .....	57
Abbildung 12: prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1 .....	58
Abbildung 13: prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1 .....	59
Abbildung 14: prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V1 .....	60
Abbildung 15: Übersicht über den prozentualen Anteil der verschiedenen Zellarten im BAL-Fluid in den verschiedenen Gruppen, V1.....	61
Abbildung 16: Zellen im BAL-Fluid; Eosin/Thiazin-Färbung, V1.....	61
Abbildung 17: Konzentration von IL-13 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1.....	62
Abbildung 18: Konzentration von IFN $\gamma$ im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1.....	63
Abbildung 19: Konzentration von IL-5 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1.....	64
Abbildung 20: Konzentration von IL-10 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1.....	65
Abbildung 21: Konzentration OVA-spezifischer IgG1-Antikörper im Serum in $\mu$ g/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V1 .....	67
Abbildung 22: Konzentration der Gesamt-IgE-Antikörper im Serum in $\mu$ g/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V1 .....	68
Abbildung 23: Konzentration OVA-spezifischer IgE-Antikörper im Serum in $\mu$ g/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V1 .....	69

Abbildung 24: Konzentration von TNF $\alpha$ im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V1.....	70
Abbildung 25: HE-Färbung Lungengewebe; V1.....	71
Abbildung 26: PAS-Färbung Lungengewebe; V1.....	72
Abbildung 27: Mittelwerte TNF $\alpha$ im Serum in pg/ml, Versuch zur Funktionstestung des Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers.....	75
Abbildung 28: Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3.....	77
Abbildung 29: prozentualer Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3 .....	78
Abbildung 30: prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3 .....	79
Abbildung 31: prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3 .....	80
Abbildung 32: prozentualer Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im BAL-Fluid, Mittelwert und Standardfehler, V3 .....	81
Abbildung 33: Übersicht über den prozentualen Anteil der verschiedenen Zellarten im BAL-Fluid in den verschiedenen Gruppen, V3.....	82
Abbildung 34: Konzentration von IL-13 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3.....	83
Abbildung 35: Konzentration von IFN $\gamma$ im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3.....	84
Abbildung 36: Konzentration von IL-5 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3.....	85
Abbildung 37: Konzentration von IL-10 im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3.....	86
Abbildung 38: Konzentration OVA-spezifischer IgG1-Antikörper im Serum in $\mu$ g/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V3 .....	88
Abbildung 39: Konzentration der Gesamt-IgE-Antikörper im Serum in $\mu$ g/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V3 .....	89
Abbildung 40: Konzentration OVA-spezifischer IgE-Antikörper im Serum in $\mu$ g/ml, Mittelwert im Zeitverlauf, V3 .....	90
Abbildung 41: Konzentration von TNF $\alpha$ im BAL-Fluid in pg/ml, Mittelwert und Standardfehler, V3.....	91

### 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorversuch: Übersicht über Gruppenaufteilung und Injektionen.....	44
Tabelle 2: V1: Übersicht über Gruppenaufteilung und Injektionen .....	45
Tabelle 3: V2 und V3: Übersicht über Gruppenaufteilung und Injektionen .....	46
Tabelle 4: Standardkonzentrationen der verschiedenen ELISA .....	49
Tabelle 5: Verdünnungen der Proben der Ig-ELISA.....	51
Tabelle 6: Übersicht über den Versuchsablauf, Vorversuch .....	53
Tabelle 7: Übersicht über den Versuchsablauf, Versuch 1 .....	55
Tabelle 8: Übersicht über den Versuchsablauf, Versuch 2 und 3.....	73

## 7 Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte in der Arbeitsgruppe der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie, Helmholtzzentrum München, sowie im ZAUM (Zentrum Allergie und Umwelt), Technische Universität München.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich unterstützt haben und direkt oder indirekt zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Einigen Personen gilt mein ganz besonderer Dank:

Ich danke Frau Professor Dr. Heidrun Behrendt, ehemalige Leiterin des ZAUM und ihrem Nachfolger Professor Dr. Carsten Schmidt-Weber, Leiter des ZAUM, sowie Professor Dr. Dr. Johannes Ring, ehemaliger Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein, TU München, und seinem Nachfolger Professor Dr. Tilo Biedermann für die Möglichkeit meine Arbeit zu erstellen und für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Professor Dr. Markus Ollert für die konstruktiven Ratschläge und die Unterstützung sowohl bei der Planung als auch der Durchführung der Arbeit.

Besonders danke ich Professor Dr. Martin Mempel für die Betreuung der Arbeit, für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche, für seinen ständigen Einsatz, seine Ansprechbarkeit und seine Ratschläge sowie seine Motivation.

Professor Dr. Jan Gutermuth möchte ich danken für konstruktive Diskussionen und Ratschläge betreffend die Erstellung meiner Arbeit sowie die Orientierung im Berufsfeld der Dermatologie.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die sehr angenehme und immer wieder lustige Arbeitsatmosphäre sowie die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken. Ich habe es als sehr wertvoll empfunden, immer gerne ins Labor zu kommen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Andrea Braun und Dr. Mayte Bewersdorff für ihre Unterstützung, insbesondere zu Beginn meiner Arbeit, für die methodische Einarbeitung und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr bei Fragen oder Problemen hatten. Dank auch an Dr. Antonio Aguilar für konstruktive Diskussionen und Unterstützung bei der Datenauswertung.

Auch Dr. Maria Kamml und PhD Tanja Seher möchte ich danken für viele Gespräche und Diskussionen und die nette Zusammenarbeit. Martin Skerhut und Johanna Grosch danke ich

besonders herzlich für die Hilfe bei den Tierexperimenten und der Laborarbeit sowie für viele hilfreiche Tipps.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei den Mitarbeitern des ZAUM für konstruktive Diskussionen sowie die Unterstützung bei der Durchführung beispielsweise des LAL-Tests, bei den Mitarbeitern der Pathologie des Helmholtzzentrums und der Histologie am Biederstein für die Unterstützung der histologischen Arbeiten und die Möglichkeit der Nutzung ihrer Arbeitsgeräte.

Vielen Dank an die TU München für die Statistikberatung TUM Stat.

Meinem Freund Dr. Thomas Satzger möchte ich danken für die durchgehende Motivation und viele hilfreiche Tipps für den Umgang mit Word, Excel und Konsorten.

Meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden danke ich für die immerwährende Unterstützung und Ermutigung und die Geduld, wenn's mal wieder stressig war.