

**Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg**
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. E.-B. Bröcker

**Asthmatherapie im Mausmodell: Allergen
spezifische Immuntherapie in Kombination
mit einer Immunmodulation durch einen
IL-4/IL-13 Antagonisten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julia Meinhardt

aus Würzburg

Würzburg, November 2005

Referentin: Prof. Dr. E.-B. Bröcker

Koreferent: Prof. Dr. W. Sebald

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

Dir Promovendin ist Ärztin

meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Soforttypallergien und atopische Erkrankungen	1
1.2	Immunologie bei atopischen Erkrankungen	4
1.2.1	Sensibilisierungsphase und Effektormechanismen bei Typ I Allergien	4
1.2.2	Aufrechterhaltung der Allergie und allergische Entzündung der Spätphase	5
1.3	Allergitherapie	6
1.3.1	Symptomatische anti-allergische und anti-entzündliche Therapien	6
1.3.2	Anti-IgE Antikörper	6
1.3.3	Die allergenspezifische Immuntherapie.....	7
1.3.3.1	Immunologische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie	8
1.3.3.2	Durchführung und Applikationsrouten der SIT	9
1.3.3.3	Neue experimentelle Strategien der SIT	13
1.3.4	Experimentelle Allergitherapie	13
1.3.4.1	Gentherapie.....	13
1.3.4.2	Immunmodulation durch Zytokine und Zytokinantagonisten.....	14
1.3.4.3	Design von antagonistischen IL-4 Mutanten	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Abkürzungen	19
2.2	Herstellernachweis	20
2.3	Chemikalien, Proteine und Enzyme	20
2.4	Tiere	22
2.5	Tierversuche	23
2.5.1	Narkose und Einschläferungstechniken.....	23
2.5.1.1	Injektionsnarkose.....	23
2.5.1.2	Einschläferungstechniken	23
2.5.2	Blutentnahmetechnik.....	23
2.5.3	Sensibilisierung, spezifische Immuntherapie u. Therapie m. d. IL-4/IL-13 Antagonisten	23
2.6	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	24
2.6.1	Zytospin und zytologische Untersuchung d. zellulären Zusammensetzung in der BAL- Flüssigkeit	24
2.7	Histologie	25
2.7.1	Fixierung in Paraffin und Schneiden	25
2.7.2	Färbungen	25
2.7.2.1	Hämatoxilin & Eosin Färbung.....	25
2.7.2.2	PAS- Färbung (Periodic acid Schiff- Reaktion)	26
2.7.3	Beurteilung der Becherzellmetaplasie	26
2.8	Bestimmung von OVA-spezifischen Antikörpern durch ELISA	26
2.9	Bestimmung von Zytokinen durch ELISA	27
2.10	Lymphknotenentnahme und in vitro T-Zell-Stimulation	28
2.11	Statistische Methoden	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Etablierung eines Mausmodells zur intranasalen allergenspezifischen Immuntherapie	30

3.2	Allergenspezifische Immuntherapie in Kombination mit einer Immunmodulation durch einen IL-4/IL-13 Antagonisten im Mausmodell für allergisches Asthma	31
3.3	Ova-spezifische Antikörper	33
3.3.1	Ova-spezifisches IgE	33
3.3.2	Ova-spezifisches IgG1	35
3.3.3	Ova-spezifisches IgG2a	36
3.4	Zytokine in der bronchoalveolären Lavage.....	37
3.4.1	Interleukin 4.....	37
3.4.2	Interleukin 5.....	38
3.4.3	Interferon- γ	39
3.5	Zytokine in der Zellkultur	40
3.6	Zellen in der bronchoalveolären Lavage	41
3.6.1	Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage	41
3.6.2	Eosinophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage	41
3.6.3	Neutrophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage	43
3.6.4	Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage.....	44
3.6.5	Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage.....	44
3.7	Becherzellmetaplasie	46
4	Diskussion	48
4.1	Etablierung der intranasalen Immuntherapie im Mausmodell für allergisches Asthma	48
4.2	Spezifische Immuntherapie in Kombination mit einem IL-4/IL-13 Antagonisten	49
5	Zusammenfassung	53
6	Literatur	55

1 Einleitung

1.1 Soforttypallergien und atopische Erkrankungen

Aktuell leiden ca. 20% der Bundesbürger an Soforttypallergien wie Heuschnupfen und allergischem Asthma bronchiale oder an atopischem Ekzem. In den vergangenen Jahren haben diese Krankheitsbilder, die unter dem Begriff atopische Erkrankungen zusammengefasst werden, stark zugenommen. Meistens beginnt eine sogenannte Atopikerkarriere mit einer einzelnen, allergenspezifischen Sensibilisierung, die zu einem spezifischen atopischen Krankheitsbild führt. Im weiteren Verlauf gehen die atopischen Krankheitsbilder jedoch häufig ineinander über oder treten gleichzeitig auf, wobei eine Vielzahl weiterer allergischer Sensibilisierungen erworben wird (Holgate et al., 1999). Daher stellt sich die Frage nach den Ursachen für die Zunahme von allergischen Erkrankungen, den Regulationsmechanismen und daraus resultierend möglichen Einflussfaktoren für therapeutische Interventionen.

Bei atopischen Erkrankungen spielen T-Helferzellen vom TH2-Typ und deren Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 eine pathogenetisch entscheidende Rolle (Renz et al., 1995). Dabei gilt IL-4 als Schlüssel-Zytokin, weil es einerseits die Differenzierung von T-Helferzellen zum TH2-Phänotyp dirigiert und andererseits die Expression vieler anderer allergierelevanter Zytokine, Chemokine oder Adhäsionsmoleküle wie z.B. IL-5, IL-13, Eotaxin oder VCAM-1 induziert (Holgate et al., 1999) (Steinke and Borish, 2001) (Dabbagh et al., 1999). Weiterhin induziert IL-4 zusammen mit IL-13 in B-Zellen Klassenwechsel zu IgE und IgG4. Obwohl unter bestimmten Bedingungen in knockout Mäusen IgE-Synthese auch unabhängig von IL-4 und der IL-4 Rezeptor alpha Kette stattfinden kann, sind IL-4 und IL-13 bisher die einzigen bekannten Zytokine, die IgE-Klassenwechsel induzieren können (Corry and Kheradmand, 1999) (Grunewald et al., 2001). Die synthetisierten IgE Antikörper binden über hoch affine IgE- Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten und vermitteln nach Allergenkontakt die Degranulation der Effektorzellen und damit die für eine

Soforttypallergie typischen Symptome, wie Juckreiz, Rötung, Ödeme und akute bronchiale Spastik (Holt et al., 1999).

Bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale tritt zusätzlich zu der IgE-vermittelten Soforttypreaktion auch noch eine allergische Entzündung vom verzögerten Typ auf, mit einem spezifischen zellulären Infiltrat aus zahlreichen eosinophilen Granulozyten, welches zu chronischen Lungenerkrankungen mit Fibrose und Gewebeerstörung führen kann. Bei der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale ist diese eosinophile Entzündungsreaktion das entscheidende histologische Korrelat für die asthmatypische Atemwegshyperreaktivität gegenüber Metacholin. Die Initiierung, Regulation und Erhaltung des eosinophilen Entzündungszellinfiltrats wird entscheidend durch das Zytokin IL-5 vermittelt, welches für Differenzierung, Degranulation und Überleben von eosinophilen Granulozyten wichtig ist. Zusätzlich sind dabei neben IL-5 jedoch eine zunehmende Zahl weiterer Zytokine und Chemokine als Nebenspieler beteiligt (Holt et al., 1999) (Hamelmann et al., 1999). Aus transgenen und knockout Mausmodellen hat man wichtige Schlüsse für die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale ziehen können. Die Atemwegshyperreaktivität gegenüber Metacholin, ein klinisches Schlüsselsymptom von Asthma, ist mindestens durch drei verschiedene Hauptwege vermittelt (Leong and Huston, 2001) (Holt et al., 1999). Dabei ist scheinbar das hauptsächlich durch IL-5 induzierte eosinophile Entzündungszellinfiltrat der wichtigste Effektormechanismus bei der Pathogenese der Atemwegshyperreaktivität (Foster et al., 1996). Weitere Effektormechanismen laufen wie oben bereits erwähnt über IgE-vermittelte Mastzelldegranulation (Coyle et al., 1995) (Zuberi et al., 2000) oder über IL-13 vermittelte Mucingenexpression, Akkumulation von Hyaluronsäure, Becherzellmetaplasie und subepitheliale Fibrose (Zhu et al., 2001) (Walter et al., 2001).

Für die Manifestation von allergischem Asthma bronchiale sowie atopischer Dermatitis spielen hereditäre Faktoren eine wesentliche Rolle. Es gibt sogenannte Atopikerfamilien, die aufgrund ihrer genetischen Veranlagung dazu neigen, Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis zu entwickeln. In den letzten Jahren gelang es, in solchen Atopikerfamilien Punktmutationen in für die Allergieentstehung

relevanten Kandidatengenen, wie z.B. dem hochaffinen IgE- Rezeptor, dem Genlocus für IL-4, IL-5 und dem der IL-4 Rezeptor alpha Untereinheit zu identifizieren (Cookson et al., 1999). Da jedoch eine Veränderung von hereditären Faktoren, also des Genpools einer gesamten Population, nicht die starke Zunahme der Allergien in einer kurzen Periode von wenigen Jahren erklärt, sondern nur langfristige Veränderungen auslösen könnte, werden Umweltfaktoren für die aktuelle Zunahme der Allergien in unserer Gesellschaft verantwortlich gemacht. Es drängt sich daher die Frage auf, wie Umweltfaktoren die Ausprägung eines atopischen Phänotyps vermitteln können und an welcher Stelle ggf. therapeutisch Einfluss genommen werden kann, um das Auftreten einer Erkrankung zu verhindern bzw. Krankheitssymptome zu mindern und zu heilen. Wie oben bereits erwähnt weisen die experimentellen Daten darauf hin, dass eine Fehlregulation in der TH1/TH2-Balance pathogenetisch relevant für das Auftreten einer atopischen Erkrankung ist. Weiterhin gibt es deutliche Hinweise aus epidemiologischen Studien, die zeigen, dass die Abnahme der Exposition mit verschiedenen TH1-Polarisatoren die Zunahme von Allergien in unserer westlichen Bevölkerung erklärt und eine Polarisierung des TH1/TH2-Gleichgewichts in Richtung TH1 in der frühen Kindheit vor Allergien schützen kann (Cookson et al., 1999). So entscheidet zum Beispiel die Art und die Zahl der Infekte, welcher ein Mensch innerhalb seines 1. Lebensjahres exponiert ist, ob eine genetische Prädisposition tatsächlich zur Ausprägung eines atopischen Phänotyps führt und damit eine oder mehrere Allergien erworben werden. Weiterhin konnte die niedrige Inzidenz von Allergien bei Kindern in ländlicher Umgebung und die hohe Exposition dieser Kinder im 1. Lebensjahr mit dem TH1-Polarisator LPS, einem bakteriellen Membranbestandteil, das reichlich in Stallstaub vorhanden ist, assoziiert werden (Wahn und von Mutius, 2001) (von Mutius et al., 2000).

1.2 Immunologie bei atopischen Erkrankungen

1.2.1 Sensibilisierungsphase und Effektormechanismen bei Typ I

Allergien

Zwischen der Entstehung von Typ I Allergien und dem Auftreten von allergischen Symptomen bei Heuschnupfen oder allergischem Asthma liegen eine Reihe von immunologischen Vorgängen. Während der Entstehung einer Allergie wird ein Allergen im Körper von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und in kleine Peptide prozessiert. Über MHC Klasse II Moleküle auf den APC werden die Peptide präsentiert und von T-Zellrezeptoren auf ruhenden T-Lymphozyten (T₀) erkannt. Ein wichtiges kostimulatorisches Signal ist dabei die Interaktion von CD28 auf T-Zellen und B7 auf den präsentierenden Zellen. Die Art und Weise, wie und welche Signale auf die T-Zellen einwirken, entscheidet, ob sich aus der Vorläuferzelle eine proallergische TH2-Zelle und eine Typ 2-Antwort oder eine Typ 1-Antwort mit TH1-Lymphozyten entwickelt. Bei der allergischen Sensibilisierung entwickeln sich spezifische TH2-Zellen, die allergierelevante Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren. Die Interaktion zwischen aktivierten TH2-Zellen und ruhenden B-Zellen über CD40 und CD40 Ligand führt zur klonalen Expansion der B-Zellen. Dieses Signal induziert in Verbindung mit IL-4 in B-Zellen einen Klassenwechsel zu Antikörpern des IgE-Typs. IgE bindet im nächsten Schritt an hochaffine IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche von Effektorzellen wie z.B. Mastzellen und basophilen Granulozyten. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen, nach Inhalation von Pollen in der Schleimhaut, kann jetzt eine akute allergische Reaktion ablaufen. Dabei induziert das Allergen die Quervernetzung von IgE-Antikörpern, die über IgE-Rezeptoren an Effektorzellen gebunden sind. Dadurch erfolgt die Degranulierung dieser Zellen mit der Freisetzung von Mediatoren wie z.B. Prostaglandinen, Leukotrienen und Histamin, die für die allergischen Symptome wie Juckreiz, Schwellung und Bronchospasmus verantwortlich sind.

1.2.2 Aufrechterhaltung der Allergie und allergische Entzündung der Spätphase

Die verschiedenen Phasen der Immunantwort unterliegen der Plastizität und es kommt auf die Art und die Dauer der Immunstimulation an, ob eine akute oder chronische Entzündung entsteht. Im Rahmen der Chronifizierung der allergischen Entzündung spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle. Sie sezernieren proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α . In Verbindung mit den von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten sezernierten Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-5 wird die Lebensdauer der in die allergische Entzündung involvierten Zellen gesteuert und die allergische Reaktion unterhalten. Unter dem Einfluß dieser Zytokine werden Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen hochreguliert und damit die Extravasation und Transmigration von weiteren Entzündungszellen in den Ort des allergischen Geschehens ermöglicht (Eosinophile, Basophile, Monozyten). Die eosinophilen Granulozyten besitzen durch die von ihnen freigesetzten basischen Proteine (Eosinophilen kationisches Protein (ECP), eosinophilen Peroxidase (EPO), Major Basic Protein (MBP) eine ausgeprägte zyto- und neurotoxische Wirkung und führen damit zur Gewebeerstörung. In der chronischen Entzündung dominieren dann Gewebeabbau und -umbau, koordiniert durch entsprechende Enzyme (Elastase, Metalloproteinasen, Trypsinase, Kollagenase) und Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, TGF α/β). Die entscheidende regulatorische Funktion in der Entzündung übernehmen T-Zellen, wobei jedoch ein Wechsel der T-Zellpopulationen entsteht. TH2-Zellen und Zytokinen der Typ2-Antwort kommt dann eine untergeordnete Bedeutung zu. So findet man in chronisch lichenifizierten Läsionen einer atopischen Dermatitis eine Zunahme von T-Helferzellen, die Typ 1-Zytokine wie z.B. IFN- γ sezernieren (Allergologie; Springer-Verlag, Renz H.,1998).

1.3 Allergietherapie

1.3.1 Symptomatische anti-allergische und anti-entzündliche Therapien

Zur Hemmung der Synthese und Freisetzung von Mediatoren aus der Mastzelle stehen z.B. Medikamente wie Cromoglycinsäure und Ambroxol zur Verfügung (Heinke et al, 1995) (Barnes et al, 1999). H1-Antihistaminika blockieren Histaminrezeptoren und können so dessen Wirkung antagonisieren. Daneben haben sie jedoch auch unspezifische Wirkung auf die Synthese und Freisetzung von weiteren proinflammatorischen Mediatoren. Zusammen mit den Mastzellstabilisatoren stellen sie die anti-allergische Basistherapie dar. Sympathomimetika und Theophyllin eignen sich vor allem als Bronchodilatoren bei allergischem Asthma (Barnes et al,1996). Cyclosporin und Tacrolimus wurden aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung durch Hemmung der Signaltransduktion in T-Lymphozyten als Therapeutika bei verschiedenen T-Zell vermittelten Erkrankungen bekannt (Bieber et al., 1998). Kortikosteroide wirken auf eine Vielzahl von Zellen und können die Synthese einer Reihe von Zytokinen herunterregulieren (z.B. IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF, IFN γ) und damit immunsuppressive Wirkung entfalten (Barnes et al., 1998). Die intravenöse Injektion hoher Dosen wirkt sofort anti-allergisch, die verzögerte Wirkung entsteht durch eine Abnahme des entzündlichen Infiltrats aus Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen, Lymphozyten und Makrophagen. Damit kann die Geweberegeneration erfolgen (Allergologie; Springer-Verlag, Schmutzler).

1.3.2 Anti-IgE Antikörper

Die Antagonisierung und funktionelle Inaktivierung von IgE-Antikörpern ist ein weiterer Therapieansatz, der seit kurzem für die Behandlung von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale zugelassen ist. Dabei binden und eliminieren

monoklonale anti-IgE-Antikörper zirkulierende IgE-Moleküle, um so allergische Symptome zu mildern (Heusser and Jardieu, 1997).

1.3.3 Die allergenspezifische Immuntherapie

Derzeit gilt die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) neben der Allergenkenz als einzige Behandlungsform, die den natürlichen Verlauf allergischer Erkrankungen beeinflussen und bei Patienten mit IgE-vermittelter allergischer Rhinokonjunktivitis die Entwicklung eines Asthma bronchiale, den sogenannten Etagenwechsel, wahrscheinlich verhindern kann. Als Ergebnis zahlreicher immunologischer Veränderungen nehmen allergische Reaktionsbereitschaft und Entzündung langanhaltend ab. Eine Indikation zur spezifischen Immuntherapie (SIT) besteht bei nachgewiesener IgE-vermittelter Sensibilisierung mit korrespondierenden Atemwegssymptomen durch Allergene, bei denen eine Kenz nicht oder schwer möglich ist.

Der günstige Verlauf der allergischen Erkrankung bei erfolgreicher SIT bezieht sich offenbar nicht nur auf die Krankheitsprogression (Einfluss auf die bronchiale Hyperreaktivität, Verhinderung eines Asthma bronchiale) (Cools M et al., 2000) (Johnstone DE et al., 1968) (Moller C et al., 2002), sondern auch auf die Entwicklung von neuen, allergischen Sensibilisierungen (Pajno GB et al., 2001) mit Pollenallergenen, welche auch fünf Jahre nach Behandlungsabschluss in prospektiven, kontrollierten Studien belegt worden ist (Durham SR et al., 1999).

Die Wirkung der spezifischen Immuntherapie ist komplex und induziert zahlreiche immunologische Veränderungen. Allerdings ist das Wirkprinzip bis heute noch nicht vollständig geklärt.

1.3.3.1 Immunologische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie

Die spezifische Immuntherapie mit Allergenen greift kausal an den pathophysiologischen Mechanismen der IgE-vermittelten allergischen Erkrankung an (Kleine-Teppe et al., 1994). Einer der am frühesten nachweisbaren Effekte der SIT ist die Mastzellstabilisierung. Im Verlauf kommt es zu einer Abnahme der allergenspezifischen IgE-Antikörper, und neugebildete antigenspezifische IgG4-Antikörper lassen den Serum IgG4/IgE Quotienten weiter ansteigen (van Neerven et al., 1999). Zusätzlich wird die Rekrutierung von eosinophilen und basophilen Granulozyten in die allergische Entzündung gebremst (Pierkes M., 1999) (Wilson DR, Irani AM, 2001) (Wilson DR, Nouri-Aria, 2001).

Antigenspezifische T-Lymphozyten gelten als weiterer Zielmechanismus der SIT. Ihre Rolle für die Entstehung und Unterhaltung IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen konnte überzeugend belegt werden. T-Helfer-Typ 2 Zellen induzieren mit Hilfe der Interleukine IL-4 und IL-13 die IgE-Synthese und durch Produktion von IL-5 die von eosinophilen Granulozyten geprägte allergische Entzündung.

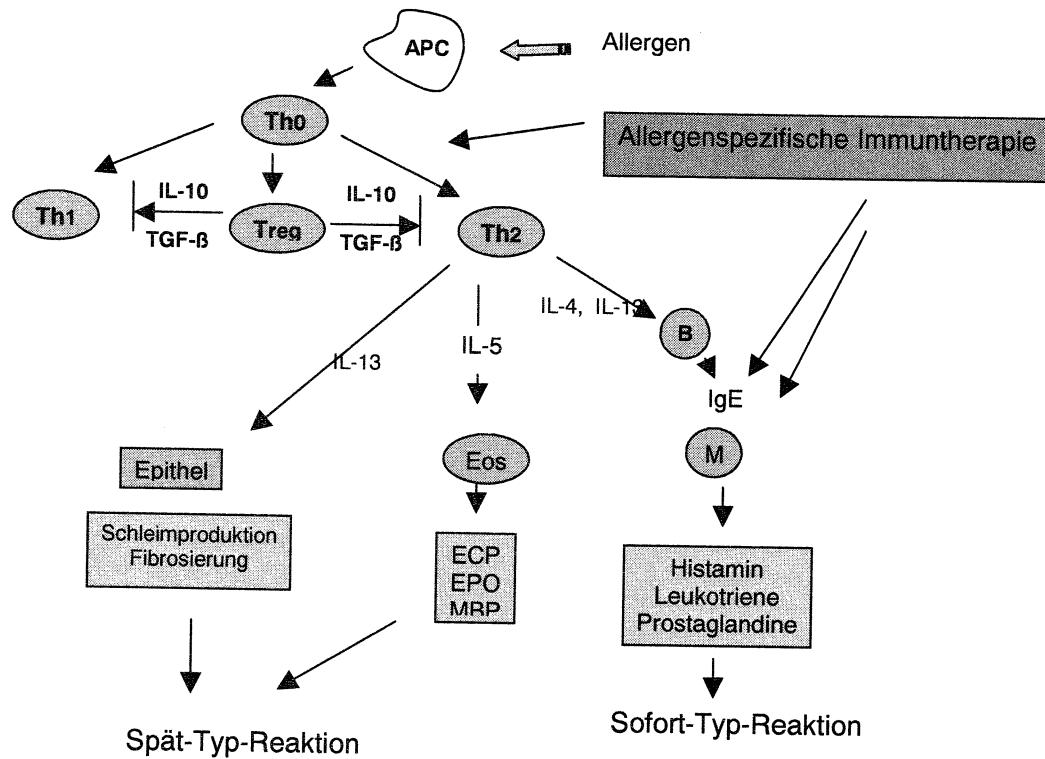


Abb. 1.1: Sensibilisierungsphase und Effektormechanismen bei Typ I Allergien

Im Verlauf einer SIT kommt es zu einer Abnahme von T-Helfer-2-Zellen, sowie zu einer Induktion einer gegenregulatorischen TH1-Immunantwort. Dabei stimuliert IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen (APZ) die Interferon- γ Produktion der TH1-Zellen (Akdis C et al., 2000). Daneben werden regulatorische T-Zellen induziert, welche immunantagonistische Zytokine wie TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) und IL-10 (Bellinghausen et al., 1997) produzieren.

1.3.3.2 Durchführung und Applikationsrouten der SIT

Mit zunehmender Anzahl placebokontrollierter Studien, die evidenzbasierten Kriterien standhalten (Abramson et al., 1999) (Abramson et al., 2000) (Malling HJ et al., 1998), hat sich die SIT als wichtige Behandlungsform allergischer Reaktionen und Soforttyp-allergischer Atemwegserkrankungen international etabliert (Bousquet et al., 1991).

Entscheidend für den Therapieerfolg sind die korrekte Indikationsstellung sowie die Einhaltung bestimmter Kriterien bei Durchführung der Therapie. Die früher verwendeten ungereinigten Allergenpräparationen, die zudem auch nur unzureichend standardisierte Allergenkonzentrationen enthielten, sind für den klinischen Einsatz obsolet. Heute sollen nur noch charakterisierte und standardisierte Allergenpräparationen zum klinischen Einsatz kommen. Die klinisch eingesetzten Präparate beruhen auf unterschiedlichen Konzepten. Bei den nativen Allergenpräparationen wird davon ausgegangen, dass das hochgereinigte in seinem Nativzustand befindliche Allergen am besten von den allergenpräsentierenden Zellen erkannt, phagozytiert und den T-Zellen präsentiert wird. Durch Modifikation der Allergenextrakte verspricht man sich eine Veränderung der allergenen Struktur, die bewirkt, dass allergenspezifische Antikörper das Allergen nicht mehr erkennen. Dieser Effekt der Allergenmodifikation wird auch als Maskierung der B-Zell-Epitope bezeichnet. Entsprechende Präparate werden als Allergoide bezeichnet (Bousquet J et al, 1998) (Dreborg S et al., 1993). Die Emulgation mit Aluminiumhydroxid führt zu einer verzögerten Freisetzung des Allergens, dies ist das Prinzip der Semidepotpräparate. Diese langsamere Freigabe der Allergene hat sich aufgrund geringerer unerwünschter Wirkungen besonders in der ambulanten Behandlung bewährt.

Die SIT wird als subkutane und mukosale (orale bzw. sublinguale) Therapie in deutschsprachigen Ländern eingesetzt; erstere stellt die derzeit wichtigste Therapieform dar.

Subkutane Applikation

Die subkutane SIT darf nur von einem allergologisch erfahrenen Arzt durchgeführt werden, der auch zur Notfallbehandlung unerwünschter Begleitreaktionen in der Lage ist. Die Injektion erfolgt mit einer 1ml-Spritze streng subkutan, eine Hand breit über dem Olecranon, bevorzugt an der Streckseite der Oberarme (Kleine-Teppe et al., 2000). Nach der Injektion muss der Patient mindestens 30 min. unter ärztlicher Kontrolle bleiben.

Der Therapieerfolg hängt unter anderem von der kumulativen Allergendosis ab (Bousquet J et al., 1998). Bei der subkutanen SIT mit Inhalationsallergenen werden die Allergen-bzw. Allergoidextrakte vorwiegend als Semidepot-Präparate angewandt. Der Therapieabstand liegt in der Steigerungsphase (häufig Verdopplung der vorherigen Dosis) zwischen 3 bis 7 Tagen bei wässrigen Lösungen und 1 bis 2 Wochen bei Semidepot-Lösungen. Bei Erreichen der tolerablen Maximaldosis können die Injektionsabstände bis auf 4 Wochen vergrößert werden. Je nach Präparat sind in Einzelfällen auch längere Abstände möglich. Die Dauer der SIT sollte bei Atemwegsallergien mindestens 3 Jahre betragen. Bei Allergenen wie Hausstaubmilben, Berufsallergenen und Tierepithelien ist die Umwelt so zu gestalten, dass die Allergenexposition möglichst gering gehalten wird.

Bei der subkutanen SIT mit Insektengiftallergenen stehen zur Zeit Bienen- und Wespengiftextrakte in wässriger Lösung und Semidepot-Präparate zur Verfügung. Die Therapie wird häufig stationär im Schnellverfahren mit wässrigen Lösungen und diversen Steigerungsempfehlungen eingeleitet. In Deutschland wird häufig die sogenannte konventionelle Rush-SIT eingesetzt, bei der in der Regel nach einer Woche die Maximaldosis erreicht wird, während Ultra-Rush-SIT dieses Ziel in zwei Tagen anstrebt. Anschließend wird die Therapie ambulant üblicherweise mit der Maximaldosis von 100 µg Insektengiftprotein fortgesetzt und der Injektionsabstand auf 4 Wochen gesteigert. Die SIT mit Insektengift wird in der Regel über 3-5 Jahre durchgeführt.

Sublinguale Applikation (mukosale Therapie)

In jüngerer Zeit durchgeführte kontrollierte Studien bieten Hinweise dafür, dass die sublinguale Immuntherapie (SLIT) bei Pollen- (La Rosa et al., 1999) (Pradalier A et al., 1992) bzw. Hausstaubmilbenallergie (Bousquet J et al., 1999), möglicherweise eine wirksame Behandlungsvariante darstellt (Frew AJ et al., 2003). Andere Studien zeigten kaum nennenswerte oder nur mäßige klinische Effekte (Voltolini S et al., 2001). Eine lokale (z.B. sublinguale) SIT mit Allergenen hat aufgrund der fehlenden Invasivität gerade im Kindesalter potentielle Vorteile. Allerdings wird die Allergenapplikation ohne ärztliche Aufsicht kontrovers beurteilt, zumal orale und gastrointestinale

Beschwerden (Andre C et al., 2000) sowie, wenn auch äußerst selten, leichte systemische Reaktionen nach sublingualer SIT berichtet wurden (Lüderitz-Püchel, Gesundheitsforschung und Gesundheitsschutz 2001). Allerdings liegen zur optimalen Dosierung und Behandlungsdauer bzw. endgültigen Bewertung von Wirksamkeit und Sicherheit der lokalen Therapieformen noch keine ausreichenden Daten vor (Frew AJ et al., 2001), (Kleine-Teppe et al., 2000).

Bei dieser neueren Therapieform sind im Gegensatz zur subkutanen SIT bisher nur diskrete immunologische Veränderungen festgestellt worden, so dass diesbezüglich weiter Forschungsbedarf besteht (Lima MT et al., 2002).

Intranasale/Intrabronchiale Immuntherapie

Eine Alternative zur subcutanen SIT stellt die intranasale bzw. intrabronchiale Applikationsform des Allergens bei der Immuntherapie dar. Das Konzept zur intranasalen Behandlung der saisonalen allergischen Rhinokonjunktivitis ist nicht neu (Welsh PW et al., 1981) (Nickelsen JA et al., 1983) (Georgitis JW et al., 1986). Eine intranasale Behandlung mit wässrigen ragweed-Extrakten, 6 mal pro Tag, jahreszeitlich vor der Pollenexposition, konnte die Symptome während der Pollenexposition reduzieren, jedoch traten während der Behandlung verstärkt Nebenwirkungen im Sinne von rhinokonjunktivalen Beschwerden auf (Welsh PW et al., 1981). Eine Behandlung mit dem Allergenextrakt jeden zweiten Tag erbrachte schließlich vergleichbare gute klinische Ergebnisse und war deutlich besser verträglich (Nickelsen JA et al., 1983).

Eine Prämedikation mit topischem Cromoglycin konnte die intranasalen und intrabronchialen Nebenwirkungen weitestgehend beseitigen (Andri L et al., 1993). Eine nasale Immuntherapie konnte nachweislich die klinischen Symptome und den medikamentösen Bedarf bei ganzjähriger oder jahreszeitlich abhängiger Rhinokonjunktivitis reduzieren (Andri L et al., 1993) (D'Amato G et al., 1995) (Andri L et al., 1995). Keine Änderung ergab sich bei den spezifischen Hautreaktionen (Andri L et al., 1993) (Andri L et al., 1995).

Jedoch zeigte sich bei Patienten, die mit intranasaler Immuntherapie behandelt wurden 24 Stunden nach Allergen-Challenge eine Reduktion von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und eine Abnahme von ICAM-1 in ihren nasalen Epithelzellen, was eine lokale immunologische Reaktion auf die Behandlung darstellt (Passalacqua G et al., 1995).

1.3.3.3 Neue experimentelle Strategien der SIT

Um die Effektivität der SIT zu steigern und Nebenwirkungen, insbesondere unerwünschte Soforttyp-Reaktionen nach Allergeninjektion, zu reduzieren, sind verschiedene Entwicklungen absehbar. Eine kombinierte Anwendung der SIT mit Anti-IgE-Antikörpern ist offenbar geeignet, potenzielle Nebenwirkungen bei besserem Therapieeffekt zu verringern (Kühr J et al., 2002). Mit Hilfe gentechnologischer Methoden können auf der Basis rekombinanter Allergene hypoallergene Varianten (z.B. Allergen-Polymere, -Isoformen) konfiguriert werden, die von T-Zellen erkannt werden, ohne IgE-Antikörper auf Effektorzellen zu aggregieren. Adjuvantien können die TH1-Zell-Entwicklung fördern; Allergene kombiniert mit Immunmodulatoren (z.B. TH1 fördernde Zytokine, bakterielle DNS) können möglicherweise die Wirksamkeit der SIT steigern (Ball T et al., 1999).

In Anbetracht dieser neuen Strategien sind die Perspektiven der SIT durchaus vielversprechend, da sich offenbar mit Hilfe des biotechnologischen Fortschritts das Konzept der SIT mit Allergenen auf faszinierende Weise weiterentwickeln lässt.

1.3.4 Experimentelle Allergietherapie

1.3.4.1 Genterapie

Im Tierversuch erschien die allergenspezifische Genterapie vielversprechend. In einem Allergiemodell in der Maus konnte gezeigt werden, dass die intradermale Applikation von plasmidkodierte Allergensequenzen die Induktion von spezifischen TH1 Zellen

auslöst, welche zur Synthese von spezifischen Antikörpern vom IgG2 und IgG3 Subtyp führten. Darüber hinaus konnte eine bestehende spezifische IgE-Synthese durch die Plasmidvaccinierung in 6 Wochen um 75% reduziert werden. Die langfristigen Nebenwirkungen einer Gentherapie sind noch nicht untersucht. Trotzdem bietet die allergenspezifische Immuntherapie mit plasmidkodierten Antigenen in Zukunft möglicherweise eine sichere und wirksame Alternative zur Hyposensibilisierung (Raz et al., 1996).

1.3.4.2 Immunmodulation durch Zytokine und Zytokinantagonisten

Es erscheint bei atopischen Erkrankungen therapeutisch sinnvoll, gezielt durch eine Immunmodulation mit den entsprechenden Zytokinen auf das TH1/TH2-Gleichgewicht Einfluss zu nehmen. Zum einen ist es möglich, die TH2-Antwort direkt durch Antagonisierung der Zytokine IL-4, IL-5 oder IL-13 zu blockieren. Zum anderen wäre auch eine Behandlung mit TH1- Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ denkbar, da sie indirekt zur Hemmung der TH2-Entwicklung führt. Eine gezielte Hemmung des TH2-Systems wäre jedoch aufgrund der Wechselwirkungen mit anderen Immunreaktionen einer Stimulation des TH1- Systems wahrscheinlich vorzuziehen. Der besondere Vorteil einer gezielten Immunmodulation durch Blockade des TH2-Systems gegenüber den derzeit effizientesten Therapien von atopischen Erkrankungen mit Steroiden oder Immunsuppressiva wäre die Spezifität ihrer Wirkung, die nach dem aktuellen Kenntnisstand, ermittelt anhand von Daten aus knockout Mäusen, die Defekte im TH2 System zeigen, wahrscheinlich weitgehend nebenwirkungsfrei vermittelt wäre (Kühn et al., 1991) (Kopf et al., 1993) (Takeda et al., 1996) (Shimoda et al., 1996).

Die Blockade von TH2 dominierten Immunreaktionen kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. So sind bisher Moleküle bekannt, welche die Zytokine selbst oder deren Rezeptoren z.B. durch anti-sense DNA, Antikörper oder lösliche Rezeptoren blockieren oder auch Antagonisten von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen (Barnes, 1999) (Barnes, 2001).

Potenzielle selektive IL-4-Hemmstoffe sind zum Beispiel die lösliche extrazelluläre Domäne der IL-4-Rezeptor alpha Kette (sIL-4R α) oder Antikörper gegen IL-4. Beide verringern in Mausmodellen für allergisches Asthma die Induktion einer allergenspezifischen IgE-Antwort, beziehungsweise hemmen das Auftreten einer Atemwegshyperreaktivität gegenüber Metacholin, wobei das eosinophile Entzündungszellinfiltrat in Mäusen nur gering beeinflusst wird (Renz et al., 1996) (Corry et al., 1996) (Henderson et al., 2000). Klinische Studien bei Patienten mit mittelschwerem Asthma und inhalativer Anwendung von sIL-4R α haben nach Absetzen des Steroids eine signifikante Besserung des Asthmascores bei wöchentlicher Inhalation mit 3 mg sIL-4R α erbracht. Medikamentenassoziierte Nebenwirkungen wurden bisher keine beobachtet (Borish et al., 2001).

Mit Hilfe eines selektiven IL-13 Antagonisten, einem Fusionsprotein aus der löslichen IL13 Rezeptor alpha Kette verbunden mit IgGFc oder einem Kaninchenantiserum gegen IL-13, konnte in Mausmodellen für allergisches Asthma die Atemwegshyperreaktivität, die Becherzellmetaplasie und die eosinophile Entzündung vermindert werden (Grunig et al., 1998) (Wills-Karp et al., 1998) (Blease et al., 2001). Zusätzlich ist auch ein mutiertes IL-13 Protein (E13K) bekannt, welches als Rezeptorantagonist fungiert und welches *in vitro* IL-13 Funktionen inhibiert (Oshima and Puri, 2001). Untersuchungen *in vivo* sind dazu noch nicht bekannt.

Da IL-4 und IL-13 eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit teilen, die IL-4- Rezeptor alpha Kette, besteht die Möglichkeit durch gezielte Hemmung dieser Untereinheit die Funktionen beider Zytokine gleichzeitig zu blockieren. Neben Antikörpern gegen die IL-4 Rezeptor alpha Kette wurden bisher die *in vivo* Effekte von 2 mutierten IL-4 Molekülen (Q116DY119D; bzw. C118 Deletion) untersucht. Im Mausallergiemodell konnte mit Hilfe dieser Rezeptoren die IgE- Produktion sowie die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität und einer Eosinophilie verhindert werden (Grunewald et al., 1998) (Tomkinson et al., 2001).

Auch zur Antagonisierung von IL-5 stehen aktuell verschiedene Moleküle zur Verfügung. Die Hemmung von IL-5 wurde *in vitro* mit Hilfe der löslichen IL-5

Rezeptor alpha Kette (Tavernier et al., 1991) (Monahan et al., 1997) und mit IL-5 Rezeptor auf Peptidbasis erzielt. Außerdem steht ein als Rezeptorantagonist agierendes mutiertes humanes IL-5 Protein (E12K oder E13Q) zur Verfügung, in welchem die für die Bindung an die IL-5 Rezeptor beta Kette verantwortlichen Aminosäuren ausgetauscht wurden (Tavernier et al., 1995) (McKinnon et al., 1997). Untersuchungen zur *in vivo* Wirkung dieses Antagonisten sind bisher keine bekannt, da IL-5 wie IL-4 ein spezies-spezifisches Zytokin ist und somit mutierte humane IL-5 Proteine nicht zu *in vivo* Untersuchungen im naheliegenden murinen System herangezogen werden (Tsuruoka et al., 1993).

Im Mausasthmamodell wurden bisher die *in vivo* Effekte einer Behandlung mit anti-IL-5-Antikörpern und einer aktiven Vakzinierung zur Induktion einer autologen anti-IL-5-Antikörperantwort untersucht. Dabei konnte das Auftreten einer eosinophilen Entzündungszellreaktion sowie die Atemwegshyperreaktivität verhindert werden (Hertz et al., 2001) (Hamelmann et al., 1999) (Blumchen et al., 2001).

In ersten preliminären klinischen Untersuchungen bei Patienten mit mildem allergischem Asthma gelang es mit einem humanisierten anti-IL-5-Antikörper, die Eosinophilie in Blut und Sputum deutlich zu hemmen. Allerdings war die Behandlung nicht in der Lage, die asthmatische Spätreaktion nach Allergenstimulation und die Atemwegshyperreaktivität zu beeinflussen (Leckie et al., 2000).

Unter den Therapiemöglichkeiten durch Zytokine und Zytokinantagonisten erscheint die Hemmung des IL-4 Systems durch seine zentrale Rolle therapeutisch am aussichtsreichsten. Erste *in vivo* Versuche zur Hemmung des IL-4 Systems bei Allergien in der Maus erscheinen sehr vielversprechend. Die Entwicklung eines Allergietherapeutikums auf der Ebene der Immunmodulation sollte dementsprechend IL-4 und möglichst auch IL-13 Funktionen *in vivo* effizient hemmen, zudem gut verträglich und nicht immunogen sein. Die genaue Kenntnis über Struktur und Funktion des IL-4 Rezeptorsystems ermöglicht dabei ein rationales Design.

1.3.4.3 Design von antagonistischen IL-4 Mutanten

Humanes IL-4 bindet an seinen Rezeptor mit einer K_d im subnanomolaren Bereich, ähnlich wie viele andere 4-Helix Bündel Proteine, die mit Mitgliedern der Zytokin/Hämatopoetin-Rezeptorsuperfamilie interagieren. Im IL-4 System ist diese Interaktion vor allem durch die extrazelluläre Domäne der IL-4R α Kette determiniert. Durch systematische Mutationsanalysen sind zwei Bereiche von IL-4 identifiziert worden, die für die Interaktion mit dem Rezeptorkomplex wichtig sind. Durch den Ersatz der entsprechenden Aminosäuren entweder durch Alanin (Alanin Scanning) oder durch Aminosäuren mit geladenen Resten (Charge Scanning) wurde ein kontinuierlicher Patch aus wenigen, vor allem polaren oder geladenen Aminosäuren an den Helices A und C identifiziert, die für die Bindung an die IL-4R α verantwortlich sind. Die Bindung kommt dabei durch elektrostatische Wechselwirkung zustande. Das Epitop für die Dissoziation besteht aus zwei gegenüberliegenden Hauptdeterminanten (Glu-9, Arg-88), die von fünf Seitenkettendeterminanten (Ile-5, Thr-13, Arg-53, Asn-89, Trp-91), mit kleinerer Bedeutung, umgeben sind. Das Epitop für die Assoziation wird durch fünf positiv geladene Reste auf der C-Helix (Lys-77, Arg-81, Lys-84, Arg-85, Arg-88) und zwei benachbarte Reste auf der Helix A (Glu-9, Thr-13) gebildet (Wang et al., 1997).

Ein zweiter Bereich im IL-4 Molekül ist für die Bindung der zweiten Rezeptoruntereinheit (γ_c , IL-13R α) verantwortlich. Dabei handelt es sich um eine niedrigaffine Bindung, die im Anschluss an die Bindung von IL-4 an die IL-4R α zustande kommt. Die Substitution der Aminosäuren Arginin 121, Tyrosin 124, und Serin 125 durch geladene Aminosäuren (Asparaginsäure) am Ende der D-Helix im IL-4 Molekül erlaubt nach wie vor die hochaffine Bindung an die IL-4 R α , löst aber keine Rezeptoraktivierung und Signalübertragung aus (Kruse et al., 1993).

Durch Crosslinking mit radioaktiv markierten Liganden ist gezeigt worden, dass Mutationen in der Site II des IL-4 Moleküls die Aufnahme von γ_c in den Rezeptorkomplex verhindern (Duschl, 1995). Eine einzelne Mutation von Tyrosin 124 zu Asparaginsäure verhindert bereits, dass das mutierte IL-4 Proliferation von T-Zellen auslösen kann (Kruse et al., 1992). Wird zusätzlich Arginin 121 gegen Asparaginsäure

ausgetauscht, ist auch für sensitivere IL-4 induzierte Differenzierungsreaktionen auf B-Zellen kein Effekt mehr messbar (Tony et al., 1994). Die Site II Mutanten von IL-4 hemmen neben IL-4 vermittelten Effekten auch IL-13, da beide Zytokine die IL-4R α Untereinheit in ihrem Rezeptorkomplex enthalten (Tony et al., 1994) (Grunewald et al., 1997). Diese Eigenschaften machen Site II Mutanten zu Kompetitiven für IL-4 und IL-13.

Diese IL-4/IL-13 Antagonisten stellen einen vielversprechenden Weg zur therapeutischen Intervention bei Typ I Allergien dar. Das größte Hindernis für eine Untersuchung der biologischen Wirkung und der therapeutischen Effekte von antagonistischen Mutanten ist die Spezies-Spezifität von IL-4. Es besteht keine Kreuzreaktivität zwischen humanem und murinem IL-4. Da humanes IL-4 nicht an den Mausrezeptor bindet, können humane antagonistische Mutanten nicht in der Maus auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Dies hat dazu geführt, durch Mutationsanalysen und Sequenzalignement im Vergleich mit humanen einen IL-4/IL-13 für das Maussystem zu entwickeln. Dabei wurden die Aminosäuren Glutamin an Position 116 und Tyrosin an Position 119 durch Asparaginsäure ersetzt (Q116D, Y119D). Für das murine IL-4 Mutein konnte gezeigt werden, dass IL-4 und IL-13 *in vitro* und auch *in vivo* wirksam gehemmt werden (Grunewald et al., 1997) (Grunewald et al., 1998, Hahn et al, 2003).

Ziele:

In der folgenden Arbeit sollte ein Mausmodell für die allergenspezifische Immuntherapie etabliert werden, um zu prüfen, ob durch einen kombinierten Einsatz von etablierten Behandlungskonzepten für Typ I Allergien wie z.B. der spezifischen Immuntherapie und einer Immunmodulation durch IL-4/IL-13 Hemmstoffe eine Optimierung des Behandlungserfolges erreicht werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AHR:	Airway Hyperresponsiveness
BAL:	bronchioalveoläre Lavage
BSA:	Bovines Serum Albumin
d:	Tag
ELISA:	Enzyme linked immunosorbent Assay
FCS:	fetales Kälberserum
goat:	Ziege
h:	Stunde
HRP:	Horseradish-Peroxidase
IL:	Interleukin
IL-4R α :	IL-4-Rezeptor-Alphauntereinheit
i.p.:	intraperitoneal
i.n.:	intranasal
-/-:	knockout
min:	Minute
NaOH:	Natronlauge
OD:	optische Dichte
OVA:	Ovalbumin
PBS:	phosphate buffer saline
RT:	Raumtemperatur
RU:	relative Units/Einheiten
s:	Sekunden
SIT:	spezifische Immuntherapie
U/min:	Umdrehungen/Minute
VVK:	Venenverweilkatheter

2.2 Herstellernachweis

Altromin, Lage, Deutschland
Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Biochrom, Berlin, Deutschland
Boehringer, Mannheim, Deutschland
Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon, Heidelberg, Deutschland
Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland
Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
PAA, Cölbe, Deutschland
Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schott, Mainz, Deutschland
Sigma, München, Deutschland

2.3 Chemikalien, Proteine und Enzyme

PBS:

NaCl 80 g

Na₂HPO₄ 11,6 g

KH₂PO₄ 2 g

KCL 2 g

ad 10l Aqua dest

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und war bei einer Lagerung von 4°C mehrere Monate haltbar.

ELISA Waschpuffer:

PBS

0,1% Tween (Sigma)

eingestellt auf pH 7

ABTS Detektionslösung:

ABTS (Roche Mannheim)

c= 1mg/ml in Lösungspuffer

ABTS Lösungspuffer:

Natriumperborat 3,25 mM

Zitronensäure 39,8 mM

Na₂ HPO₄ 60 mM

pH 4-4,5

BSA:

Bovines Albumin (ICN Biomedicals Inc., Ohio, Amerika)

Antikörper:

Biotin anti-mouse IgE (Pharmingen)

HRP anti-mouse IgG1 (Pharmingen)

HRP anti-mouse IgG2a (SBA)

HRP anti-mouse IgG2b (SBA)

Anti-CD 3 (Pharmingen)

Anti-mouse IL-13 (Pharmingen)

Anti-mouse IL-13 biotinylated (Pharmingen)

Cytokinsets:

Opt EIA Set: Mouse IL-4 (Pharmingen)

Opt EIA Set: Mouse IL-5 (Pharmingen)

Opt EIA Set: Mouse IFN- γ (Pharmingen)

TMB Substrat (Pharmingen)

Avidin-HRP(Pharmingen)

Clickmedium:

RPMI-Medium1640 (Biochrom; FZ 9995) mit folgendem Zusatz:

FCS 5% (PAA)

L- Glutamin (Sigma) 2 mM

Hepes (Sigma) 10 mM

Sodium Pyruvat (Sigma) 1 mM

β -Mercaptoethanol (Sigma) 500 nM

Penicillin (Sigma) 100 U/ml

IL-4/IL-13 Antagonisten

Die Herstellung des IL-4/IL-13-Antagonisten erfolgte im E. coli Expressionssystem in der Physiologischen Chemie II nach etabliertem Protokoll (Hahn et al, JACI 2004) und wurde für die Arbeiten zur Verfügung gestellt.

2.4 Tiere

Für die Versuche wurden weibliche Balb/c Mäuse im Alter von 6-8 Wochen der Fa. Charles River/Sulzfeld verwendet. Die Haltung erfolgte im Tierstall der Hautklinik der Universität Würzburg unter folgenden Bedingungen: Raumtemperatur 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 40-50%, 20-facher Luftwechsel pro Stunde und Beleuchtung 12 Stunden bei 3000 Lux., Altromin Standard Diät und Leitungswasser stand ad libitum zur Verfügung. Nach einer sieben Tage dauernden Akklimatisierungsphase wurde mit den Versuchen begonnen.

2.5 Tierversuche

2.5.1 Narkose und Einschläferungstechniken

2.5.1.1 Injektionsnarkose

Für eine Narkose (bis zu 30 min) wurde die Ketamin/Xylazine Narkose verwendet. Dazu wurde eine Kombination aus Ketavet[®], Parke Davis Freiburg (Ketamin: 80 µg/g Maus) und Rompun[®], Bayer Leverkusen (Xylazine 2%: 10µg/g Maus) intraperitoneal gespritzt.

2.5.1.2 Einschläferungstechniken

Die schnellste Methode ist dabei die cervicale Dislokation, die sofort zum Tod führt. Zur Durchführung einer bronchoalveolären Lavage erhielt die Maus eine Letalnarkose intraperitoneal, die der 10-fachen Konzentration einer Injektionsnarkose mit den verwendeten Narkotika entspricht.

2.5.2 Blutentnahmetechnik

Blut wurde 5 min nach Infrarot-Bestrahlung der Maus durch eine Venotomie aus der Schwanzvene entnommen. Dazu wurde die Vene mit einem Skalpell (Bayha 15) angeritzt und austretendes Blut aufgefangen.

2.5.3 Sensibilisierung, spezifische Immuntherapie und Therapie mit den IL-4/IL-13 Antagonisten

Die Mäuse wurden narkotisiert und auf dem Rücken liegend behandelt. Es wurden pro Maus 50 µl Ovalbumin Grade V (Sigma) in einer Konzentration von 1 mg/ml PBS mit

einer Pipette intranasal appliziert. Die allergische Sensibilisierung mit OVA erfolgte einmal wöchentlich über einen Zeitraum von insgesamt 4 Wochen.

Im Anschluss an die Sensibilisierung erfolgte bei einer Gruppe eine spezifische Immuntherapie mit steigenden OVA Dosen wie in Tab. 1. angegeben. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Mäusen während der SIT mit einem IL-4/IL-13 Antagonisten (QY) behandelt. Dazu wurde lyophilisiertes QY in Aqua dest. gelöst. Pro Maus wurde 10 µg QY/30 µl einer Lösung aus steigenden OVA Konzentrationen entsprechend der spezifischen Immuntherapie (siehe Tab. 1.) in PBS appliziert.

2.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Nach Sensibilisierung, Therapie und Letalanästhesie erfolgte ein Schnitt durch Fell und subkutane Strukturen zwischen Thorax und dem rechten Vorderbein bis zum Erreichen der Arteria axillaris. Nach Durchtrennen der A. axillaris erfolgte das Ausbluten der Tiere. Dies war notwendig, da ansonsten Erythrozyten in die Lunge austreten und die Auswertung der BAL unmöglich machen. Nun erfolgte nach einer Desinfektion mit Ethanol 80% das Eröffnen des Halses und die Freipräparation der Trachea. Anschließend wurde ein kleiner Schnitt in die Trachea gesetzt, der gerade so groß war, dass eine Kanüle (Verweilkatheter grün) eingeführt werden konnte. 1 ml PBS wurde in einer Tuberkulinspritze aufgezogen, diese mit dem liegenden Verweilkatheter verbunden und wiederholt gespült (3-4 mal). Bei optimalem Ergebnis erhielt man rund 0,8 ml BAL-Flüssigkeit. Die Lavageflüssigkeit wurde in vorbereitete Gefäße mit 100 µl FCS (PAA) gegeben und auf Eis gestellt.

2.6.1 Zytospin und zytologische Untersuchung der zellulären Zusammensetzung in der BAL- Flüssigkeit

Das Zählen der Zellen (Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten) pro ml erfolgte mit einer Zählkammer (Neubauer improved, Marienfeld). Dazu wurden 20 µl

Lavageflüssigkeit mit 20 µl Trypanblau (Kontrastverstärkung; tote Zellen können identifiziert werden, da sich der Farbstoff an sie anlagert) 1:1 verdünnt. Nachdem bekannt war, wie viele Zellen in 1 ml Lavageflüssigkeit sind, wurde die Zellzahl auf 20000 in 100-200 µl PBS/FCS eingestellt.

Zentrifuge: Cytospin 2, Shandon. Als Zentrifugeneinsatz wurden ein Metalleinsatz, ein adhäsionsbeschichteter Objektträger (Histobond, Marienfeld), ein gelochter trockener Filter und ein Kunststoffaufsatz benötigt. Die Zentrifugeneinsätze wurden mit der vorbereiteten BAL-Flüssigkeit beschickt und 10 Minuten bei 600 U/min zentrifugiert. Die Objektträger wurden nach Abschluss der Zentrifugation vorsichtig entnommen, getrocknet und mit Diff-Quick (Dade, Marburg) gefärbt, was einer Giemsa-Färbung entspricht. Abschließend wurden die Objektträger nach cytologischen Kriterien auf ihren Gehalt an Eosinophilen, Neutrophilen, Mastzellen und Lymphozyten ausgezählt.

2.7 Histologie

2.7.1 Fixierung in Paraffin und Schneiden

Die entnommenen Lungenlappen wurden zunächst 24 h in 10% phosphat-gepuffertem Formalin fixiert, dann mit aufsteigender Alkoholreihe (70% bis absolut) zur Entfernung des Fixierungsmittels weiter behandelt. Folgend wurde das Material mittels flüssigem Paraffin (56°C) durchtränkt und zum Block gegossen. Nach Verfestigung des Blocks wurden mit dem Rotationsmikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt.

2.7.2 Färbungen

2.7.2.1 Hämatoxilin & Eosin Färbung

Die 4 µm dicken Schnitte wurden auf dem Objektträger getrocknet (Superfrost plus, Menzel) und mittels Xylol vom Eindeckungsmittel befreit (entparaffiniert). Vor der Färbung wurden sie über eine absteigende Alkoholreihe (absolut – 70%) in Wasser

überführt. Danach erfolgte eine Färbung in Hämatoxin über 2 x 5 min und Eosin über 2 min. Die Fixierung erfolgte in umgekehrter Reihenfolge durch Aqua dest. über die aufsteigende Alkoholreihe zum Xylol.

2.7.2.2 PAS- Färbung (Periodic acid Schiff- Reaktion)

Die 4 µm dicken Schnitte wurden auf dem Objektträger getrocknet (Superfrost plus, Menzel), entparaffiniert und in Wasser überführt. Eine anschließende 15 minütige Perjodsäure-Behandlung führte zur Oxidation von Polysacchariden und ließ freie Aldehydgruppen entstehen. Nach Spülung mit Aqua dest. verband sich während der 15 minütigen Inkubation mit fuchsinschwefliger Säure selbige mit diesen Aldehydgruppen zu einem roten Farbstoff. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxin erfolgte die Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol.

2.7.3 Beurteilung der Becherzellmetaplasie

Nach erfolgter Sensibilisierung bzw. spezifischer Immuntherapie wurden den Mäusen die Lungenlappen entnommen und anschließend wie oben beschrieben fixiert und mit PAS gefärbt. Die Präparate wurden anhand eines Becherzell-scores beurteilt; 0 = keine Becherzellen und keine Schleimproduktion, 1 = vereinzelte Becherzellen und geringe Schleimproduktion, 2 = mäßige Becherzellen und deutliche Schleimproduktion, 3 = viele Becherzellen und starke Schleimproduktion.

2.8 Bestimmung von OVA-spezifischen Antikörpern durch ELISA

Die Antikörpertiter von OVA-spezifischen Immunglobulinen in immunisierten Mäusen wurden nach Immunisierung im Serum bestimmt. Dazu wurde Blut aus der Schwanzvene entnommen. Nach einer Ruhephase von mindestens 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C wurden die Proben bei 12000 rpm (Minifuge,

Heraeus) 20 min. zentrifugiert, die Seren abgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Bestimmung der Antikörpertiter gelagert.

Die ELISA-Platten (Falcon 3912) wurden für 6 h bei 37°C mit $100\text{ }\mu\text{l/well}$ mit einer Lösung aus $100\mu\text{g/ml}$ Ovalbumin und $0,1\text{ M NaHCO}_3$ pH 8,2 beschichtet. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschlösung gewaschen und mit $200\text{ }\mu\text{l/well}$ 3% BSA in PBS 2 h bei 37°C geblockt. Das zu bestimmende Serum wurde in $100\text{ }\mu\text{l}$ PBS/1% BSA gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die einzelnen Seren wurde jeweils eine Verdünnungsreihe angelegt und auf jeder Platte lief ein Kontrollserum mit. Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugierten Antikörpern gegen schwere Ketten der Maus- Immunglobuline (Ratten monoklonale Antikörper gegen Maus IgE und IgG1) (Pharmingen) (Ziegen Antiseren gegen IgG2a und IgG2b) (SBA über Biozol). Die Antikörper wurden in einer Lösung mit 1% BSA in Waschlösung zu $100\text{ }\mu\text{l/well}$ aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde jeweils dreimal mit Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde das Substrat ABTS in $100\text{ }\mu\text{l/well}$ aufgetragen. Nach 20 – 60 min wurden die Platten in einem Mikrotiterplatten-Autoreader (SLT Spectra) bei 405 nm abgelesen und anhand der Verdünnungsreihen die jeweiligen Titerstufen bestimmt.

2.9 Bestimmung von Zytokinen durch ELISA

Die ELISA Platten (Mikrowellplatten, 96 Nunc; Falcon) wurden mit Lösungen der jeweiligen Antikörper in $0,1\text{ M NaHCO}_3$ pH 8,2 mit $50\text{ }\mu\text{l/well}$ beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 10% BSA in PBS $200\text{ }\mu\text{l/well}$ für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Proben bzw. die Standards wurden in einem Gesamtvolumen von $50\text{ }\mu\text{l/well}$ in 3% BSA in PBS aufgetragen, eine Verdünnungsreihe angefertigt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Detektionsantikörper wurde gemeinsam mit dem Enzym ebenfalls in einem Gesamtvolumen von $50\text{ }\mu\text{l/well}$ in 3% BSA in PBS aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Danach wurden $150\text{ }\mu\text{l/well}$ TMB Substrat dazugegeben und die Reaktion nach 30 min mit $50\text{ }\mu\text{l/well}$ mit $1\text{ M H}_3\text{PO}_4$ abgestoppt. Die Platten wurden in einem Mikrotiterplatten-Autoreader (SLT Spectra) bei 450 nm gelesen. Zwischen den

einzelnen Arbeitsschritten wurde jeweils 5-8x mit Waschpuffer, PBS + 0,1% Tween gewaschen.

Die Proben der bronchoalveolären Lavage wurden unverdünnt mit 50 µl/well eingesetzt.

2.10 Lymphknotenentnahme und in vitro T-Zell-Stimulation

Zur Entnahme der Lymphknoten bekamen die Mäuse die oben beschriebene Letalanästhesie. Nachdem die Mäuse auf keinen Schmerzreiz mehr reagierten, wurde ein Schnitt unterhalb des rechten Vorderbeins bis zur A. axillaris vorgenommen, um die Maus ausbluten zu lassen, da es ohne ein vorheriges Ausbluten unmöglich wäre, die entsprechenden Lymphknoten aufzufinden. Anschließend wurde die Maus mit 80% Ethanol desinfiziert, der Thorax freipräpariert und seitlich aufgeschnitten, die paratrachealen und parahilären Lymphknoten entnommen und in Petrischalen mit 1ml Medium (Click RPMI 1640; Biochrom) auf Eis gegeben. Zur Gewinnung der T-Zellen wurden die Lymphknoten durch sterile Siebe (Hartenstein, Filtergewebe Best.Nr. PES 3) gestrichen, mit Medium gewaschen und in vorbereitete Falconröhrchen gefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 1500 U/min 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 ml Click Medium aufgefüllt. Die Gesamtzellzahl wurde auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die so gewonnenen T-Zellen wurden auf verschieden vorbereitete Mikrotiterplatten gebracht.

Eine Platte wurde mit Anti-CD 3 (01081 D; Pharmingen) über Nacht beschichtet und anschließend 30 µl einer IL-2 haltigen Lösung aufgetragen. Auf eine zweite Platte wurden 30 µl/well Click Medium aufgetragen und auf eine dritte Platte 30 µl/well einer Ovalbuminlösung 100 µg/ml. In jedes Well wurden 200 µl der Zellsuspension dazu pipettiert und die Platten anschließend 48 bzw. 72 Std. bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde weggenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20°C eingefroren.

2.11 Statistische Methoden

Die statistische Signifikanz wurde für normalverteilte Daten mit einem unpaaren T-Test untersucht. Nicht normalverteilte Daten oder Daten mit ungleicher Varianz wurden mit dem Mann-Whitney Rank-Test auf Signifikanz überprüft. Werte für $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Mausmodells zur intranasalen allergenspezifischen Immuntherapie

Um die Wirkung der spezifischen Immuntherapie (SIT) zu prüfen, wurde ein adäquates Tiermodell konzipiert. Dazu wurden Balb/c Mäuse mit OVA sensibilisiert. OVA wurde in einer Dosis von 50 µg in 30 µl PBS viermal in wöchentlichen Abständen intranasal appliziert. Um die Entwicklung der Allergie und den Verlauf der Immuntherapie zu erkennen, wurden OVA spezifische IgE- Antikörper untersucht.

In Abb.3.1 erkennt man, dass eine intranasale Applikation des Allergens ohne Narkose zu keiner Ausbildung von OVA spezifischen IgE-Antikörpern führt. Eine denkbare Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass das Allergen möglicherweise nicht in das bronchoalveoläre System gelangt, da es verschluckt und über das gastrointestinale System eliminiert wird. Alternativ könnte so auch eine orale Toleranz entstehen.

Daher wurde in einem zweiten Versuch das Allergen intranasal in Narkose appliziert. In Abb.3.1 zeigt sich in narkotisierten OVA sensibilisierten Mäusen eine erfolgreiche allergische Sensibilisierung mit kontinuierlichem Anstieg der OVA spezifischen IgE Antikörper Titer (902 ± 637 ; n=9).

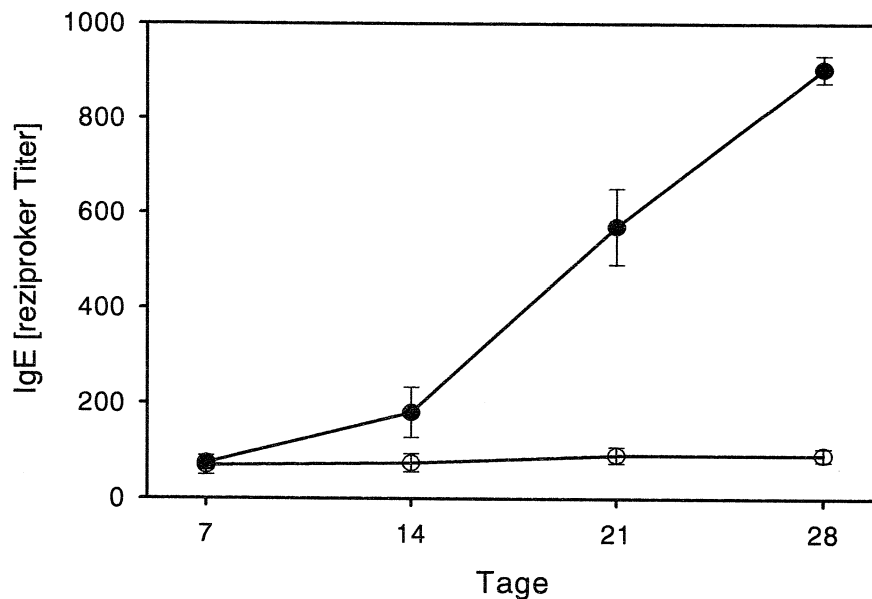


Abb.3.1.: IgE Titer im Verlauf der Sensibilisierung, n=9; ○ = ohne Narkose und ● = mit Narkose;

Im Anschluss an die allergische Sensibilisierung wurde den einzelnen Versuchsgruppen OVA in ansteigender Dosis von 1 µg bis 1 mg über 3 Wochen intranasal appliziert bzw. PBS zur Kontrolle (s.Tab.1).

3.2 Allergenspezifische Immuntherapie in Kombination mit einer Immunmodulation durch einen IL-4/IL-13 Antagonisten im Mausmodell für allergisches Asthma

Balb/c Mäuse wurden mit OVA sensibilisiert und anschließend hyposensibilisiert im Sinne einer intranasalen allergenspezifischen Immuntherapie wie oben beschreiben. OVA wurde in einer Dosis von 50 µg in 30 µl PBS unter Vollnarkose viermal in wöchentlichen Abständen intranasal appliziert. Anschließend wurde den einzelnen Versuchsgruppen OVA in ansteigender Dosis von 1 µg bis 1 mg über 3 Wochen, in sieben Einzeldosen, intranasal appliziert bzw. PBS zur Kontrolle. Gleichzeitig wurde


einem anderen Teil der Mäuse zusätzlich zu der spezifischen Immuntherapie mit OVA der IL-4/IL-13 Antagonist QY appliziert.

Im Experiment wurden vier Gruppen mit jeweils 10 Mäusen festgelegt. Die einzelnen Gruppen wurden 28 Tage lang einmal wöchentlich mit OVA sensibilisiert. An Tag 0 (d0) und Tag 28 (d28) erfolgten jeweils venöse Blutentnahmen. Eine Versuchsgruppe erhielt wöchentlich 30 µl PBS intranasal und diente somit als negative Kontrollgruppe. Drei andere Versuchsgruppen erhielten jeweils 50 µg OVA in 30 µl PBS

Die Gruppe, welche schon während der Sensibilisierung nur PBS bekam, erhielt auch während der Phase der spezifischen Immuntherapie nur PBS intranasal und hatte somit zu keinem Zeitpunkt Kontakt mit OVA. Ein anderer Teil der Mäuse, die mit OVA sensibilisiert wurden, erhielt ebenfalls im Anschluss nur noch PBS intranasal, hatte somit nur während der Sensibilisierungsphase Kontakt mit dem Allergen. Zwei weitere Gruppen, welche beide mit OVA sensibilisiert wurden, erhielten anschließend als spezifische Immuntherapie OVA in ansteigenden Dosen von 1 µg bis 1 mg, wobei ein Teil der Mäuse noch zusätzlich jeweils 10 µg des IL-4/IL-13 Antagonisten erhielt.

Vor Beendigung des Versuchs fanden am Tag 61 und 62, bzw. Tag 62 und 63 zweimalige OVA- Challenges mit jeweils 50 µg OVA in 30 µl PBS intranasal für alle Gruppen statt. Venöse Blutentnahmen erfolgten an Tag 58, 63 und 64.

Tabelle 1.



Tag	Keine Sensibilisierung	Ova Sensibilisierung	Ova Sensibilisierung +SIT	Ova Sensibilisierung +SIT +QY	
0	PBS	OVA (50µg)	OVA (50µg)	OVA (50µg)	wöchentl. Sensibilisierung
7	PBS	OVA (50µg)	OVA (50µg)	OVA (50µg)	
14	PBS	OVA (50µg)	OVA (50µg)	OVA (50µg)	
21	PBS	OVA (50µg)	OVA (50µg)	OVA (50µg)	
28	PBS	OVA (50µg)	OVA (50µg)	OVA (50µg)	
33	PBS	PBS	OVA (1µg)	OVA (1µg) +QY (10µg)	Therapieschema
36	PBS	PBS	OVA (5µg)	OVA (5µg) +QY (10µg)	
40	PBS	PBS	OVA (25µg)	OVA (25µg) +QY (10µg)	
43	PBS	PBS	OVA (125µg)	OVA (125µg) +QY (10µg)	
47	PBS	PBS	OVA (625µg)	OVA (625µg) +QY (10µg)	
50	PBS	PBS	OVA (1000µg)	OVA (1000µg) +QY (10µg)	
54	PBS	PBS	OVA (1000µg)	OVA (1000µg) +QY (10µg)	

PBS: Phosphate buffered saline, OVA: Ovalbumin, QY: IL-4/IL-13 Antagonist

3.3 OVA-spezifische Antikörper

3.3.1 OVA-spezifisches IgE

Wie in der Abb.3.2 zu sehen, zeigt sich an Tag 28 bei den Mäusen, die mit OVA sensibilisiert wurden, ein Anstieg der OVA spezifischen IgE-Antikörper -Titer (902+/- 637; n=9).

Bei den Mäusen, welche über den gesamten Zeitraum nur PBS appliziert bekamen und somit keinen Kontakt mit dem Allergen OVA hatten, konnte kein OVA spezifisches IgE nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Sensibilisierung erfolgte die spezifische Immuntherapie. Bei den Mäusen, die nach erfolgter Sensibilisierung keinen weiteren Kontakt zu OVA hatten, blieben die IgE-Spiegel über den gesamten Zeitraum annähernd konstant (1001 \pm 624; n=9).

Bei den Therapiemäusen, die OVA gemäß Immunisierungsprotokoll in ansteigender Dosis intranasal appliziert bekamen, kam es am Ende des Experiments zu einer signifikanten Reduktion der OVA spezifischen IgE- Antikörper auf Mittelwerte von 259 \pm 127 (n=9, p=0,0002). Durch die zusätzliche Gabe des IL-4/IL-13 Antagonisten konnte dieser Effekt nicht weiter verstärkt werden (n=9; p=0.93)

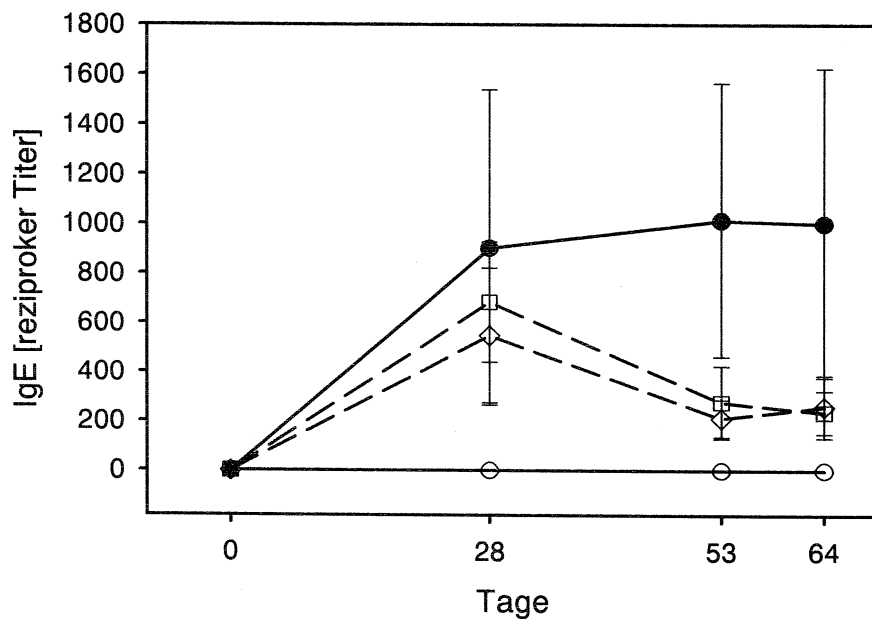


Abb.3.2: OVA spez. IgE im Verlauf von Tag 0 bis Tag 64;

○ = Kontrollmäuse, kein Kontakt mit OVA, (n=9)

● = OVA sensibilisierte Mäuse (n=9)

◇ = OVA sensibilisierte Mäuse, mit anschließender SIT (n=9)

□ = OVA sensibilisierte Mäuse, mit anschließender SIT + OY (n=9)

3.3.2 Ova-spezifisches IgG1

Durch eine wöchentliche Sensibilisierung mit 50 µg OVA konnte man an Tag 28 in allen mit OVA behandelten Mäusen eine OVA spezifische Immunantwort mit IgG1 messen (Mittelwerte 9.366+/-1.882). Die Gruppe mit den unsensibilisierten mit PBS behandelten Mäusen produzierte kein OVA spezifisches IgG1.

Von den Tagen 33 bis 53 erfolgte die Behandlung mittels spezifischer Immuntherapie, wie bereits im Versuchsaufbau beschrieben. Bei den Mäusen, die nach OVA Sensibilisierung keinen Kontakt mehr mit dem Allergen hatten und nur noch mit PBS behandelt wurden, kam es zunächst zu einem geringfügigen Anstieg von IgG1 bis zu Tag 53, der jedoch nach zweimaligen OVA Challenges bis zu Tag 64 wieder abfiel. Bei den mittels SIT behandelten Mäusen kam es bis zu Tag 53 zu einem starken Anstieg der IgG1 Antikörper auf Mittelwerte von 1.098.388+/-250.262, welche bis zu Tag 64 konstant blieben. Bei den Mäusen mit zusätzlicher Gabe des IL-4/IL-13 Antagonisten zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zu der mit SIT behandelten Gruppe ohne Antagonisten. Die Mittelwerte lagen bei 3.561.210+/-2.469.668.

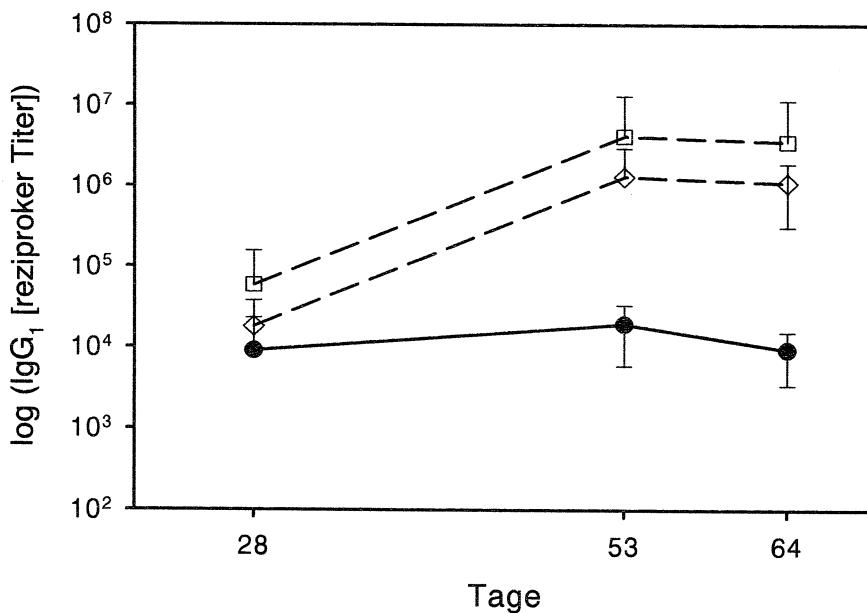


Abb.3.3: OVA spez. IgG1 im Verlauf von Tag 0 bis Tag 64.

● = OVA sensibilisierte Mäuse (n=9)

◇ = OVA sensibilisierte Mäuse, mit anschließender SIT (n=9)

□ = OVA sensibilisierte Mäuse, mit anschließender SIT + OY (n=9)

3.3.3 Ova-spezifisches IgG2a

An Tag 28, nach der Sensibilisierungsphase, konnte man in allen mit OVA behandelten Mäusen eine deutliche IgG2a Produktion messen (Mittelwerte 3.107 ± 1.369), im Vergleich zu den nur mit PBS behandelten Mäusen, welche keine IgG2a Produktion zeigten.

Durch die spezifische Immuntherapie kam es bei diesen Mäusen zu einem deutlichen Anstieg der IgG2a Spiegel im Serum auf Mittelwerte von 45.069 ± 13.184 , während bei den Mäusen, die nach der Sensibilisierung keinen Kontakt mehr mit OVA hatten, die Werte nur geringfügig zunahmten. Die zusätzlich Gabe eines IL-4/IL-13 begleitend zu der spezifischen Immuntherapie erbrachte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Die Mittelwerte lagen bei 37.086 ± 12.502 .

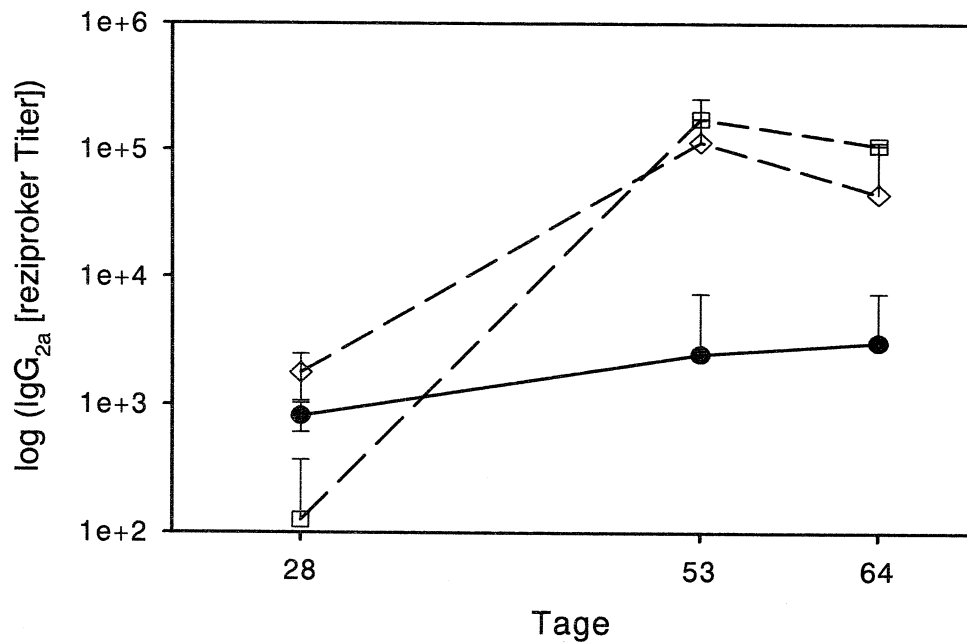


Abb.3.4: OVA spez. IgG2a im Verlauf von Tag 0 bis Tag 64..

- = OVA sensibilisierte Mäuse (n=9)
- ◇ = OVA sensibilisierte Mäuse, mit anschließender SIT (n=9)
- = OVA sensibilisierte Mäuse, mit anschließender SIT + OY (n=9)

3.4 Zytokine in der bronchoalveolären Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage wurde bei den Mäusen nach Abschluss der Sensibilisierungs- und Therapiephase an Tag 63 bzw. 64 im Anschluss an zweimalige OVA Challenges durchgeführt und die Konzentrationen der einzelnen Zytokine, IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ mittels ELISA bestimmt.

3.4.1 Interleukin 4

Bei den Mäusen ohne OVA Kontakt konnten nur geringe Werte von IL-4 gemessen werden (24,4+/-43,3 pg/ml; n=11). Durch eine Sensibilisierung mit OVA steigen die

mittleren IL-4 Konzentrationen in der BAL an (174+/-169 pg/ml; n=9, p=0,012) und fallen durch eine SIT wieder ab (46,6+/-51,8 pg/ml; n=11, p=0,028). Die sehr hohen Konzentrationen von IL-4 in der BAL bei den Mäusen, die zusätzlich mit dem Antagonisten behandelt wurden, kamen durch den intranasal applizierten IL-4/IL-13 Antagonisten zustande, welcher im IL-4 ELISA mit dem IL-4 Antikörper durch die große Ähnlichkeit der Moleküle kreuzreagiert, und ließen keine Aussage zu den tatsächlich vorhandenen IL-4 Konzentrationen zu.

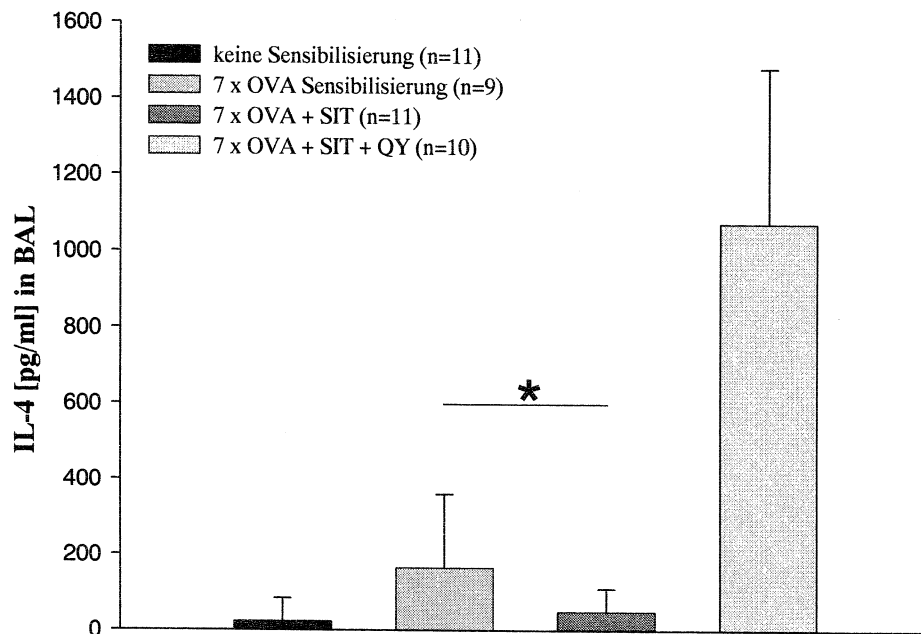


Abb.3.6: Interleukin-4 Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage

3.4.2 Interleukin 5

Durch eine Sensibilisierung mit OVA kam es bei allen Mäusen zu einem deutlichen Anstieg von IL-5 (474+/-146 pg/ml; n=7, p=0,0006), (Abb.3.7) im Vergleich zu den ausschließlich mit PBS behandelten Mäusen (34+/-16 pg/ml; n=7). Durch eine anschließende spezifische Immuntherapie kam es zu einem signifikanten Abfall der IL-5 Konzentration (123+/-37 pg/ml; n=7, p= 0,0006), welche sich durch zusätzliche Gabe eines IL-4/IL-13 Antagonisten nochmals senken ließ (99+/-41 pg/ml; n=7). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (p=0,38).

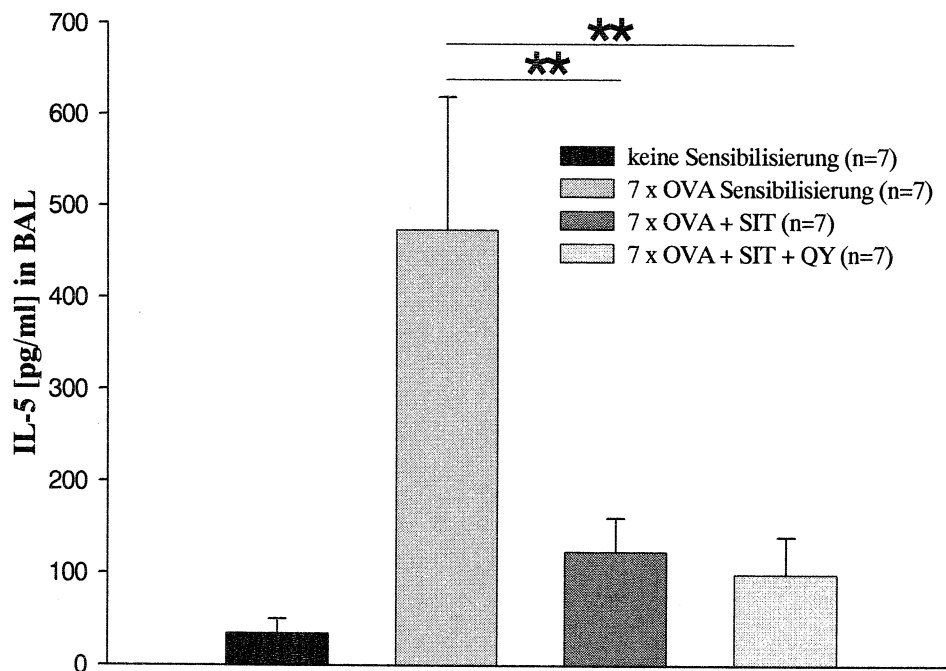


Abb.3.7: Interleukin-5 Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage

3.4.3 Interferon- γ

Durch die SIT kam es zu einem signifikanten Anstieg der IFN- γ Werte in der bronchoalveolären Flüssigkeit (940 ± 200 pg/ml; n=7) sowohl im Vergleich zu unbehandelten OVA sensibilisierten Mäusen ($637 \pm 157,8$ pg/ml; n=8, p=0,00041), als auch im Vergleich zu den unsensibilisierten Kontrollmäusen ($609 \pm 132,3$ pg/ml; n=8, p=0,005).

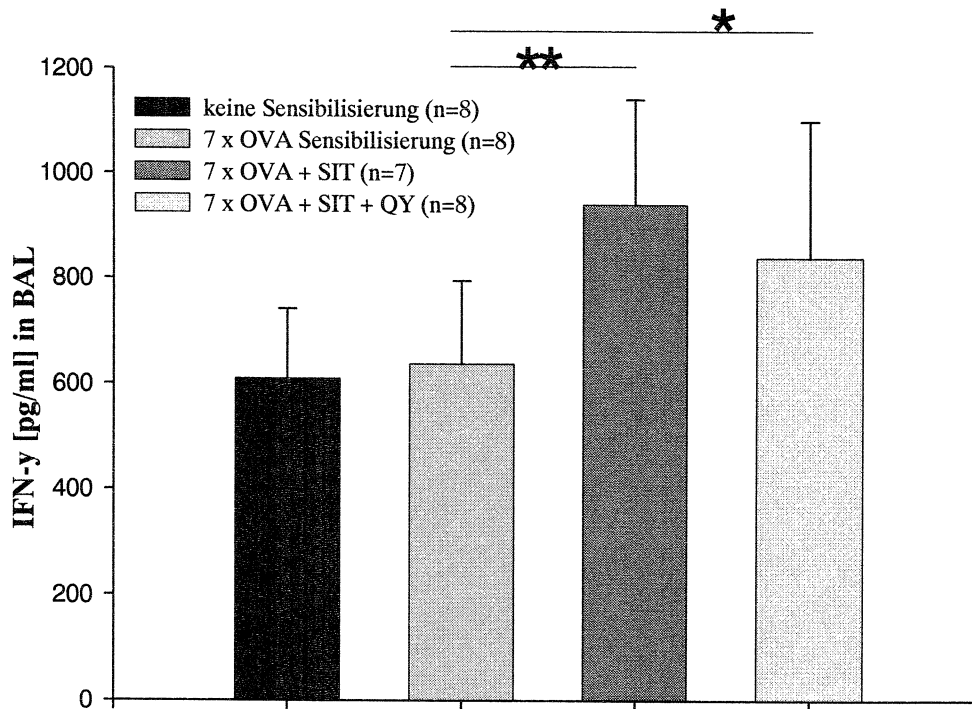


Abb.3.8: Interferon- γ Konzentrationen in der bronchoalveolären Flüssigkeit

3.5 Zytokine in der Zellkultur

Aus den entnommenen mediastinalen Lymphknoten wurden die T-Zellen *in vitro* mit OVA und IL-2 stimuliert und anschließend die sezernierten Zytokine IL-4 und IFN- γ gemessen.

Dabei zeigte sich, dass die IL-4 Produktion in den mediastinalen Lymphknoten nach *in vitro* Restimulation mit OVA, durch eine SIT in Kombination mit dem IL-4/IL-13 Antagonisten signifikant reduziert ist ($6,6 \pm 7,3$ pg/ml; n=11, p=0,02), im Vergleich mit ausschließlich durch SIT behandelten Mäusen ($39,8 \pm 42,6$ pg/ml; n=11,). Unsensibilisierte Mäuse erreichten Werte von $5,1 \pm 7,3$ pg/ml; n=7. Kein signifikanter Unterschied fand sich zwischen OVA sensibilisierten Mäusen ($33,2 \pm 31,3$ pg/ml; n=12) und den Mäusen, welche mit SIT behandelt wurden ($39,8 \pm 42,6$ pg/ml; n=11, p=0,93).

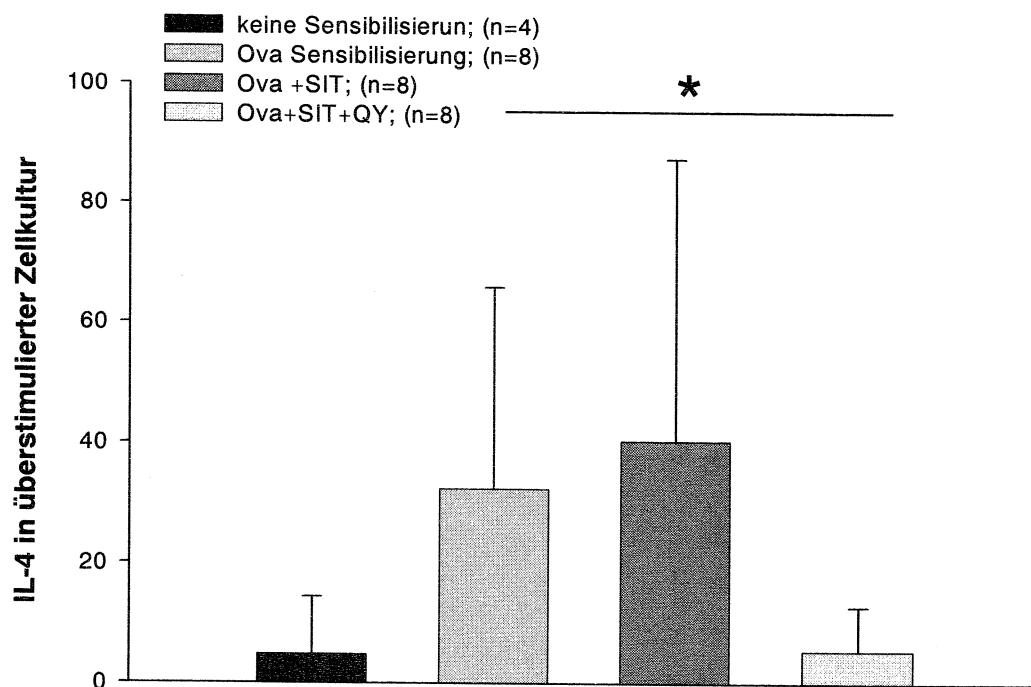


Abb.3.9: IL-4 Sekretion in Zellkulturüberständen

3.6 Zellen in der bronchoalveolären Lavage

3.6.1 Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage

Nach dem zweimaligen Challenge mit OVA an Tag 62 und Tag 63 wurde bei den Mäusen eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt, die Zellen anschließend mittels einer Zentrifuge auf einen Objektträger aufgebracht, eingefärbt und unter dem Mikroskop gezählt.

Alle Gruppen zeigten hinsichtlich der Gesamtzellzahl ähnliche Werte.

3.6.2 Eosinophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage

In der BAL zeigten Mäuse, die nur mit OVA behandelt wurden, eine deutliche Reaktion mit einer Eosinophilie in der Lavageflüssigkeit ($20\% \pm 12$; $n=14$) im Vergleich zu

unsensibilisierten Mäusen ($0,5\% \pm 0,73$; $n=16$, $p < 0,0001$). Davon unterschieden sich deutlich die Mäuse, welche anschließend mit einer spezifischen Immuntherapie behandelt wurden, mit einem signifikanten Rückgang der Eosinophilen ($11\% \pm 7,9$, $n=14$, $p < 0,031$ im Vergleich zu OVA sensibilisierten Mäusen). Einen weiteren Effekt zeigte die zusätzliche Gabe des IL-4/IL-13 Antagonisten. Der Prozentsatz an Eosinophilen in der BAL konnte durch eine zusätzliche IL-4/IL-13 Inhibition im Vergleich zu den ausschließlich mit SIT behandelten Mäusen nochmals etwas weiter gesenkt werden ($6,5\% \pm 4,3$; $n=15$, $p < 0,15$). Dieser Unterschied war jedoch im Vergleich zu ausschließlich mit SIT behandelten Mäusen statistisch nicht signifikant.

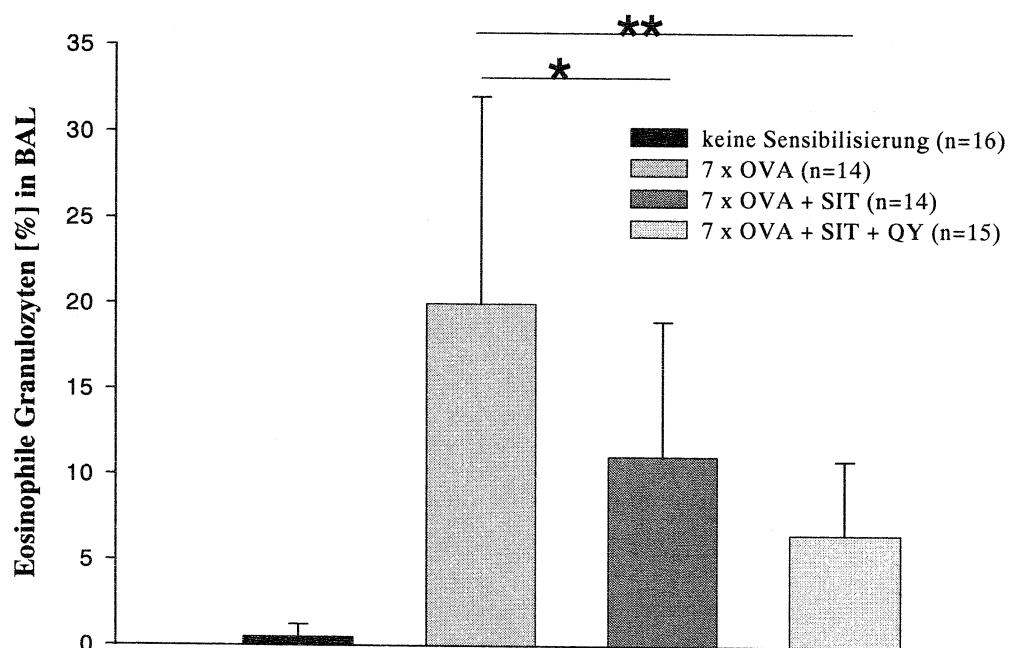


Abb.3.10: Eosinophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage

3.6.3 Neutrophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage

Durch eine OVA-Sensibilisierung kam es hinsichtlich der neutrophilen Granulozyten zu einem Anstieg (161000 Zellen/ml +/-74690,) im Vergleich zu den unsensibilisierten Mäusen (44687 Zellen/ml +/-27924). Die nachfolgende Behandlung mittels SIT (194250 Zellen/ml +/-105907, $p < 0,43$) bzw. SIT +QY (244000Zellen/ml +/-85796) lies die neutrophilen Granulozyten nochmals ansteigen, zeigte jedoch in beiden Fällen keine Signifikanz.

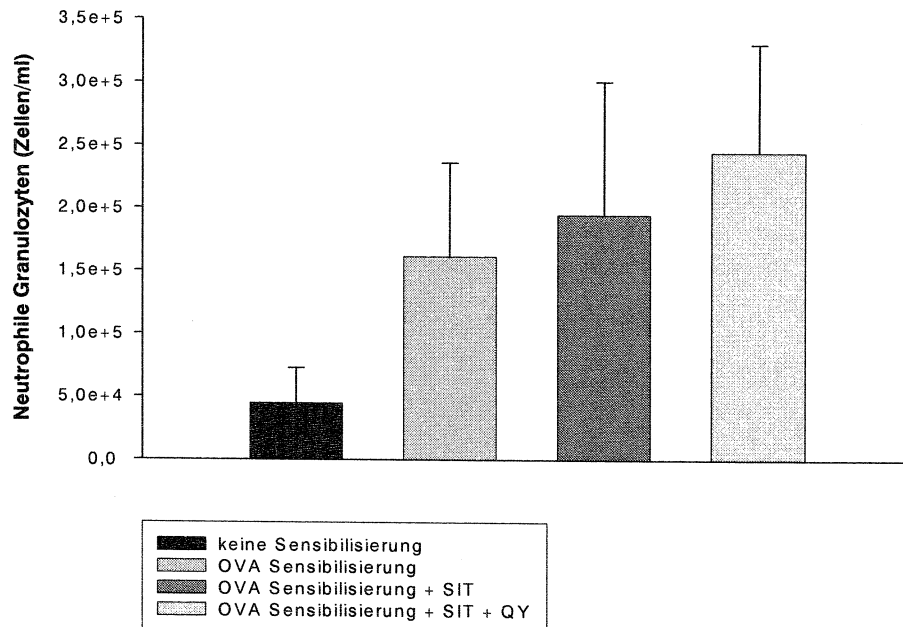


Abb.3.11: Neutrophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage

3.6.4 Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage

Die Anzahl der Makrophagen in der BAL liegt bei unsensibilisierten Mäusen bei 25000 Zellen/ml +/-8895. Bei den OVA sensibilisierten Mäusen (103529 Zellen/ml +/-68857, bzw. durch eine anschließende SIT (109917 Zellen/ml +/- 60033, p=0,459), bzw. SIT und IL-4/IL-13 Inhibition (127238 Zellen/ml +/- 66777, p=0,23) behandelten Mäusen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

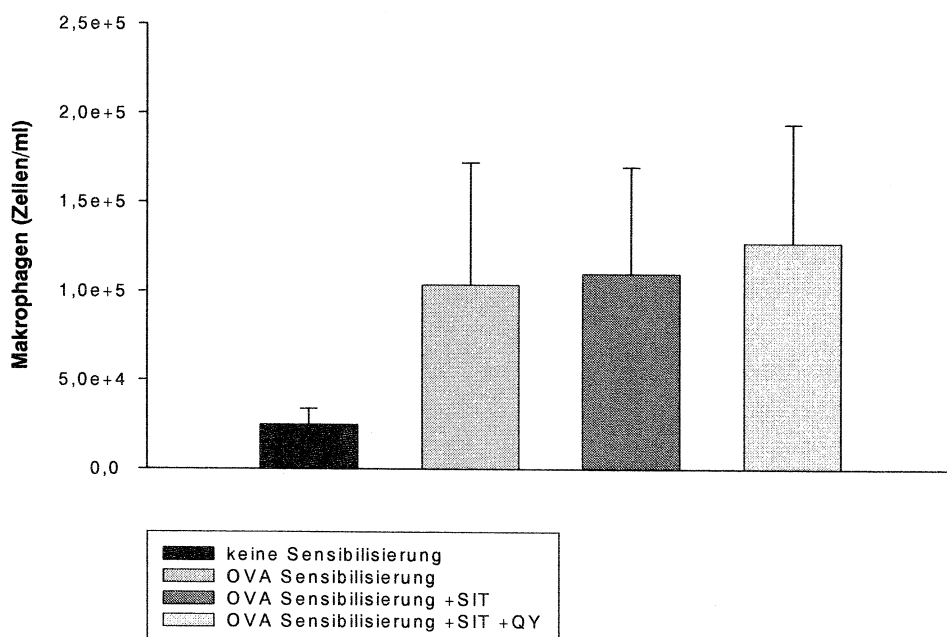


Abb.3.12: Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage

3.6.5 Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage

Die Lymphozyten zeigten bei den unsensibilisierten bzw. sensibilisierten Mäusen nahezu identische Zellzahlen von durchschnittlich 3800 Zellen/ml +/-2586, jedoch kam es durch die SIT zu einer Zunahme der Lymphozyten (11733 Zellen/ml +/-10242, p=0,12), welche sich durch eine zusätzliche Gabe eines IL-4/IL-13 Antagonisten noch verstärken ließ (19287 Zellen/ml +/-9791, p=0,0015).

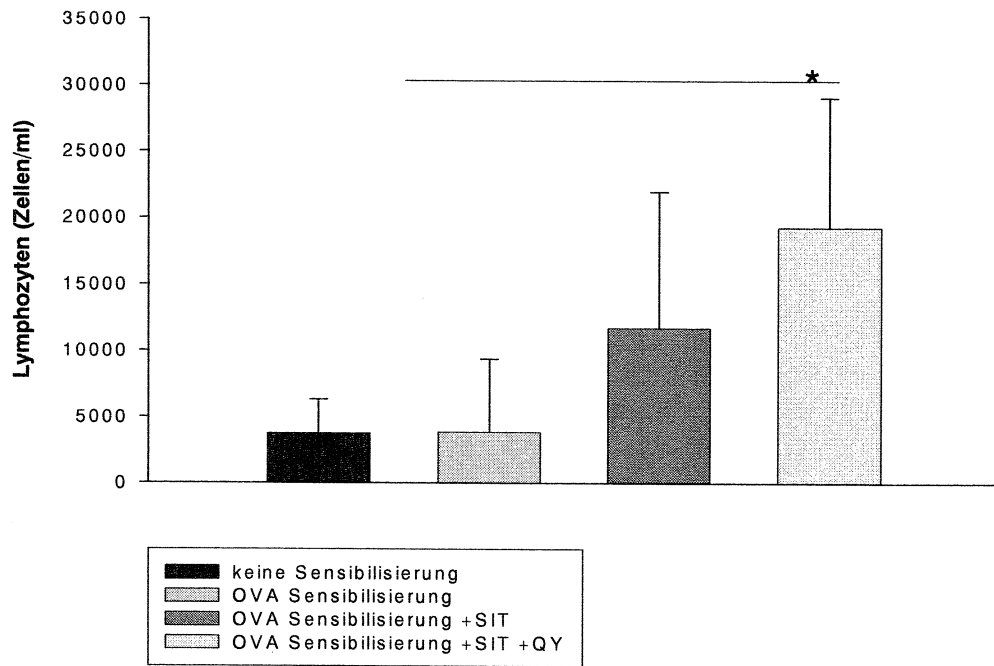


Abb.3.13: Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage

3.7 Becherzellmetaplasie

Nach der spezifischen Immuntherapie und zweimaligen OVA Challenges wurden den Mäusen an Tag 64 die Lungen entnommen, in Formalin fixiert und anschließend die Lungenschnitte mit PAS gefärbt.

Unter dem Mikroskop wurden die Becherzellmetaplasie, d.h. der Teil der schleimproduzierenden Zellen in den einzelnen Gesichtsfeldern quantifiziert und innerhalb der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Dafür wurde eine relative Bewertungsskala von 0 bis 3 festgelegt.

Ein Becherzellscore von 0 bedeutet keine Becherzellmetaplasie, von 1 bedeutet eine geringe Metaplasie, von 2 bedeutet eine mittlere Metaplasie und ein Becherzellscore von 3 bedeutet eine starke Becherzellmetaplasie.

Mäuse, welche über den gesamten Zeitraum nur PBS appliziert bekamen, hatten einen mittleren Becherzellscore von $0,5 \pm 0,6$. Die OVA sensibilisierten Mäuse, die in dem Zeitraum der spezifischen Immuntherapie nur noch mit PBS behandelt wurden, hatten einen mittleren Becherzellscore von $1,75 \pm 0,46$. Die Mäuse, welche nach der Sensibilisierung mit der spezifischen Immuntherapie behandelt wurden, bzw. noch zusätzlich den IL-4/IL-13 Antagonisten bekamen, hatten einen signifikant erhöhten mittleren Becherzellscore von $2,63 \pm 0,7$ ($p=0,014$) bzw. $2,03 \pm 0,7$ ($p=0,12$). In den Lungen von OVA-sensibilisierten Mäusen zeigte sich eine deutliche Becherzellmetaplasie im Gegensatz zu den unsensibilisierten Mäusen.

Zusammenfassend lassen sich durch eine spezifische Immuntherapie das Allergen spezifische IgE, die Einwanderung von Eosinophilen Granulozyten und die Produktion von Th2 Zytokinen in der BAL signifikant senken. Die Becherzellmetaplasie wird durch die SIT jedoch verstärkt. Diese Effekte lassen sich durch die zusätzliche Applikation eines IL-4/IL-13-Inhibitors während der Allergen spezifischen Immuntherapie nicht signifikant verstärken.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der intranasalen Immuntherapie im Mausmodell für allergisches Asthma

Um die Wirkmechanismen der allergenspezifischen Immuntherapie (SIT) zu prüfen, wurde in dieser Arbeit ein adäquates Tiermodell konzipiert. Dazu wurden Balb/c Mäuse mit OVA sensibilisiert. OVA wurde in einer Dosis von 50 µg in 30µl PBS 4 mal in wöchentlichen Abständen intranasal appliziert. Anschließend wurde den einzelnen Versuchsgruppen OVA in ansteigender Dosis von 1 µg bis 1 mg über 3 Wochen intranasal appliziert bzw. PBS zur Kontrolle.

Eine intranasale Applikation des Allergens ohne Narkose führte zu keiner Ausbildung von OVA-spezifischen IgE-Antikörpern. Das Allergen gelangte möglicherweise nicht in das bronchoalveoläre System, da es ohne Narkose von den Mäusen geschluckt wurde. Das Allergen wurde entweder direkt wieder ausgespuckt, über den Gastrointestinaltrakt eliminiert oder führte zur Ausbildung einer oralen Toleranz. So konnten Russo et al im Mausmodell zeigen, dass eine orale OVA-Antigengabe eine orale Toleranz induziert mit reduzierter bronchoalveolärer Entzündungsreaktion und Schleimproduktion, sowie erniedrigten Werten von T-Helfer 2 Zytokinen in der bronchoalveolären Lavage und erhöhte Produktion von OVA-spezifischen IgG1- und IgE-Antikörpern (Russo M et al, 2001).

Daher wurde in einem zweiten Versuch das Allergen intranasal in Narkose appliziert. Es zeigte sich bei den narkotisierten OVA sensibilisierten Mäusen ein deutlicher kontinuierlicher Anstieg der OVA-spezifischen IgE-Antikörper im Verlauf der Sensibilisierung.

Nach einer intranasalen Sensibilisierung mit OVA konnten persistierende OVA-spezifische IgE Synthese, sowie erhöhte Werte an IL-5 in Kombination mit einer vermehrten Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der BAL nachgewiesen werden.

Ähnlich wie auch beim Menschen führte eine anschließende intranasale SIT zu einer signifikanten Reduktion der OVA spezifischen IgE Synthese der IL-5 Werte und der Eosinophilen in der bronchoalveolären Lavage. Ähnlich wie in unserem Modell konnten auch Van Oosterhout et al. in einem anderen Mausmodell, in dem eine intraperitoneale Allergen spezifische Immuntherapie durchgeführt wurde zeigen, dass es zunächst zu einem Anstieg der OVA spezifischen Antikörper (IgG1, IgE, IgG2a) im Serum kommt, wobei jedoch die IgE-Werte im Anschluss wieder steil absinken und die IgG2a-Werte nochmals ansteigen (Van Oosterhout et al., 1998).

Die Becherzellmetaplasie bei den Gruppen, welche mit SIT bzw. mit SIT in Kombination mit dem IL-4/IL-13 Antagonisten behandelt wurden, war im Vergleich zu der unsensibilisierten Gruppe deutlich erhöht. Becherzellmetaplasie ist ein typisches Symptom bei Asthmapatienten, findet sich jedoch auch bei anderen akuten bzw. chronischen Irritationen des bronchoalveolären Systems. So konnte z.B. im Rahmen einer Influenza Pneumonie der Maus auch eine Becherzellmetaplasie gefunden werden (Grunewald et al., 2002). Die Zunahme der Becherzellmetaplasie in den Gruppen von Mäusen, die durch kontinuierliche Applikation des Proteins Ovalbumin intranasal hyposensibilisiert wurden, könnte daher einen unspezifischen Reiz in der Lunge darstellen.

4.2 Spezifische Immuntherapie in Kombination mit einem IL-4/IL-13 Antagonisten

Eine Vielzahl von klinischen Studien hat die Wirksamkeit der SIT in der Behandlung von allergischen Erkrankungen, insbesondere für Patienten mit Monosensibilisierungen, belegt (Abramson M et al, 1999) (Abramson MJ et al, 1995) (Akdis CA et al, 2000). Dennoch ist die Anwendung dieser potentiell kurativen Behandlungsmethode aufgrund der langen Therapiedauer sehr aufwendig und bei Patienten mit multiplen klinisch relevanten Sensibilisierungen eingeschränkt. Da im Rahmen der SIT eine Umpolarisierung von Th2 in Richtung Th1 stattfindet, waren synergistische Effekte

einer kombinierten allergenspezifischen und allergenunabhängigen Immuntherapie mit Th2- Zytokinantagonisten naheliegend. Daher wurde in dieser Arbeit im Mausmodell insbesondere der Aspekt untersucht, ob eine adjuvante Immuntherapie mit Zytokinantagonisten durch synergistische Effekte die Therapiedauer der SIT verkürzen konnte, und ob die allergenunspezifische Immunmodulation polysensibilisierten Patienten möglicherweise eine Therapiemöglichkeit eröffnen könnte. Dazu wurde nach erfolgter Sensibilisierung mit OVA im Anschluss einem Teil der Mäuse zusätzlich zu den ansteigenden OVA Dosen (siehe Abb 3.2) 10µg des IL-4/IL-13 Antagonisten intranasal verabreicht. Um die Entwicklung der Allergie, den Verlauf der Immuntherapie und den Einfluss des Antagonisten zu erkennen, wurden OVA-spezifische Antikörper, das bronchoalveoläre Entzündungsinfiltrat und die Becherzellmetaplasie untersucht.

Ähnlich wie in früheren Arbeiten, welche die Auswirkungen einer IL-4/IL13 Hemmung bei etabliertem Asthma im Mausmodell untersuchten (Hahn et al, 2003), erbrachte die zusätzliche Gabe des IL-4/IL-13 Antagonisten in Kombination mit der Allergen spezifischen Immuntherapie, bei bereits etablierter Allergie, keine messbare Änderung der Allergieparameter im Vergleich zu Mäusen, die nur einer SIT unterzogen wurden. So konnten Hahn et al zeigen, dass eine Immunmodulation mit Th2 Zytokinantagonisten im Mausmodell wirksam die Entwicklung einer allergischen Atemwegserkrankung verhindern kann. So wurden bronchiale Hyperreaktivität, Becherzellmetaplasie und Atemwegseosinophilie, Th2-Zytokine und spezifisches IgE signifikant bis vollständig inhibiert (Hahn et al, 2003, Tompkinson A et al., 2001), was die zentrale Rolle der beiden Zytokine IL-4 und IL-13 bei der Entwicklung von allergischen Erkrankungen unterstreicht (Corry DB et al., 1996) (Grunig G et al., 1998) (Wills-Karp M et al., 1998) (Dabbagh K et al., 1999) (Henderson WR et al., 2000).

In der Studie von Hahn et al konnte jedoch eine 6 wöchige intranasale OVA Sensibilisierung mit anschließender intranasaler Applikation des IL-4/IL-13 Antagonisten, der auch in der hier vorgestellten Arbeit verwendet wurde, zu unterschiedlichsten Zeitpunkten nach bereits etablierter Allergie keine signifikante Reduktion der Allergieparameter induzieren (Hahn C et al, 2003).

Jedoch zeigten andere Studien bei zweimaligen intraperitonealen OVA Behandlungen zwei Wochen vor einem intranasalen oder intratrachealen OVA Challenge antagonistische Effekte auf die bronchoalveoläre Hyperreagibilität und Becherzellmetaplasie durch eine Behandlung mit einem selektiven IL-13 oder auch IL-4 Antagonisten, sofern die Hemmung während des inhalativen OVA- Challenges stattfand (Grunig G et al, 1998) (Wills-Karp M et al, 1998) (Tompkinson A. et al, 2001). Aufgrund der unterschiedlichen Arbeitsprotokolle können die Daten nicht direkt verglichen werden. Jedoch kann spekuliert werden, dass eine intraperitoneale Vorbehandlung vor einer kurzzeitigen intranasalen OVA Challenge eine vorübergehende allergische Atemwegsreaktion zeigt, welche durch eine IL-4/IL-13 Hemmung wirksam unterdrückt werden kann (Grunig G et al, 1998) (Wills-Karp M et al, 1998) (Tompkinson A. et al, 2001), während eine etablierte Immunantwort nach langer intranasaler Sensibilisierung anders reguliert zu sein scheint. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Unterschied in der Wirksamkeit besteht, wenn der Hemmstoff intranasal oder intraperitoneal verabreicht wird, möglicherweise durch eine Art von Ablagerung des Hemmstoffes in den unteren Atemwegen. Trotzdem zeigte sich die intranasale Applikation des IL-4/IL-13 Inhibitors bei der allergischen Sensibilisierung als wirksam, was eine systemische Absorption nahe legt.

Deshalb kann spekuliert werden, dass es bislang unbekannte Mechanismen gibt, die eine IgE Synthese, unabhängig von der IL-4 Rezeptor alpha Kette, bei langfristiger Allergenaueinandersetzung in bereits etablierten Allergien unterhalten, welche unterschiedlich sind von denen einer Einleitungsphase einer allergischen Immunantwort. Ein mögliches Zytokin könnte dabei IL-9 sein. IL-9 scheint eine wichtige Rolle hinsichtlich vieler asthmaspezifischer Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Epithelzellen zu spielen. Die Entwicklung von IL-9 transgenen Mäusen wies hinsichtlich der Entstehung eines asthmatischen Phänotypes, einschließlich der eosinophilen Entzündungsreaktion, der bronchialen Hyperreagibilität, sowie erhöhten IgE-Spiegel und vermehrter bronchialer Schleimproduktion auf eine wichtige Rolle von IL-9 hin (Temann et al., 1998) (Soussi-Gounni et al., 2001).

Des Weiteren können wir nicht ausschließen, dass andere, bisher nicht bekannte Bindungsstellen für IL-4 und IL-13 existieren, welche nicht von unserem Antagonisten blockiert werden.

Der unbefriedigende therapeutische Effekt des IL-4/IL-13 Antagonisten als Adjuvant in der spezifischen Immuntherapie könnte auch damit zusammenhängen, dass die Hemmung der Th2 Zytokine kein grundlegendes pathomechanistisch relevantes Ereignis für eine erfolgreiche Immuntherapie zu sein scheint. Dies wird in Studien bestätigt, welche zeigen, dass eine Immunmodulation mit einer Umpolarisierung von Th2 in Richtung Th1 nicht immer mit einer erfolgreichen Immuntherapie einhergeht (Till et al., 2004) (Till et al., 1997) (Wachholz et al., 2002) (Francis et al., 2003). Dagegen wurde ein Anstieg von IL-10 während der SIT erstmals von Bellinghausen beschrieben (Bellinghausen et al., 1997). In den nachfolgenden Jahren wurde angenommen, dass die Induktion von IL-10 produzierenden T-Zellen einer der Schlüsselmechanismen für eine erfolgreiche Immuntherapie zu sein scheint (Till et al., 2004) (Akdis et al., 1998). In einem murinen Mausmodell für Asthma zeigte Vissers et al., dass eine subcutane SIT eine unterdrückte Gedächtnisantwort induziert, welche durch IL-10 vermittelt wurde (Vissers et al., 2004). In Mäusen, welche mit monoklonalen IL-10 Antikörpern behandelt wurden, war der therapeutische Erfolg einer SIT deutlich reduziert, was die Wirkung von IL-10 in der Rolle als Schlüsselzytokin bei einer erfolgreichen SIT nochmals unterstreicht.

Dazu passt auch, dass in der Arbeit von Hahn et al die OVA-spezifischen IgE-Antikörper signifikant und dosisabhängig, jedoch nicht vollständig durch den IL-4/IL-13 Antagonisten reduziert werden konnten (Hahn C et al, 2003). Ähnlich wie in einer Studie mit IL-4 Rezeptor alpha Knockout Mäusen, die nach einer sechswöchigen Langzeitsensibilisierung mit OVA auch spezifische IgE- Antikörper entwickelten (Grunewald SM. et al, 2001). Im Gegensatz dazu war eine IgE Synthese bei IL-4 alpha Knockout Mäusen nach einer kurzzeitigen intraperitonealen OVA-Sensibilisierung nicht feststellbar und konnte in Wild-Typ Mäusen mit dem IL-4/IL-13 Antagonisten während einer Kurzzeitsensibilisierung vollständig gehemmt werden (Grunewald SM et al, 1998).

5 Zusammenfassung

Die allergenspezifische Immuntherapie ist derzeit die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit von Soforttypallergien. Trotzdem ist der genaue Wirkmechanismus derzeit noch nicht bekannt. Da unklar bleibt, welcher Parameter für den Behandlungserfolg einer spezifischen Immuntherapie (SIT) pathogenetisch bedeutsam ist, fehlen Laborwerte die über Behandlungserfolg und schließlich Beendigung einer Behandlung entscheiden können.

Unter der Behandlung kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von allergenspezifischen Th2- zu Th1-Zellen. Trotz der Abnahme an allergenspezifischen Th2-Zellen kommt es langfristig nicht immer zu einer Verminderung des spezifischen IgE, so dass unklar bleibt, welche Rolle die Th1/Th2-Verschiebung bei dieser Behandlung spielt. Das Zytokin Interleukin 4 (IL-4) löst die Differenzierung von Th2-Zellen aus, und IL-4 und IL-13 induzieren beide in B-Zellen die IgE-Synthese. Daher stellte sich die Frage, ob durch eine Immunmodulation mit Hilfe eines IL-4/IL-13 Antagonisten die Th1/Th2-Verschiebung unter einer SIT optimiert werden kann und so deren therapeutischer Erfolg noch weiter gesteigert werden kann.

Um dies zu prüfen wurde ein Mausmodell zur spezifischen Immuntherapie etabliert. Dazu wurden Gruppen von Mäusen über 4 Wochen intranasal mit dem Allergen Ovalbumin behandelt. Anschließend wurde den einzelnen Versuchsgruppen in ansteigender Dosierung von 1µg bis 1mg Ovalbumin, bzw. PBS zur Kontrolle, über 3 Wochen in sieben Einzeldosen intranasal appliziert. Gleichzeitig wurde einem anderen Teil der Mäuse zusätzlich zu der Immunisierung mit Ovalbumin der IL-4/IL-13 Antagonist QY appliziert. Neben dem Nachweis von allergenspezifischen Immunglobulinen im Serum wurden in den einzelnen Versuchsgruppen bronchoalveoläre Lavagen durchgeführt. In der Lavageflüssigkeit wurden die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie das Th1- Zytokin IFN-γ mit einem ELISA bestimmt. Außerdem wurde die Zusammensetzung des zellulären Entzündungsinfiltrates, insbesondere die Zahl der eosinophilen Granulozyten verglichen.

Nach vierwöchiger intranasaler OVA-Sensibilisierung zeigte sich eine starke Ausbildung von OVA-spezifischem IgE verbunden mit einem eosinophilen Entzündungsinfiltrat in der bronchoalveolären Lavage und hohen IL-4/ IL-5 Titern in der Lavageflüssigkeit. Histologisch zeigten die Lungen der OVA- sensibilisierten Mäuse ein starkes eosinophiles Entzündungsinfiltrat peribronchial und perivaskulär sowie eine deutliche Becherzellmetaplasie in dem Bronchialepithel.

Unter der allergenspezifischen Immuntherapie mit ansteigenden OVA- Dosen kam es zu einer deutlichen Abnahme der OVA-spezifischen IgE- Antikörper im Vergleich zu PBS therapierten Kontrollmäusen, verbunden mit einer Absenkung der Eosinophilenzahl, sowie reduzierten IL-4 und IL-5 Levels und ansteigenden IFN- γ Werten in der BAL. Die Becherzellmetaplasie in der Lunge dagegen schien unter der SIT weiter verschlechtert.

Bei der kombinierten Behandlung der spezifischen Immuntherapie mit dem IL-4/IL-13 Antagonisten kam es zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zu den ausschließlich mit SIT behandelten Mäusen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass für eine pulmonale Soforttypallergie in einem Asthmodell in der Maus erfolgreich eine SIT etabliert werden konnte, die in einer Reihe von Parametern mit einer SIT im Menschen vergleichbar ist. Dies ist das erste Modell einer pulmonalen Soforttypallergie in der Maus, an dem neben den Wirkprinzipien der SIT auch neue Therapiestrategien untersucht werden können. Eine Behandlung mit SIT in Kombination mit einem immunmodulatorisch wirksamen IL-4/IL-13 Antagonisten zeigte jedoch keinen zusätzlichen therapeutischen Nutzen, welches die scheinbar untergeordnete Rolle der Zytokine IL-4 und IL-13 bei etablierten Allergien untermauert.

6 Literatur

Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM

Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Respir Crit Care Med (United States)*, Apr 1995, 151(4) p969-74

Abramson M, Puy R, Weiner J

Immunotherapy in asthma: an updated systematic review.

Allergy (Denmark), Oct 1999, 54(10) p1022-41

Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT.

Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2:725-31.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K.

Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102:98-106.

Akdis CA, Blaser K,

Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy (Denmark)*, Jun 2000, 55(6) p522-30

Andre C, Vatrinet C, Galvain S, Carat F, Sicard H.

Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults.

Int Arch Allergy Immunol. 2000 Mar;121(3):229-34.

Andri L, Senna G, Betteli C, Givanni S, Andri G, Falagiani P.

Local nasal immunotherapy for Dermatophagoides-induced rhinitis: efficacy of a powder extract. *J Allergy Clin Immunol.* 1993 May;91(5):987-96.

Andri L, Senna G, Andri G, Dama A, Givanni S, Betteli C, Dimitri G, Falagiani P, Mezzelani P.

Local nasal immunotherapy for birch allergic rhinitis with extract in powder form.
Clin Exp Allergy. 1995 Nov;25(11):1092-9.

Ball T, Sperr WR, Valent P, Lidholm J, Spitzauer S, Ebner C, Kraft D, Valenta R.
Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character
of allergen immunotherapy. Eur J Immunol. 1999 Jun;29(6):2026-36.

Ball T, Fuchs T, Sperr WR, Valent P, Vangelista L, Kraft D, Valenta R.
B cell epitopes of the major timothy grass pollen allergen, phl p 1, revealed by gene
fragmentation as candidates for immunotherapy. FASEB J. 1999 Aug;13(11):1277-90

Barnes PJ

Current issues for establishing inhaled corticosteroids as the antiinflammatory agents of
choice in asthma. J Allergy Clin Immunol (United States), Apr 1998, 101(4 Pt 2)
pS427-33

Barnes N

Relative safety and efficacy of inhaled corticosteroids. J Allergy Clin Immunol (United
States), Apr 1998, 101(4 Pt 2) pS460-4

Barnes PJ.

Is there a role for immunotherapy in the treatment of asthma? No.
Am J Respir Crit Care Med (United States), Nov 1996, 154(5) p1227-8

Barnes PJ.

Anti-IgE antibody therapy for asthma. N Engl J Med. 1999 Dec 23;341(26):2006-8.

Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for asthma. J Allergy Clin Immunol 2001; 108(2
Suppl):72-6.

Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christmann S, Knop J, Saloga J.

Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27:1131-9.

Bieber T, de la SH, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J et al.
Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 1992; 175(5):1285-90.

Bieber T.

Topical tacrolimus (FK 506): a new milestone in the management of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Oct;102(4 Pt 1):555-7. Review.

Blease K, Jakubzick C, Westwick J, Lukacs N, Kunkel SL, Hogaboam CM.
Therapeutic effect of IL-13 immunoneutralization during chronic experimental fungal asthma. *J Immunol* 2001; 166(8):5219-24.

Blumchen K, Kallinich T, Hamelmann E.

Interleukin-5: a novel target for asthma therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1(3):433-53.

Borish LC, Nelson HS, Corren J, Bensch G, Busse WW, Whitmore JB, et al.

Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:963-70.

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, et al.

Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology.
Ann Allergy Asthma Immunol (United States), Nov 1998, 81(5 Pt 1) p401-5

Bousquet J, Becker WM, Hejjaoui A, et al.

Differences in clinical and immunologic reactivity of patients allergic to grass pollens

and to multiple-pollen species. II. Efficacy of a double-blind, placebo-controlled, specific immunotherapy with standardized extracts. *J Allergy Clin Immunol (United States)*, Jul 1991, 88(1) p43-53

Cookson WO,

11q and high-affinity IgE receptor in asthma and allergy.

Clin Exp Allergy. 1995 Nov;25 Suppl 2:71-3; discussion 95-6. Review.

Cookson WO,

The alliance of genes and environment in asthma and allergy.

Nature. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B5-11. Review.

Cools M.

Long-term effects of specific immunotherapy, administered during childhood, in asthmatic patients allergic to either house-dust mite or to both house-dust mite and grass pollen.

Allergy. 2000 Jan;55(1):69-73.

Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996; 183:109-17.

Corry DB, Kheradmand F.

Induction and regulation of the IgE response [In Process Citation]. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):18-23.

Coyle AJ, Le Gros G, Bertrand C, Tsuyuki S, Heusser CH, Kopf M, et al.

Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13:54-9.

Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA.

IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999; 162(10):6233-7.

D'Amato G, Kordash TR, Liccardi G, Lobefalo G, Cazzola M, Freshwater LL. Immunotherapy with Alpare in patients with respiratory allergy to *Parietaria* pollen: a two year double-blind placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy*. 1995 Feb;25(2):149-58.

Durham SR.

Effect of intranasal corticosteroid treatment on asthma in children and adults. *Allergy*. 1999;54 Suppl 57:124-31. Review.

Durham SR.

Allergic inflammation: cellular aspects. *Allergy*. 1999;54 Suppl 56:18-20. Review

Durham SR, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Varga EM, Frew AJ, Kay AB. Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin Exp Allergy*. 1999 Nov;29(11):1490-6.

Duschl A, Muller T, Sebald W.

Antagonistic mutant proteins of interleukin-4. *Behring Inst Mitt*. 1995 Jun;(96):87-94. Review.

Duschl A

An antagonistic mutant of interleukin-4 fails to recruit gamma c into the receptor complex. Characterization by specific crosslinking. *Eur J Biochem*. 1995 Mar 1;228(2):305-10.

Dreborg S

Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen.

Allergy (Denmark), Oct 1993, 48(7) p473-5

Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaiei KI, Young IG.

Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996; 183(1):195-201.

Francis JN, Till SJ, Durham SR.

Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1255-61

Frew AJ. 25.

Immunotherapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S712-9.

Georgitis JW, Nickelsen JA, Wypych JI, Barde SH, Clayton WF, Reisman RE.

Local intranasal immunotherapy with high-dose polymerized ragweed extract.

Int Arch Allergy Appl Immunol. 1986;81(2):170-3.

Grunewald SM, Kunzmann S, Schnarr B, Ezernieks J, Sebald W, Duschl A.

A murine interleukin-4 antagonistic mutant protein completely inhibits interleukin-4-induced cell proliferation, differentiation, and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:1480-3.

Grunewald SM, Werthmann A, Schnarr B, Klein CE, Bröcker EB, Mohrs M, et al.

An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse. Inhibition of the IL-4/IL13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J. Immunol.* 1998; 160:4004-9.

Grunewald SM, Teufel M, Erb K, Nelde A, Mohrs M, Brombacher F, et al.

Upon prolonged allergen exposure IL-4 and IL-4Ralpha knockout mice produce specific IgE leading to anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:322-8.

Grunewald SM, Hahn C, Wohleben G, Teufel M, Major T, Moll H, Brocker EB,

Erb KJ. Infection with influenza a virus leads to flu antigen-induced cutaneous

anaphylaxis in mice. *J Invest Dermatol.* 2002 Apr;118(4):645-51.

Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al.
Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma [see comments].
Science 1998; 282:2261-3.

Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C et al.
Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway
hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(3):934-41.

Henderson WR, Jr., Chi EY, Maliszewski CR.
Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a
mouse model of asthma. *J Immunol* 2000; 164:1086-95.

Hertz M, Mahalingam S, Dalum I, Klysner S, Mattes J, Neisig A et al.
Active vaccination against IL-5 bypasses immunological tolerance and ameliorates
experimental asthma. *J Immunol* 2001; 167(7):3792-9.

Heusser C, Jardieu P.
Therapeutic potential of anti-IgE antibodies.
Curr Opin Immunol. 1997 Dec;9(6):805-13. Review.

Holgate ST.
The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):2-4.

Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD.
The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl):12-7.
Holt PG.
Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S151-
S156.

Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Müller UR.

Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J. Immunol.* 1995; 154:4187-94.

Johnstone DE., Dutton A.

The value of hyposensitization therapy for bronchial asthma in children--a 14-year study.

Pediatrics. 1968 Nov;42(5):793-802.

Kleine-Tebbe J, Josties C, Frank G, Stalleicken D, Buschauer A, Schunack W, Kunkel G, Czarnetzki B.

Inhibition of IgE- and non-IgE-mediated histamine release from human basophil leukocytes in vitro by a histamine H1-antagonist, desethoxycarbonyl-loratadine. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 Feb;93(2):494-500

Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G.

Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses.

Nature. 1993 Mar 18;362(6417):245-8.

Kruse N, Shen BJ, Arnold S, Tony HP, Muller T, Sebald W.

Two distinct functional sites of human interleukin 4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation. *EMBO J.* 1993 Dec 15;12(13):5121-9.

Kruse N, Tony HP, Sebald W.

Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. *EMBO J.* 1992 Sep;11(9):3237-44.

Kuehr J, Brauburger J, Zielen S, Schauer U, Kamin W, Von Berg A, Leupold W, Bergmann KC, Rolinck-Werninghaus C, Grave M, Hultsch T, Wahn U.

Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis.

J Allergy Clin Immunol. 2002 Feb;109(2):274-80.

Kuhn R, Rajewsky K, Muller W.

Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice.

Science. 1991 Nov 1;254(5032):707-10.

Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM et al.

Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. Lancet 2000; 356(9248):2144-8.

Leong KP, Huston DP.

Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. Ann Allergy

Asthma Immunol 2001; 87(2):96-109.

Lewis DB.

Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy?

Curr Opin Immunol 2002; 14:644-51.

Lima MT, Wilson D, Pitkin L, Roberts A, Nouri-Aria K, Jacobson M, Walker S,

Durham S.

Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial. Clin Exp Allergy. 2002 Apr;32(4):507-14.

Malling HJ, Abreu-Nogueira J, Alvarez-Cuesta E, et al.

Local immunotherapy. Allergy (Denmark), Oct 1998, 53(10) p933-44

Malling HJ

Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment.

Allergy (Denmark), May 1998, 53(5) p461-72

McKinnon M, Page K, Uings IJ, Banks M, Fattah D, Proudfoot AE, Graber P, Arod C, Fish R, Wells TN, Solari R.

An interleukin 5 mutant distinguishes between two functional responses in human eosinophils. J Exp Med. 1997 Jul 7;186(1):121-9.

Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, Halcken S, Host A, Jacobsen L, Koivikko A, Koller DY, Niggemann B, Norberg LA, Urbanek R, Valovirta E, Wahn U.

Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Feb;109(2):251-6.

Monahan J, Siegel N, Keith R, Caparon M, Christine L, Compton R, Cusik S, Hirsch J, Huynh M, Devine C, Polazzi J, Rangwala S, Tsai B, Portanova J.

Attenuation of IL-5-mediated signal transduction, eosinophil survival, and inflammatory mediator release by a soluble human IL-5 receptor. *J Immunol.* 1997 Oct 15;159(8):4024-34.

Nickelsen JA, Georgitis JW, Mueller UR, Kane J, Wypych JI, Goldstein S, Reisman RE, Arbesman CE.

Local nasal immunotherapy for ragweed-allergic rhinitis. III. A second year of treatment.

Clin Allergy. 1983 Nov;13(6):509-19.

Oshima Y, Puri RK.

A novel interleukin 13 (IL-13) antagonist that blocks the biological activity of human IL-13 in immune and nonimmune cells. *FASEB J.* 2001 Jun;15(8):1469-71.

Pajno GB, Passalacqua G, Vita D, Caminiti L, Parmiani S, Barberio G.

Sublingual immunotherapy abrogates seasonal bronchial hyperresponsiveness in children with Parietaria-induced respiratory allergy: a randomized controlled trial.

Allergy. 2004 Aug;59(8):883-7.

Passalacqua G, Albano M, Ruffoni S, Pronzato C, Riccio AM, Di Bernardino L, Scordamaglia A, Canonica GW.

Nasal immunotherapy to Parietaria: evidence of reduction of local allergic inflammation.

Am J Respir Crit Care Med. 1995 Aug;152(2):461-6.

Pierkes M, Bellinghausen I, Hultsch T, Metz G, Knop J, Saloga J.

Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Feb;103(2 Pt 1):326-32.

Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA.

Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):5141-5.

Renz H.

The central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation. *Exp Dermatol* 1995; 4:173-82.

Renz H, Bradley K, Enssle K, Loader JE, Gelfand EW.

Prevention of the development of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness following in vivo treatment with soluble IL-4 receptor. *Int. Archives Allergy Immunol.* 1996; 109:167-76.

Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, Ribeiro OG, Adriouch S, Gallois V, de Faria AM, Vargaftig BB.

Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 May;24(5):518-26.

Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN.

Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature.* 1996 Apr 18;380(6575):630-3.

Soussi-Gounni A, Kontolemos M, Hamid Q.

Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:575-82.

Steinke JW, Borish L.

Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* 2001; 2(2):66-70.

Takeda F, Toma T, Miyagi I, Kishimoto M.

Survey of allergic diseases in 3-year old children in Okinawa City
Nippon Koshu Eisei Zasshi. 1996 Dec;43(12):1024-32. Japanese

Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, Plaetinck G.

A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific alpha chain and a beta chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*. 1991 Sep 20;66(6):1175-84.

Tavernier J, Tuypens T, Verhee A, Plaetinck G, Devos R, Van der Heyden J, Guisez Y, Oefner C.

Identification of receptor-binding domains on human interleukin 5 and design of an interleukin 5-derived receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 23;92(11):5194-8.

Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA.

Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188:1307-20.

Till S, Walker S, Dickason R, Huston D, O'Brien F, Lamb J, et al.

IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol* 1997; 110:114-21.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR.

Mechanisms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1025-34; quiz 35.

Tomkinson A, Duez C, Cieslewicz G, Pratt JC, Joetham A, Shanafelt MC et al.

A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 2001; 166(9):5792-800.

Tony HP, Shen BJ, Reusch P, Sebald W.

Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. *Eur J Biochem*. 1994 Oct 15;225(2):659-65.

Tsuruoka N, Yamashiro K, Tsujimoto M.

Purification of soluble murine interleukin 5 (IL-5) receptor alpha expressed in Chinese hamster ovary cells and its action as an IL-5 antagonist. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Nov 15;307(1):133-7.

van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arnved J, Ipsen H.

Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol*. 1999 Sep 1;163(5):2944-52.

van Neerven RJ.

The role of allergen-specific T cells in the allergic immune response: relevance to allergy vaccination. *Allergy*. 1999 Jun;54(6):552-61. Review.

Van Oosterhout AJ, Van Esch B, Hofman G, Hofstra CL, Van Ark I, Nijkamp FP, et al.
Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness

associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:622-8.

Vissers JL, van Esch BC, Hofman GA, Kapsenberg ML, Weller FR, van Oosterhout AJ. Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:1204-10.

Von Mutius E.

A traditional farming environment--a prophylactic factor against allergies
Dtsch Med Wochenschr. 2000 Aug 4;125(31-32):923. German

Voltolini S, Modena P, Minale P, Bignardi D, Troise C, Puccinelli P, Parmiani S. Sublingual immunotherapy in tree pollen allergy. Double-blind, placebo-controlled study with a biologically standardised extract of three pollens (alder, birch and hazel) administered by a rush schedule. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2001 Jul-Aug;29(4):103-10.

Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, Walker SM, Verhoef A, Till SJ, et al. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology* 2002; 105:56-62.

Wahn U., von Mutius E.

Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention.
J Allergy Clin Immunol. 2001 Apr;107(4):567-74. Review.

Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 2001; 167(8):4668-75.

Wang Y, Shen BJ, Sebald W.

A mixed-charge pair in human interleukin 4 dominates high-affinity interaction with the receptor alpha chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 4;94(5):1657-62.

Welsh PW, Zimmermann EM, Yunginger JW, Kern EB, Gleich GJ.
Preseasonal intranasal immunotherapy with nebulized short ragweed extract.
J Allergy Clin Immunol. 1981 Mar;67(3):237-42.

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al.
Interleukin-13: central mediator of allergic asthma [see comments]. Science 1998;
282:2258-61.

Wilson DR, Irani AM, Walker SM, Jacobson MR, Mackay IS, Schwartz LB, Durham
SR.
Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in
the nasal epithelium. Clin Exp Allergy. 2001 Nov;31(11):1705-13.

Wilson DR, Nouri-Aria KT, Walker SM, Pajno GB, O'Brien F, Jacobson MR, Mackay
IS, Durham SR.
Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in
eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season.
J Allergy Clin Immunol. 2001 Jun;107(6):971-6.

Zhu Z, Lee CG, Zheng T, Chupp G, Wang J, Homer RJ et al.
Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and
interleukin 13 transgenic mice. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(10 Pt 2):67-70.

Zuberi RI, Apgar JR, Chen SS, Liu FT.
Role for IgE in airway secretions: IgE immune complexes are more potent inducers
than antigen alone of airway inflammation in a murine model. J Immunol 2000;
164(5):2667-73.

Danksagung

Zur Erstellung dieser Arbeit forschte ich mit viel Freude und Spaß in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Dr. Susanne Grunewald in der Hautklinik der Universität Würzburg (Direktorin: Frau Prof. Bröcker). Allen Kollegen mit denen ich in dieser Zeit zusammenarbeiten durfte sei an dieser Stelle herzlich für das nette und kollegiale Arbeitsklima gedankt. Einigen Personen gilt mein ganz besonderer Dank.

Frau Dr. Dr. Susanne Grunewald danke ich für die professionelle Planung, Unterstützung und Korrektur dieser Arbeit. Das wachsende freundschaftliche Verhältnis im Laufe der Zusammenarbeit trug mit Sicherheit dazu bei, dass mich kleinere oder auch größere Probleme nicht verzagen ließen. Sie schaffte es mich immer wieder aufs Neue zu ermutigen.

Frau Prof. Bröcker danke ich für die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit in der Hautklinik der Universität Würzburg.

Herrn Prof. Sebald (Physiologische Chemie II, Biozentrum) danke ich für die Bereitstellung der IL-4 Mutante, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

PD Klaus Erb (Institut für molekulare Infektiologie, Uni Würzburg) und Mitarbeiterinnen danke ich für die Technik der Bronchiallavage und für die nette Einarbeitung in diverse Arbeitstechniken.

Dr. Christian Hahn (Uni Marburg), danke ich für die äußerst nette Zusammenarbeit in der AG Grunewald. Er stand mir in jeder Hinsicht mit Rat und Tat zur Seite und unterstützte mich in allen Belangen.

Dr. Martin Teufel danke ich für die nette Einführung in sämtliche Arbeitstechniken und für jegliche Hilfe bei erneuten Problemen.

Tea Gogishvili (AG Grunewald) danke ich für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten und Erstellung verschiedener Grafiken.

Susan Shelwood-Scherfs (Tierpflegerin in der Hautklinik Würzburg) danke ich für eine äußerst fürsorgliche Pflege der Mäuse und immer wieder hilfreichen Tipps im Umgang mit den Tieren.

Lebenslauf

Persönlichen Daten

Name: Julia Meinhardt, geb. Kling
Geburtsdatum: 21.01.1975
Geburtsort: Miltenberg
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Werner Kling, Schreinermeister, geb.04.10.1940
Hildrun Kling, geb. Sacher, Verwaltungsangestellte, geb.01.06.1943

Privatadresse: Traubengasse 6, 97072 Würzburg
Telefon: 0931/98357
e-mail: meinhardtjulia@gmx.de

Schulbildung

1981-1985 Grundschule Bürgstadt
1985-1994 Johannes-Butzbach-Gymnasium Miltenberg
1994 Abitur

Hochschulausbildung

1995-2002 Humanmedizinstudium an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
1997 ärztliche Vorprüfung
1998 1.Staatsexamen
2000 2.Staatsexamen
2000-2001 wissenschaftliche Tätigkeit an der Universitätshautklinik in Würzburg
2001-2002 Praktisches Jahr
2002 3.Staatsexamen
2002-2003 Studium der Traditionell chinesischen Medizin am WHO-Zentrum in Peking


Berufliche Tätigkeit

2003-2004 Ärztin im Praktikum in der Klinik am Steigerwald, Leitung: Dr. Chr. Schmincke

Sprachkenntnisse

Englisch
Französisch

Würzburg, 1.11.2005


Julia Meinhardt